

Estudio integrado de las características histopatológicas y clínicas en pacientes con enfermedad de Alzheimer



Tesis Doctoral

Diana Furcila

Licenciada en Psicología

Programa de Doctorado en Psicología de la Salud

Javier DeFelipe Oroquieta
Lidia Alonso-Nanclares
Emilio Ambrosio Flores

**Madrid
2019**

Estudio integrado de las características histopatológicas y clínicas en pacientes con enfermedad de Alzheimer

Tesis Doctoral

Diana Furcila

Licenciada en Psicología

Programa de Doctorado en Psicología de la Salud

Javier DeFelipe Oroquieta
Lidia Alonso-Nanclares
Emilio Ambrosio Flores

**Madrid
2019**

El presente trabajo de investigación ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (SAF 2015-66603-P y TIN2017-83132-C2), CIBERNED (Centro de Investigación Biomédica en Red, Enfermedades Neurodegenerativas) con código 2013/07; el proyecto *Alzheimer's Association* (ZEN-15-321663), el proyecto Cajal Blue Brain de la Universidad Politécnica de Madrid (PINV-18-XEOGHQ-19-4QTEBP), así como el proyecto Human Brain Project (720270 SGA1 y 785907 SGA2).

Siempre me ha gustado comparar las cosas complejas de la vida con subir una montaña; a pesar de saber que la ruta estará indicada, quién sabe qué te encontrarás por el camino (y, más importante, quién sabe si llegarás). Cómo empecé a vislumbrar la cima de esta montaña y cómo llegué hasta el Laboratorio Cajal es una historia un tanto larga, y cabe tanta gente dentro, que es difícil saber por quién empezar, así que me iré al final de ella.

En primer lugar, gracias al profesor Emilio Ambrosio por darme la oportunidad de realizar esta tesis y por todo el ánimo que me ha ofrecido a lo largo de estos años.

En segundo lugar, agradecer a mis directores de tesis, pero es algo que va más allá de una mera obligación académica; es un sincero gracias por abrirme un hueco en el fascinante mundo de las neuronas. Javier, te estaré siempre agradecida por todo lo que me has enseñado, a nivel personal y profesional, por tu paciencia y tu humildad, por tus cualidades que no son fáciles de encontrar en los investigadores de tu talla. Lidia, más que una mentora; gracias por tus enseñanzas, por cada palabra de apoyo y consuelo cuando los experimentos se torcían o cuando los días se hacían infinitos, por tu paciencia en mi proceso de aprendizaje y, lo más importante, por haber confiado siempre en mí. Sin duda, me topé por el camino con grandes maestros.

DeFelipe's Lab, qué gran equipo! A todos y cada uno de los que me habéis acompañado hasta aquí y que me habéis visto crecer todos estos años: Lidia peque, Rodri, Ángel, Ana, Pilar, Montse, Alberto, Silvia, Gonzalo, Carmen, Diana, Asta, Paula, Conchi, Sole, Juncal, Miguel, Mónica ... Gracias! Los Cortical People (Álex, Guille, Andrea S., Andrea peque, Martas y Lauras varias del mundo, Deb, Patri, Miriam, Lore, Mamen, Sandra, Nico, Albertito Ronin), esa familia joven del lab, gracias por todos y cada uno de los momentos que hemos pasado juntos, que no han sido pocos, y por toda la ayuda que me habéis ofrecido siempre. A mama-Isa y a Ruth, porque habéis sido algo más que unas excelentes mentoras científicas (creo que lo puedo resumir en tres palabras), gracias por cuidarme.

Cerrando el apartado "agradecimientos profesionales", me siento muy afortunada de haber conocido en el camino a muchos investigadores que me han aportado gran parte del conocimiento adquirido, ya sea en congresos, seminarios, cursos... De todos ellos, quisiera agradecer especialmente a Ellen Gelpí, que tanto me ayudó en mis primeros años de tesis, y a Jesús Ávila, por todo el conocimiento que me has aportado y por el ánimo que me has brindado siempre.

En el lado personal de todo esto, la lista es larga (qué suerte!):

Los banquitos (ay!). En esta palabra entra tanto, y tanta gente, que es difícil escoger las palabras adecuadas para decirles que, gracias a ellos, emprendí este camino. Cuando uno estudia Psicología en Somosaguas, tiene la suerte de encontrarse con personas maravillosas: Sarita, Gonzalo, Ana, Marina (mi hemisferio derecho, no me olvido), Andrea, Sergio, Haze (Yumi miss you mucho), Rodri, Garibaldi, Aldama, Fátima, Zeus (compañero de "neurotrabajos" y gran responsable del inicio de esta tesis; vuelve pronto!), Noe, Lidia y David, y muchos otros que me dejó seguro, gracias por haber sido mi familia durante 5 maravillosos años. César, la ratita de laboratorio ha llegado al final del laberinto (y qué laberinto!). Carol, mi querida compañera, ex-jefa y siempre amiga, gracias por haber puesto en mi camino a cientos y cientos de personas que me han enseñado que, a veces, las limitaciones solo están en nosotros mismos. Gracias a todos!

Torreyuyu, mi familia en lo bueno y en lo malo, mil gracias (si os cito aquí a todos, se me van los folios). Sencillamente, os quiero.

Carabanchel, gran barrio, mejores personas (algunos no sois de aquí, pero fuiste acogidos, con mucho amor, alguna vez): Belén (mi maestra en tanto), Viernes (lo hemos conseguido, amiga), el Comando Medioguarrero, el equipo montañero (Paulita, Mazo, Pedro ElCuestas), Elsa, Mercedes, Victoria, Pablito, Araceli, Jezú, David, Sandra (la única psicóloga que no me cobra y, encima, amiga incondicional), Enrique (me cuidaste en el CAIT, pero te llevo al barrio), súper-enfermera Claudia, Marina (Doctora Ávila, menos mal que fui a aquel congreso!), los aikidokas, los Toligos (véase Hervás, Ruíz y Casero, 3 personitas muy especiales en mi vida en estos últimos meses de tesis, compañeros de atardeceres, estudio de constelaciones y posiciones lunares, cómo agradeceros lo que me aguantáis y cuidáis), La Guarida (de ocio variado, desde el uso del Photoshop hasta clases de música y conciertos), Kaki (fiel compañero de eventos musicales, por lo que aprendo de ti y por las veces que me has dicho “todo saldrá bien, rumana”), Ernesto (mi hermano pequeño canario-holandés), y Kata (por haber sido mi compañero gran parte de este trayecto, por tu paciencia, y por enseñarme a reírme de la vida). A todos vosotros que, de alguna manera u otra, habéis hecho este camino más fácil, gracias de corazón.

Supongo que el Consejo de Sabios merece una mención especial, sencillamente porque sin Cheta, Andrés y Johnnie, esto no sale. Me emociona escribirlo, y me doy cuenta de que todo agradecimiento hacia vosotros se queda corto, así que solo puedo desear que estéis en mi famosa barbacoa de los 50, significará que hemos des-aprendido juntos muchos años más.

Y por último,

a Paz, por armar el puzle conmigo, por llevarme hasta aquí;

a Mery, por todo lo que cabe en 14 años, por inspirarme siempre, por ser como eres;

a mis padres, mi hermano, y Meda, por toda la ayuda incondicional que me seguís brindando, por todo lo que he aprendido, y por lo que me queda aún por aprender de vosotros;

gracias!

*“La ciencia será siempre una búsqueda...
es un viaje, nunca una llegada”*

K. Popper

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	1
LISTA DE TABLAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMEN	13
I. INTRODUCCIÓN	17
1.1. Envejecimiento cerebral y memoria	17
1.2. Enfermedad de Alzheimer	18
1.2.1. Origen y definición.....	18
1.2.2. Sintomatología y diagnóstico.....	19
1.2.3. Características histopatológicas.....	24
1.2.3.1. Patología amiloide.....	24
1.2.3.2. Patología neurofibrilar.....	26
1.2.3.3. Relación entre la patología amiloide y la patología neurofibrilar.....	27
1.2.3.4. Otras patologías asociadas a la enfermedad de Alzheimer.....	28
1.3. Formación del hipocampo	29
1.3.1. Organización citoarquitectónica y laminar.....	30
1.3.1.1. Giro dentado.....	31
1.3.1.2. Campos amónicos.....	31
1.3.1.3. Subículo.....	31
1.3.2. Circuitos hipocampales.....	33
1.3.3. Implicaciones funcionales de la conectividad hipocampal.....	35
1.4. Estudio de la enfermedad de Alzheimer: análisis multidimensional	37
II. OBJETIVOS	41

III. MATERIALES Y MÉTODOS	45
3.1. Obtención y procesamiento del tejido cerebral humano	45
3.2. Microscopía óptica: histología e inmunohistoquímica.....	46
3.2.1. Inmunohistoquímica convencional.....	46
3.3. Microscopía confocal: doble y triple inmunofluorescencia	49
3.4. Estimaciones estereológicas mediante microscopía óptica.....	51
3.4.1. Estimación del encogimiento del tejido.....	51
3.4.2. Análisis de las densidades neuronales.....	51
3.4.3. Análisis de las placas de β -amiloide.....	53
3.5. Microscopía confocal.....	53
3.5.1. Análisis de la patología neurofibrilar en CA1	55
3.5.2. Análisis de la patología amiloide en CA1.....	55
3.6. Análisis multidimensional.....	56
3.6.1. InTool Explorer.....	57
3.6.1.1. Estructura informática y tecnologías empleadas.....	58
3.6.1.2. Manejo de datos.....	58
3.6.1.3. Visualización de datos.....	59
3.6.1.4. Tarjetas de visualización.....	59
3.7. Análisis estadístico.....	66
IV. RESULTADOS	69
4.1. Estimación de la densidad neuronal.....	69
4.2. Estudio de la patología neurofibrilar.....	71
4.2.1. Estimación de la densidad de neuronas PHF _{Tau-ir}	71
4.2.2. Caracterización de las neuronas PHF _{Tau-ir}	73
4.2.3. Distribución de neuronas PHF _{Tau-ir}	75
4.3. Estudio de la patología amiloide.....	76
4.3.1. Estimación de la densidad de placas A β -ir	76

4.3.2. Caracterización de la expresión de placas $A\beta_{-ir}$	78
4.3.2.1. Morfología de las placas $A\beta_{-ir}$	83
4.3.3. Distribución de las placas $A\beta_{-ir}$	84
4.4. Análisis multidimensional	86
4.4.1. Validación de la herramienta InTool Explorer	86
4.4.2. Visualización de nuevas relaciones	91
V. DISCUSIÓN	97
5.1. Alteraciones histopatológicas en el hipocampo de pacientes con EA	98
5.1.1. Densidad neuronal	98
5.1.2. Patología neurofibrilar	98
5.1.3. Patología amiloide	100
5.1.4. Relación entre la patología neurofibrilar y la patología amiloide	102
5.2. Alteraciones en la conectividad hipocampal: implicaciones funcionales	104
5.3. Variabilidad interindividual	106
5.4. Efectos de la fijación	107
5.5. Coexistencia de proteinopatías	108
5.6. Reserva cognitiva	108
5.7. Análisis multidimensional de los datos de pacientes con enfermedad de Alzheimer: InTool Explorer	109
VI. CONCLUSIONES	115
VII. BIBLIOGRAFÍA	119
VIII. ANEXO: PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DE LOS RESULTADOS	141

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Escala ABC de diagnóstico neuropatológico. **A:** Fases de Thal et al. (2002) en relación a la distribución de depósitos de amiloide. En rojo se indica la primera fase o inicial (isocortical); en naranja, fase 2 o moderada (límbico), y en amarillo, fase 3 o tardía (subcortical); **B:** Distribución espaciotemporal de patrones de degeneración neurofibrilar, de Braak y Braak (1991). Amyg: Amígdala; EC: Corteza entorrinal; Cg: Córtex cingulado; Prec: Precúneo; 4: Córtex motor primario; 3-1-2: Córtex sensorial primario; 17: Córtex visual primario; 18: Córtex visual asociativo; **C:** Criterios de análisis semicuantitativos de placas $A\beta_{-ir}$ en tres regiones cerebrales (frontal, temporal y parietal), establecido por CERAD (*Consortium to Establish a Registry for Alzheimer Disease*, Mirra et al., 1991). Mediante el método de tinción de plata se establece la cantidad de placas neuríticas en estas regiones. Modificada de Serrano-Pozo et al., 2011.

Figura 2. Gráfica que ilustra la curva de deterioro de un paciente diagnosticado con EA. La línea amarilla indica la pérdida de memoria asociada a la edad, mientras que la línea azul ilustra una pérdida de funciones más pronunciada y que se correspondería a un diagnóstico de deterioro cognitivo leve (DCL). La línea roja hace referencia al periodo correspondiente a los estadios tardíos de la EA donde hay una pérdida total de funciones cognitivas. Tal y como se indica en la gráfica, los cambios cerebrales podrían aparecer décadas antes de la aparición de los síntomas. Modificada de Hampel y Lista, 2016.

Figura 3. Fotografías de secciones coronales de cerebro humano. A la izquierda se observa un cerebro control y a la derecha un cerebro de un paciente con EA. En este último, se aprecia un encogimiento del córtex cerebral y del hipocampo en particular, una disminución de la sustancia blanca, y una expansión de los ventrículos cerebrales. Tomada de ADEAR (*Alzheimer's Disease Education and Referral Center, a service of the National Institute on Aging*).

Figura 4. Dibujos originales realizados por Santiago Ramón y Cajal, para ilustrar distintos tipos de placas (**A-C**) y preparaciones de tejido cerebral teñidas con el método de nitrato de plata reducido (**D-F**). Tomado de García-Marín et al., 2007.

Figura 5. Esquema de los cambios neurofibrilares observados en la formación del hipocampo y en la neocorteza temporal adyacente. Nótese la evolución desde el estadio I hasta estadio VI. Modificada de Braak y Braak (1995).

Figura 6. A: Fotografía panorámica de un corte coronal de cerebro humano teñido con el método de Nissl. Los recuadros indican la ubicación de la formación del hipocampo. Im-

gen tomada del National Museum of Health and Medicine. **B**: dos cortes coronales que muestran la ubicación del hipocampo, así como su formación antero-posteriormente.

Figura 7. A: Formación del hipocampo humano de una sección teñida con el método de Nissl. **B**: Microfotografías que muestran las características citoarquitectónicas de las diferentes regiones de la formación del hipocampo. GD: giro dentado; CA1-3: campos amónicos. Mol: capa molecular; Gran: capa granular; Pol: capa polimórfica; Lac-mol: estrato *lacunosum-moleculare*; Rad: estrato radiatum; Pir: estrato piramidal; Or-alv: estratos oriens y alveus. Barra de escala 1200 μm (en **A**); 320 μm (en **B**). Modificada de DeFelipe et al. (2007).

Figura 8. Esquema de las principales conexiones intrínsecas de la formación del hipocampo y la CE, así como de las principales conexiones aferentes y eferentes corticales y subcorticales. Las líneas discontinuas indican las conexiones con el GD, CA3 y la CE. Modificado de DeFelipe et al., 2007.

Figura 9. Microfotografías ilustrando la formación hipocampal de un paciente con EA de secciones inmunoteñidas para NeuN (**A**), Nissl (**B**), PHF_{Tau-AT8} (**C**), PHF_{Tau-pS396} (**D**) y A β (**E**). Barra de escala (en **E**): 1000 μm . GD: giro dentado; CA3-CA1: campos amónicos; SUB: subículo.

Figura 10. Imágenes de microscopía confocal de la formación hipocampal de un paciente con EA que muestra tinción para anti-A β (**A**, **C**) y anti-PHFTau (anti-PHF_{Tau-AT8} y anti-PHF_{Tau-pS396} en **B** y **D**, respectivamente). Barra de escala (en **D**): 50 μm .

Figura 11. Imágenes de microscopía confocal de la formación hipocampal de un paciente con EA que muestra tinción para anti-PHF_{Tau} (anti-PHF_{Tau-AT8} y anti-PHF_{Tau-pS396}; **A** y **B**, respectivamente) y tinción para Methoxy-X04 (**C**). Barra de escala (en **C**): 50 μm .

Figura 12. Columna de la izquierda: microfotografías ilustrando la formación hipocampal de un paciente con EA de secciones inmunoteñidas para NeuN (**A**), Nissl (**C**), PHF_{Tau-AT8} (**E**), PHF_{Tau-pS396} (**G**) y A β (**I**). Columna de la derecha (**B**, **D**, **F**, **H**, **J**): mayor aumento de la región CA1 para ilustrar el marco de conteo aplicado en los procedimientos estereológicos (las líneas verdes corresponden a los bordes de inclusión y las líneas rojas a los bordes de exclusión). En las secciones con tinción de Nissl, una neurona se contó solamente si el nucléolo se identificaba claramente en el plano óptico a lo largo del eje z, mientras que en las secciones NeuN_{ir}, una neurona se contó cuando su núcleo se identificaba claramente. Barra de escala (en **J**): 1000 μm en **A**, **C**, **E**, **G** e **I**; 37 μm en **B** y **D**; 90 μm en **F**, **H** and **J**. GD: giro dentado; CA3-CA1: campos amónicos; SUB: subículo.

Figura 13. Formación hipocampal de un paciente con EA. (A) Sección marcada con la tinción de Nissl de un paciente con EA (Az6) para ilustrar las áreas hipocampales. Note la pérdida neuronal en CA1. Las imágenes de confocal muestran tinción para anti-A β (B) y anti-PHF_{Tau-pS396} (C) y fueron tomadas de una sección doblemente marcada para ilustrar el patrón de distribución de las placas A β _{ir} y las neuronas PHF_{Tau-pS396-ir}, respectivamente. (D) Ambos canales mostrando tanto el marcaje anti-A β como el marcaje anti-PHF_{Tau-pS396}. (E, F) Región CA1 mostrando el marcaje de neuronas PHF_{Tau-pS396-ir} (E) y de placas A β _{ir} (F). CA1-CA3: campos amónicos; GD: giro dentado; SUB: subículo; Pyr: *stratum pyramidale*; Rad: *stratum radiatum*; Or: *stratum oriens*. Barra de escala (en F): 20 μ m en A; 25 μ m en B, C, D; 50 μ m en E, F.

Figura 14. Análisis de la distribución y expresión de neuronas PHF_{Tau-ir} mediante el software Imaris. A: Imagen de microscopía confocal mostrando una sección doblemente teñida para anti-PHF_{Tau-AT8} (rojo) y anti-PHF_{Tau-pS396} (verde), en la región CA1, la cual puede ser visualizada entera, del paciente Az4. B: Los puntos son asignados a cada neurona, siendo fácilmente visualizados al apagar los canales de fluorescencia. C: El rectángulo es la región marcada por puntas de flecha en B. Los diferentes colores de los puntos corresponden a neuronas PHF_{Tau-AT8-ir} (rojo), neuronas PHF_{Tau-pS396-ir} (verde), y neuronas que coexpresan ambos marcadores PHF_{Tau} (amarillo). Barra de escala: 200 μ m (en B); 50 μ m (en C).

Figura 15. Ejemplo de una hoja de datos preparada para InTool Explorer.

Figura 16. Capturas de pantalla de InTool Explorer para ilustrar el proceso de carga de datos. A: abrir desde el archivo de datos desde el servidor. B: lista de variables que se clasifican automáticamente como categóricas, cuantitativas u ordinales. C: opción de guardar un análisis.

Figura 17. Tarjetas de filtrado de InTool Explorer. A: filtrado de variables categóricas como “Región” y “Caso”, con casillas para marcar o desmarcar. B: filtrado de una variable cuantitativa (“Neuronas NeuN_{ir}/mm³”) mediante control de rango.

Figura 18. Uso de los gráficos de coordenadas paralelas. (A) Gráfico de coordenadas paralelas de las variables seleccionadas, agrupadas por columnas. (B) Tarjeta de estadística (*Column Statistics*) de la variable “Neuronas NeuN_{ir}/mm³” que facilita la selección de valores específicos. (C) Gráfico de coordenadas paralelas usando valores de rango para la variable “Neuronas NeuN_{ir}/mm³” para visualizar las regiones o los pacientes correspondientes a un rango seleccionado (los valores de la media se muestran en B). Esta selección facilita la

visualización de una posible relación con la variable “Placas $A\beta_{-ir}/mm^3$ ”. CA1-CA3: campos amónicos; SUB: subículo.

Figura 19. Interfaz de InTool Explorer mostrando varias tarjetas de visualización. (A) Gráfico de conjuntos paralelos (*Parallel set*) mostrando las variables “Región”, “Escala de Braak” y “Neuronas NeuN_{-ir}”. Cada barra horizontal representa posibles categorías asociadas a cada variable, mientras que el ancho de la barra indica la fracción proporcional de la categoría total. (B) Gráfico radial ilustrando la relación entre tres variables: “Edad en el momento del diagnóstico”, “Neuronas NeuN_{-ir}/mm³” y “Progresión de la enfermedad (años)”. Todos los pacientes se visualizan en el lado izquierdo del gráfico. Esta tarjeta de visualización permite múltiples comparaciones con el fin de visualizar valores similares o extremos. El paciente Az5 (resaltado en verde) se muestra como ejemplo de visualización. (C) Gráfico de dispersión mostrando la relación entre las variables “Edad en el momento del diagnóstico” y “Neuronas NeuN_{-ir}/mm³” por paciente. Observe el valor extremo resaltado con el globo azul (paciente Az11). Esta identificación ofrece información adicional sobre el valor seleccionado. CA1-CA3: campos amónicos; SUB: subículo.

Figura 20. Tarjeta de datos de InTool Explorer para visualizar los datos brutos en cualquier momento que el usuario lo necesite.

Figura 21. Tarjetas específicas de dominio creadas en InTool Explorer a partir de imágenes histológicas de muestras de cerebro humano de pacientes con EA. (A) Las imágenes cargadas en la herramienta puede ser visualizadas de manera conjunta. (B) Puesto que las imágenes pueden filtrarse por etiquetas, todas las imágenes presentadas corresponden al marcador “NeuN”. (C) La tarjeta creada muestra información relativa a la imagen seleccionada: título, variables asociadas a la imagen, etiquetas y notas, así como la asociación espacial (*Spatial association*; detalles en D). (D) Esta característica proporciona la facilidad de añadir filtros visuales de variables categóricas a la imagen seleccionada (véase **Figura 22** para más detalles).

Figura 22. Tarjetas específicas de dominio para filtrado espacial. (A) Tarjeta de imagen del hipocampo de una sección anti-NeuN de un paciente con EA (Paciente Az1). La variable “Región” se añadió a la tarjeta de imagen con la función de asociación espacial (*Spatial association*) como un filtro para cualquier visualización simultánea. A la derecha, se creó un gráfico de coordenadas paralelas para mostrar la dinámica de la interacción del usuario. (B) En la misma tarjeta de imagen ilustrada en A, se seleccionó una región particular (CA1, resaltada en azul). A la derecha, en el gráfico de coordenadas paralelas, aparecen solamente los datos filtrados. CA1-CA3: campos amónicos; SUB: subículo.

Figura 23. Gráfico mostrando la media de las densidades neuronales en las áreas hipocampales examinadas, estimadas en secciones con tinción de Nissl y anti-NeuN, en pacientes con EA y sujetos sin demencia. Las densidades representadas corresponden al número de neuronas marcadas por volumen (mm^3) por cada caso analizado. Los círculos blancos corresponden a los pacientes con EA que también presentan esclerosis del hipocampo. CA3-CA1: campos amónicos; SUB: subículo.

Figura 24. Microfotografías de la formación hipocampal del paciente Az4 para ilustrar la esclerosis del hipocampo. Las secciones anti-NeuN (**A**) y con tinción de Nissl (**B**) muestran la pérdida neuronal en CA1. Las líneas (en **A** y **B**) indican la transición entre CA1, CA2 y el subículo. GD, giro dentado; CA1-CA3, campos amónicos; SUB, subículo. Barra de escala (en **B**) $1000\mu\text{m}$.

Figura 25. Gráfico mostrando la media de densidades neuronales por volumen de neuronas $\text{PHF}_{\text{Tau-AT8-ir}}$ y $\text{PHF}_{\text{Tau-pS396-ir}}$ en las áreas hipocampales analizadas. Las densidades representadas corresponden con el número de neuronas marcadas por volumen (mm^3) por cada caso analizado. GD: giro dentado; CA3-CA1: campos amónicos; SUB: subículo.

Figura 26. Representación gráfica de los porcentajes de neuronas $\text{PHF}_{\text{Tau-AT8-ir}}$ y $\text{PHF}_{\text{Tau-pS396-ir}}$, considerando las neuronas teñidas con el método de Nissl como la población total de neuronas. Los datos corresponden al promedio de los porcentajes por región. Nótese que el porcentaje de elementos $\text{PHF}_{\text{Tau-pS396-ir}}$ sobrepasa la población neuronal total, que podría ser una consecuencia de ovillos neurofibrilares extracelulares marcados u “ovillos fantasma” (ver Discusión para más detalles). CA3-CA1: campos amónicos; SUB: subículo.

Figura 27. Proyecciones de pilas de imágenes para ilustrar el marcaje de neuronas en secciones doblemente marcadas para $\text{PHF}_{\text{Tau-AT8}}$ y $\text{PHF}_{\text{Tau-pS396}}$. **A, B:** Microfotografías de confocal a bajo aumento de la formación hipocampal mostrando marcaje para $\text{PHF}_{\text{Tau-pS396}}$ (**A**, en verde) y $\text{PHF}_{\text{Tau-AT8}}$ (**B**, en rojo). Las puntas de flecha indican los límites de CA1. **C-H:** Tríos de proyecciones de pilas de imágenes tomadas de secciones doblemente inmunoteñidas para $\text{PHF}_{\text{Tau-PHF1}}/\text{PHF}_{\text{Tau-AT8}}$. Las flechas indican neuronas que expresan anti- $\text{PHF}_{\text{Tau-AT8}}$ y anti- $\text{PHF}_{\text{Tau-pS396}}$ (**C-E**). Las puntas de flecha indican una neurona que expresa anti- $\text{PHF}_{\text{Tau-AT8}}$, y los asteriscos indican dos neuronas que expresan solamente $\text{PHF}_{\text{Tau-pS396}}$. GD: giro dentado; CA1-CA3: campos amónicos; SUB: subículo. Barra de escala (en H): $922\mu\text{m}$ (in **A, B**) and $50\mu\text{m}$ (in **C-H**).

Figura 28. Gráfico circular que ilustra los porcentajes de neuronas teñidas en secciones doblemente marcadas para PHF_{Tau-AT8} y PHF_{Tau-pS396}. A pesar de la gran variabilidad en los patrones de expresión, las medias de los porcentajes de expresión en el gráfico “Resumen” muestran claramente una mayor proporción de neuronas PHF_{Tau-pS396}.

Figura 29. Gráficos para ilustrar las variables estimadas de las placas A β _{-ir} en las áreas hipocampales analizadas. **A:** Número medio de placas A β _{-ir} por volumen. **B:** Volumen medio ocupado por placas A β _{-ir}. **C:** Estimación del volumen medio de placas A β _{-ir}. GD: giro dentado; CA3-CA1: campos amónicos; SUB: subículo.

Figura 30. Proyecciones de pilas de imágenes para ilustrar la visualización de placas mediante doble marcaje A β /Methoxy-X04. Como puede apreciarse, la placa se visualiza claramente con ambos marcadores. Barra de escala (en **C**): 50 μ m.

Figura 31. Gráfico circular para mostrar los porcentajes de placas marcadas en los análisis de secciones doblemente marcadas. **A:** A β /PHF_{Tau-PHF1}. **B:** A β /PHF_{Tau-AT8}. Ambos análisis ilustran una mayor proporción de placas A β _{-ir} y una menor proporción de placas A β _{-ir} negativas.

Figura 32. Placas en secciones hipocampales doblemente teñidas. **A, B, E:** Proyecciones de pilas de imágenes de confocal tomadas de secciones doblemente teñidas para A β /PHF_{Tau-pS396}. **C, D:** Proyecciones de pilas de imágenes de confocal tomadas de secciones doblemente teñidas para A β /PHF_{Tau-AT8}. Las placas que expresan A β y PHF_{Tau-AT8}, así como A β y PHF_{Tau-pS396} se muestran en **A** y **C**, respectivamente. En **B** se ilustran las placas que expresan solamente PHF_{Tau-pS396} y en **D**, las que expresan solamente PHF_{Tau-AT8}. Una placa que expresa solamente anti-A β se muestra en **E**. Barra de escala (en **E**): 50 μ m.

Figura 33. Proyecciones de pilas de imágenes de microscopía confocal tomadas de secciones hipocampales triplemente marcadas (Methoxy-X04/PHF_{Tau-AT8}/PHF_{Tau-pS396}). **A, B:** las placas no expresan ninguna isoforma anti-PHF_{Tau}, pero sí muestran marcaje para Methoxy-X04 que indica la presencia de A β . **C, D:** ejemplos de placas que expresan los tres marcadores (Methoxy-X04/PHF_{Tau-AT8}/PHF_{Tau-pS396}). Barra de escala (en **D**): 50 μ m.

Figura 34. Microfotografía de la formación hipocampal de un paciente con EA, de una sección doblemente teñida para Nissl y anti-A β . **A:** Microfotografía a bajo aumento para ilustrar las distintas regiones hipocampales. **B:** Mayor aumento del área marcada en **A**, mostrando la distribución de las placas por capas en la región CA1 (Lac-mol: estrato *lacunosum-moleculare*; Rad: estrato *radiatum*; Pyr: estrato *pyramidale*; Or: estrato *oriens*. GD: giro

dentado; CA1-CA3: campos amónicos; SUB: subículo. Barra de escala 1000 μ m (en B); 860 μ m (en A).

Figura 35. Mapas de la formación hipocampal de pacientes con EA para ilustrar la distribución de placas y los patrones de marcaje en CA1. Los dibujos se basan en el análisis de secciones doblemente marcadas para anti-A β y anti-PHF_{Tau}. Los límites entre las áreas hipocampales se indican con líneas, mientras que CA1 está marcado con un rectángulo. Debajo de cada perfil, CA1 se muestra de manera esquemática con sus correspondientes subregiones y capas. Los puntos verdes corresponden a placas A β _{ir}, los puntos rojos a placas PHF_{Tau-ir} (PHF_{Tau-AT8} o PHF_{Tau-pS396}), y los puntos amarillos indican placas que expresan tanto la proteína A β como la proteína PHF_{Tau}. **A-F:** Dibujos representativos de los pacientes Az1, Az2, Az3, Az4, Az5 y Az6, respectivamente. GD: giro dentado; CA1-CA3: campos amónicos; SUB: subículo; Prox: proximal; Med: medial; Dist: distal; Or: estrato *oriens*; Pyr: estrato *pyramidale*; Rad: estrato *radiatum*. Barra de escala (en F): 2000 μ m.

Figura 36. Gráficos de coordenadas paralelas mostrando la densidad neuronal de pacientes con EA. **A:** Relación entre “Neuronas NeuN_{ir}/mm³” y “Caso”. **B:** Selección de valores por encima de la media de la variable “Neuronas NeuN_{ir}/mm³” y su relación con la variable “Región”. **C:** Visualización selectiva de cada región mediante diferentes colores. CA1-CA3: campos amónicos; SUB: subículo.

Figura 37. Gráficos de coordenadas paralelas para visualizar variables cuantitativas y categóricas de pacientes con EA. **A:** Las relaciones pueden establecerse entre variables cuantitativas como “Neuronas NeuN_{ir}/mm³” y “Progresión de la EA (años)”, y variables categóricas como “Escala de Braak”. **B:** selección de un rango de datos en la variable “Progresión de la EA (años)”.

Figura 38. Gráficos de coordenadas paralelas para ilustrar la visualización conjunta de “Neuronas NeuN_{ir}/mm³”, “Neuronas AT8_{ir}/mm³” y “Neuronas pS396_{ir}/mm³”, por paciente y región analizada. Al seleccionar una determinada región, se seleccionan todos los valores asociados a ella, obteniendo rápidamente una imagen de la distribución de las distintas densidades entre todas las regiones analizadas.

Figura 39. Gráficos de coordenadas paralelas para ilustrar la visualización conjunta de las densidades neuronales, de neuronas PHF_{Tau-ir} (tanto PHF_{Tau-AT8-ir} como PHF_{Tau-pS396-ir}), y de placas A β _{ir}, así como el porcentaje de tejido ocupado y el tamaño de las mismas, por paciente y región analizada.

Figura 40. Gráficos de coordenadas paralelas para ilustrar una exploración de datos específicos de diferentes variables en la región CA1. **A:** al seleccionar las “Neuronas Nissl/mm³” por encima de la media, se observa que el paciente Az10 (destacado con color marrón) muestra una densidad de placas A β _{-ir} por volumen en CA1 superior al resto de pacientes. **B:** las coordenadas paralelas permiten seleccionar más de un rango de datos en variables cuantitativas (“Neuronas Nissl/mm³” por encima de la media y densidad baja de “Placas A β _{-ir}/mm³”). En este caso, se observó que el paciente Az5 (destacado con el color verde) muestra una alta densidad de neuronas por volumen en la región CA1 y que corresponde a una baja densidad tanto de neuronas PHF_{Tau-ir} como de placas A β _{-ir}.

Figura 41. Gráfico de coordenadas paralelas para ilustrar, con distintos colores, los pacientes con EA que muestran esclerosis del hipocampo en CA1. Las densidades neuronales de estos pacientes son inferiores al resto de pacientes con EA.

Figura 42. Gráficos de coordenadas paralelas que ilustran los porcentajes de co-expresión de neuronas PHF_{Tau-ir} y de co-localización de placas A β _{-ir} en CA1, obtenidos en los análisis de microscopía confocal. **A:** visualización conjunta de los datos; **B:** selección de valores superiores al 70% de placas A β _{-ir}; **C:** selección de valores inferiores al 70% de placas A β _{-ir}.

Figura 43. Ilustración de los posibles cambios estructurales que podría sufrir una placa. Los dibujos de la parte superior esquematizan una placa en desarrollo (**I:** placa difusa; **II:** placa primitiva con fibras de A β ; **III:** placa clásica con núcleo A β _{-ir} y rodeado de neuritas distróficas; **IV:** placa compacta de A β ; dibujos modificados de Iqueda et al., 1990). Las microfotografías de la parte inferior pertenecen a secciones con doble tinción para anti-A β y anti-NeuN para mostrar placas difusas, neuríticas con núcleo central y neuríticas sin núcleo central (**I, II, III**, respectivamente), así como placas difusas, neuríticas con núcleo central y neuríticas sin núcleo central, en contacto con neuronas (**IV, V, VI**, respectivamente). Barra de escala (en **VI**): 20 μ m. Imágenes modificadas de García-Marín et al., 2009.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Escala GDS (Global Deterioration Scale) para la determinación de las 7 fases de la EA según el grado de deterioro, el estado clínico y sus características clínicas. Los estadios 1 - 3 indican fases de predemencia; 4 - 7 estadios de demencia. Tabla modificada de Reisberg (1982).

Tabla 2. Escala ABC de diagnóstico histopatológico. **A:** Presencia de placas según la clasificación de Thal et al. (2002) donde A0 = no hay presencia de depósitos de amiloide; A1 = acumulación de depósitos de amiloide en áreas isocorticales; A2 = acumulación de depósitos de amiloide en áreas isocorticales y subcorticales; A3 = acumulación de depósitos de amiloide en todas las regiones corticales y subcorticales. **B:** Presencia de ovillos neurofibrilares según la clasificación de Braak (1991, 1994) donde: I/II = presencia de ovillos neurofibrilares en corteza transentorrinal y áreas subcorticales; III/IV = presencia de ovillos neurofibrilares en regiones límbicas; V/VI = distribución isocortical de los ovillos neurofibrilares. **C:** CERAD: Protocolo de localización de placas neuríticas donde: C0 = ausencia de placas, C1 = presencia de placas de manera dispersa, C2 = presencia moderada, y C3 = presencia frecuente de placas neuríticas. Tabla modificada de Hyman et al. (2012).

Tabla 3. Resumen de los datos clínicos y patológicos. Escala de Braak (Braak and Braak, 1991): I-II (ovillos neurofibrilares en la corteza entorrinal y áreas adyacentes); III-IV (abundantes ovillos neurofibrilares en amígdala e hipocampo, extendiéndose ligeramente hacia el córtex de asociación); V-VI (ovillos neurofibrilares ampliamente distribuidos a lo largo del neocórtex, envolviendo, en última instancia, las áreas motoras y sensoriales). Escala CERAD (ART): A (baja densidad de placas neuríticas); B (densidad moderada de placas neuríticas); C (alta densidad de placas neuríticas). α Syn: proteína Alpha Sinucleína; EA: enfermedad de Alzheimer; DCL: Deterioro Cognitivo Leve; ^BBanc de Teixits Neurologics (Hospital Universitari Clinic de Barcelona); ^MBanco de Tejidos Fundación CIEN (Madrid); TDP43: proteína de unión ADN. ND: Dato no disponible.

Tabla 4. Resumen de las distintas densidades estimadas por región hipocampal y marcador en pacientes con EA y casos sin demencia (los datos se expresan como media \pm desviación típica). GD: giro dentado; CA3-CA1: campos amónicos; SUB: subículo. NA: No aplicable. (-): Dato no disponible.

Tabla 5. Número de neuronas marcadas en la región CA1, por caso, en secciones doblemente marcadas para anti-PHF_{Tau-AT8} y PHF_{Tau-pS396}. Los números entre paréntesis indican sus porcentajes relativos.

Tabla 6. Número de neuronas PHF_{Tau-ir} en la capa piramidal de la región CA1, según la localización de cada neurona en las distintas subregiones, y la tinción (PHF_{Tau-AT8}, PHF_{Tau-pS396} o PHF_{Tau-AT8}/PHF_{Tau-pS396}). Los números entre paréntesis indican sus porcentajes relativos.

Tabla 7. Número de placas en CA1, por caso, analizadas en secciones doblemente marcadas. Se emplearon tres combinaciones distintas de anticuerpos: A β /PHF_{Tau-AT8}, A β /PHF_{Tau-PHF1} y PHF_{Tau-AT8}/PHF_{Tau-pS396}. En la combinación PHF_{Tau-AT8}/PHF_{Tau-pS396}, todas las placas analizadas expresaban ambas isoformas (PHF_{Tau-AT8} y PHF_{Tau-pS396}). ND: Dato no disponible.

Tabla 8. Número de placas en CA1, por caso, analizadas en secciones triplemente marcadas para Methoxy-X04, anti-PHF_{Tau-AT8} y anti-PHF_{Tau-pS396}. Los números entre paréntesis representan los porcentajes relativos de las placas analizadas.

Tabla 9. Número de placas analizadas en CA1 acorde a su marcaje (en secciones doble y triplemente marcadas), así como la morfología de las mismas, clasificadas como “neuríticas con núcleo central” y “neuríticas sin núcleo central”. Los números entre paréntesis representan los porcentajes relativos de las placas analizadas.

Tabla 10. Resumen de las placas identificadas en la región CA1 según su localización en subregiones y capas. Los datos representan el número de placas marcadas con A β /PHF_{Tau-AT8}, A β /PHF_{Tau-pS396} o PHF_{Tau-AT8}/PHF_{Tau-pS396}; ver **Tabla 7** para más detalles. Los números entre paréntesis indican sus porcentajes relativos.

LISTA DE ABREVIATURAS

A β : péptido β -amiloide

ABC: complejo avidina-biotina

CA: *cornus ammonis* o asta de Ammón

CA1-CA3: campos del asta de Ammón (o ammónicos)

CE: corteza entorrinal

DAB: 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro

DCL: deterioro cognitivo leve

DePeX: mezcla de isómeros para medio de montaje

DSM-V: manual diagnóstico y estadístico de trastornos mentales, del inglés “*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*”

EA: enfermedad de Alzheimer

GD: giro dentado

Ir: inmunorreactivo

MMSE: miniexamen cognoscitivo, del inglés “*mini-mental state examination*”

NaN: no-valor, del inglés “*Not a Number*”

NeuN: proteína específica nuclear de neurona

PB: tampón fosfato, del inglés “*phosphate buffer*”

PHF: pares de filamentos helicoidales, del inglés “*paired heiloidal filaments*”

PHF_{Tau}: proteína tau hiperfosforilada

PHF_{Tau-AT8}: proteína tau hiperfosforilada en el epítipo Ser199-202

PHF_{Tau-pS396}: proteína tau hiperfosforilada en el epítipo Ser396

SUB: subículo

TDP-43: proteína de unión al ADN 43, del inglés “*TAR DNA-binding protein 43*”

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) se define como un deterioro cognitivo gradual e irreversible, cuyas fases avanzadas se caracterizan por una pérdida de las funciones cerebrales superiores del sujeto (Valls-Pedret et al., 2010). Durante los procesos neurodegenerativos de la EA, la memoria es la primera función en comenzar a mostrar signos de deterioro. Las principales huellas microanatómicas son la presencia de ovillos neurofibrilares de proteína tau hiperfosforilada (PHF_{Tau}) en el interior de las neuronas, y la agregación extracelular de la proteína β -amiloide ($A\beta$). No obstante, la mera presencia de estas proteínas no induce necesariamente a la EA.

La formación hipocampal es una de las primeras regiones en mostrar alteraciones en la EA, siendo una zona de estudio relevante dadas las funcionalidades que soporta, como la formación de nuevas memorias, y la orientación espacial y temporal, que se ven alteradas en etapas iniciales de la enfermedad.

El objetivo principal de esta tesis es analizar las alteraciones histopatológicas en la formación del hipocampo de pacientes con la EA, explorando, además, su posible relación mediante una herramienta informática desarrollada para ello.

En primer lugar, se ha analizado la densidad de las neuronas de PHF_{Tau-ir} y de las placas de $A\beta_{-ir}$, así como la posible pérdida neuronal, en el giro dentado (GD), CA3, CA1 y subículo de 11 pacientes con EA. Usando métodos cuantitativos estereológicos se encontró que la densidad de neuronas en CA1 de pacientes con EA estaba reducida, especialmente en aquellos casos con esclerosis del hipocampo, siendo además la región más afectada por la presencia de numerosos elementos PHF_{Tau-ir} y placas $A\beta_{-ir}$. El subículo no mostró cambios en la densidad neuronal, pero expresó niveles moderados de neuronas PHF_{Tau-ir} y placas $A\beta_{-ir}$, mientras que el GD y CA3 estaban menos afectados por la presencia de estos elementos patológicos.

En segundo lugar, se ha llevado a cabo un análisis detallado de la patología neurofibrilar y la patología amiloide en la región CA1 mediante técnicas de microscopía confocal, poniendo de manifiesto cuatro hallazgos principales. Primero, a pesar de que la expresión de placas y de neuronas PHF_{Tau-ir} presenta una gran variedad de patrones, la capa piramidal de la región medial de CA1 contiene el mayor número tanto de placas como de neuronas PHF_{Tau-ir}. Segundo, una gran proporción de placas $A\beta_{-ir}$ también presentaban PHF_{Tau-ir}, mientras que las placas que carecían de inmunoreactividad frente a $A\beta$ (marcadas únicamente con PHF_{Tau-pS396} o PHF_{Tau-AT8}) fueron escasas. Tercero, todas las placas que contenían alguna de las dos isoformas de PHF_{Tau}, expresaba también la otra, es decir, si una placa con-

tenía PHF_{Tau-pS396}, también contenía PHF_{Tau-AT8}, y viceversa. Cuarto, el estudio de co-localización de ambas isoformas de PHF_{Tau} en las neuronas de CA1 reveló que la mayoría de las neuronas analizadas expresaban solamente PHF_{Tau-pS396}. Asimismo, la mayoría de las neuronas PHF_{Tau-ir} se identificaron como células piramidales.

Por último, el desarrollo y la aplicación de una herramienta interactiva de visualización de datos, InTool Explorer, facilitó la visualización detallada de los datos obtenidos de los pacientes con EA respecto a su información clínica, demográfica y las características histopatológicas. Asimismo, gracias a InTool Explorer se pudo encontrar una posible relación inversa entre la co-expresión de neuronas y la co-localización de placas: aquellos casos con más placas A β _{ir} presentaban un menor porcentaje de placas que muestran co-localización entre A β y PHF_{Tau}, así como un menor porcentaje de neuronas que co-expresan ambas isoformas de la proteína PHF_{Tau}, habiendo un mayor número de neuronas PHF_{Tau-pS396-ir}. Por el contrario, los casos que expresan un menor número de placas A β _{ir} presentan un mayor porcentaje de placas que muestran co-localización entre A β y PHF_{Tau}, así como un mayor porcentaje de neuronas que co-expresan ambas isoformas de la proteína PHF_{Tau}, disminuyendo el número de neuronas que expresan PHF_{Tau-pS396}.

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Envejecimiento cerebral y memoria

Se ha conceptualizado el envejecimiento como un proceso degenerativo multiorgánico cuya naturaleza implica factores tanto genéticos como ambientales (Toussaint et al., 2000). A nivel biológico se observan alteraciones hormonales, metabólicas, moleculares, neuroanatómicas y de neurotransmisores, mientras que a nivel cognitivo destaca una disminución de la capacidad atencional y perceptiva, de los tiempos de respuesta, así como una disminución en la capacidad de recuerdo y almacenamiento de la información (Kalmijn et al., 1998; Katcher, 2015). Desde el punto de vista biológico, las teorías propuestas acerca del deterioro cognitivo se engloban en dos grandes grupos: la programación genética de autodestrucción celular (Skulachev & Longo, 2005; Libertini, 2008) y la acumulación de errores genéticos y alteraciones proteicas (Weinert & Timiras, 2003). No obstante, no existe una teoría única que explique el proceso del envejecimiento y, por lo tanto, las teorías propuestas se consideran complementarias.

Como consecuencia del proceso normal de envejecimiento, las células del sistema nervioso se ven afectadas, apreciándose un incremento en el estrés oxidativo y metabólico, dando lugar a un aumento en el daño proteico, del ADN y de las membranas celulares, declive de funciones sensoriales, motoras y cognitivas con el paso del tiempo (revisado en Mattson y Magnus, 2006), así como una reducción en tareas de recuperación de memoria episódica, pero no en tareas de memoria semántica (Park y Reuter-Lorenz, 2009; Nyberg et al., 2012; revisado en Fjell et al., 2014). Asimismo, se ha descrito que ciertas alteraciones estructurales y funcionales de la sustancia blanca, así como cambios vasculares, coinciden con la alteración de ciertas funciones superiores (Liu et al., 2017).

La edad representa en sí misma un factor de riesgo para padecer enfermedades neurodegenerativas (Niccoli y Partridge, 2012), mostrándose un importante incremento en el desarrollo de estos trastornos en personas de edad comprendida entre los 60-80 años. En este sentido, hay que distinguir los síntomas del envejecimiento de aquellos que son rasgos de demencia, puesto que esta última implica una alteración progresiva, irreversible y degenerativa de las funciones cognitivas (Gustafson, 1996). En estos últimos casos, los síntomas clínicos reflejan una disminución en la capacidad de recuerdo y almacenamiento de la información mucho más pronunciada que en el envejecimiento normal. Actualmente, se piensa que existe un continuo entre el envejecimiento y la demencia; esclarecer los mecanismos subyacentes al proceso degenerativo progresivo, sigue representando un reto.

Durante los procesos neurodegenerativos de las demencias, la memoria es la primera función en comenzar a mostrar signos de deterioro. La memoria es la capacidad del ser humano de almacenar información en el cerebro, así como recuperar la información del pasado y modificarla en el tiempo (Dudai et al., 2015). Para un correcto funcionamiento de la memoria se requiere la actividad simultánea de determinadas áreas frontales, como la corteza orbitofrontal, la corteza frontotemporal y la corteza dorsolateral (Alvarez y Squire, 1994; Milner et al., 1998; Preston y Eichenbaum, 2013). En condiciones no patológicas, estas estructuras establecen conexiones directas con múltiples regiones corticales y subcorticales, como la amígdala que se asocia con el aprendizaje y la memoria emocional, y el hipocampo, que se asocia a múltiples funciones memorísticas entre las que destacan el procesamiento espaciotemporal y del almacenamiento a largo plazo.

1.2. Enfermedad de Alzheimer

1.2.1. Origen y definición

La enfermedad de Alzheimer (EA) fue descrita por primera vez por el neurólogo Alois Alzheimer en el año 1906 al realizar la autopsia de una de sus pacientes y observar lo que denominó “un proceso patológico peculiar grave de la corteza cerebral”, debido a la abundante presencia de las dos características histopatológicas que la definen, placas seniles y ovillos neurofibrilares (véase sección 1.2.3. *Características histopatológicas*). La paciente mostraba alteraciones cognitivas y conductuales graves como desorientación, disminución de la memoria, ansiedad, delirios, miedos irracionales, así como dificultades semánticas y de comprensión (revisado en Engelhardt, 2015). Actualmente, y desde el punto de vista clínico, la EA se define como un deterioro cognitivo gradual e irreversible, cuyas fases avanzadas se caracterizan por una pérdida de las funciones cerebrales superiores del sujeto (Valls-Pedret et al., 2010). Después de que Alois Alzheimer describiera las placas seniles y los ovillos neurofibrilares, se propuso que los componentes de ambas estructuras aberrantes (el péptido β -amiloide y la proteína tau, respectivamente) podrían ser las causas de la neurodegeneración (Alzheimer’s Association, 2018).

La forma mayoritaria de la EA es la esporádica o de inicio tardío, que se inicia a partir de los 65 años de edad, mientras que la forma familiar de la EA constituye solo el 5% de todos los casos. A diferencia de la EA esporádica, la forma familiar se manifiesta de forma precoz y hay pacientes que desarrollan los primeros síntomas en torno a los 40 años (Rosenberg, 2000). En la forma esporádica de la EA, en la que se centra el presente trabajo, se ha propuesto que existen factores genéticos que predisponen a la aparición de la enfermedad, es decir, incrementan la probabilidad de padecer EA. De hecho, se cree que estos factores genéticos interactúan con factores ambientales, con otras patologías o con distintas con-

diciones fisiológicas. La acción conjunta de todos los factores podrían tener un efecto sinérgico, de manera que se potencie su patogenicidad y, por tanto, la probabilidad de desencadenar la enfermedad (revisado en Rocchi et al., 2003; Hoenicka, 2006). Puesto que la demencia de tipo EA implica factores genéticos y no-genéticos, cada paciente desarrolla la enfermedad de una manera única (Stern, 2006; Sperling et al., 2011). Los factores no genéticos que se han relacionado con el desarrollo de la EA incluyen el envejecimiento, el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria (Blazquez-Llorca, 2010). Asimismo, se ha propuesto la “reserva cognitiva” como el conjunto de factores que diferencian la susceptibilidad entre individuos a la hora de sufrir cambios cerebrales y metabólicos ante procesos como el envejecimiento, o demencias como la EA (Tucker & Stern, 2011; Stern, 2012; Meng & D’Arcy, 2012).

1.2.2. Sintomatología y diagnóstico

Los estadios iniciales de la EA se caracterizan por una pérdida de contexto, desorientación y deterioro de la memoria autobiográfica (Erkinjuntti, 1996; Dubois et al., 2007; Petersen, 2009). No obstante, estos síntomas se desarrollan en varias fases, comúnmente clasificados según la escala GDS (del inglés *Global Deterioration Scale*; Reisberg, 1982) que establece 7 fases y evalúa el grado de deterioro, el estado clínico y sus características (**Tabla 1**). El problema principal del diagnóstico de la EA es que muchos síntomas coinciden con los de otras demencias corticales o subcorticales, mostrándose además una gran variabilidad interindividual en la expresión clínica de los síntomas.

Tanto el “Manual de criterios diagnósticos” (DSM-V), como la Sociedad Española de Neurología, conceptualizan la demencia (incluyendo la EA) como un conjunto de criterios donde el paciente sufre un deterioro de sus funciones cognitivas y conductuales, con un notable empeoramiento en el tiempo, que le impide la realización de las actividades básicas de la vida diaria, y que alcanza una fase terminal donde requiere cuidados continuos.

Tabla 1. Escala GDS (*Global Deterioration Scale*) para la determinación de las 7 fases de la EA, según el grado de deterioro, el estado clínico y sus características clínicas. Los estadios 1-3 indican fases de predemencia; 4-7 estadios de demencia. Tabla modificada de Reisberg (1982).

Grado de deterioro	Estado clínico	Características clínicas
1.Sin déficit	Normal	No alteraciones subjetivas. No déficit evidente en entrevista.
2.Déficit cognitivo muy ligero.	Déficit memoria ligero	Trastornos subjetivos de memoria muy frecuente en los siguientes campos: olvido de objetos familiares y olvido de nombres (propios) que antes sabía. No hay trastornos mnésicos objetivos durante la entrevista y no hay modificaciones de la vida social ni profesional.
3.Déficit cognitivo ligero.	Trastornos de memoria evidentes, disminución de atención y concentración.	Primeros signos deficiarios evidentes y manifestaciones en al menos 2 de: Se puede perder cuando se desplaza en un sitio no familiar. Colegas de trabajo se dan cuenta de su disminución de su eficacia profesional. Dificultad en encontrar palabras y nombre, evidente para los que le rodean. Puede leer un libro pero retiene poco. Menos facilidad de retener nombres de personas que le acaban de presentar. Puede perder o colocar fuera de lugar objetos de valor. Dificultades de concentración evidentes. Hay una disminución de la capacidad de reacción en situaciones sociales o profesionales difíciles. Niega que padezca el trastorno y presentan ansiedad ligera o moderada.
4.Déficit cognitivo moderado	Déficit pronunciado en memoria, atención y concentración.	Déficit durante entrevista, manifestando: Poco al corriente de la actualidad. Lagunas en recuerdo de su propio pasado. Trastornos de concentración evidentes. Disminución de capacidad para viajar, administrar su presupuesto. No existe déficit en: Orientación temporal y respecto a personas. Reconocimiento de caras y familiares. Capacidad de desplazarse por sitios conocidos. Presentan incapacidad para realizar tareas complejas. No son conscientes de sus trastornos o los niegan. Embotamiento de la actividad (le desborda) y huida de situaciones competitivas.
5.Déficit cognitivo moderado-severo	Demencia incipiente.	No puede continuar sin ayuda. En la entrevista es incapaz de recordar características importantes de su vida cotidiana (dirección, teléfono, nombres de parientes). Hay desorientación espacio-temporal. Dificultad de contar de 4 en 4 al revés a partir de 40 o de 2 en 2 a partir de 20. Conservan noción de hechos importantes que le interesan o a los otros. Sabían su nombre y el de sus hijos. No necesitan ayuda para lavarse o comer, pero tienen problemas para elegir vestidos y a veces se visten mal (zapato derecho en pie izquierdo).
6.Déficit cognitivo severo	Demencia media	Puede olvidar a veces el nombre del cónyuge (cuando medio de supervivencia); inconsciente de todos los sucesos y experiencias recientes de su vida. Retiene de forma imprecisa algunos elementos de su pasado. Ignora en qué época vive (año, estación). Dificultades en contar de 10 a 1, y a veces de 1 a 10. Necesita ayuda para actividades cotidianas. Se acuerda de su propio nombre. Cambios de personalidad y emotividad: alucinaciones, obsesiones, ansiedad y agitación, abulia cognitiva (pasota).
7.Déficit cognitivo muy severo	Demencia avanzada.	Pérdida de todas las capacidades verbales y a veces no existe lenguaje completo, solo balbuceos. Incontinencia urinaria. Necesita ayuda para asearse y comer. Déficit psicomotor afectando la marcha. Cerebro incapaz de indicar al cuerpo qué hacer. Todas las funciones corticales afectadas.

En la progresión de la EA se ha descrito un primer un periodo asintomático, que se ha convertido en objeto de dianas terapéuticas (Price & Morris, 1999; Dubois et al., 2007). En la práctica clínica se usan escalas de valoración del estado cognitivo, tanto en primeras exploraciones como en exploraciones sucesivas del paciente. Una de las más conocidas y empleadas es el test denominado *Mini Mental State Examination* (MMSE) para evaluar los estadios de los pacientes con EA (Wajman et al., 2014). Esta herramienta permite obtener una puntuación global del estado cognitivo del paciente y su disminución en el tiempo según el progreso de la enfermedad.

No obstante, puesto que muchos síntomas coinciden con los de otras demencias corticales o subcorticales (Karantzoulis y Galvin, 2011), además de una variabilidad en la expresión clínica de los síntomas entre pacientes (Stopford et al., 2008), el diagnóstico definitivo se realiza postmortem en autopsias, gracias a determinados marcadores de reconocimiento y análisis histopatológico del tejido cerebral. Este diagnóstico se barema mediante la escala ABC, que valora tres parámetros: presencia de proteína amiloide (A; Thal et al., 2002), escala Braak de distribución de ovillos neurofibrilares (B; Braak y Braak, 1991), y escala CERAD (del inglés *Consortium to Establish a Registry for Alzheimer Disease*) de presencia de placas seniles (C; Mirra et al., 1991). El diagnóstico histopatológico de la EA se rige por estos criterios conjuntamente y depende de los tres patrones establecidos (Hyman et al., 2012; **Tabla 2, Figura 1**). Asimismo, esta clasificación se utiliza para agrupar a los pacientes según los estadios de la enfermedad.

Tabla 2. Escala ABC de diagnóstico histopatológico. **A:** Presencia de placas según la clasificación de Thal et al. (2002) donde A0 = no hay presencia de depósitos de amiloide; A1 = acumulación de depósitos de amiloide en áreas isocorticales; A2 = acumulación de depósitos de amiloide en áreas isocorticales y subcorticales; A3 = acumulación de depósitos de amiloide en todas las regiones corticales y subcorticales. **B:** Presencia de ovillos neurofibrilares según la clasificación de Braak (1991, 1994) donde: I/II = presencia de ovillos neurofibrilares en corteza transentorrinal y áreas subcorticales; III/IV = presencia de ovillos neurofibrilares en regiones límbicas; V/VI = distribución isocortical de los ovillos neurofibrilares. **C:** CERAD: Protocolo de localización de placas neuríticas donde: C0 = ausencia de placas, C1 = presencia de placas de manera dispersa, C2 = presencia moderada, y C3 = presencia frecuente de placas neuríticas. Tabla modificada de Hyman et al. (2012).

A	Presencia de depósitos de amiloide (Escala Thal)	B	Presencia de ovillos neurofibrilares (Escala de Braak)	C	Presencia de placas neuríticas (Escala CERAD)
0	0	0	0	0	Ninguna
1	1 o 2	1	I o II	1	Dispersas
2	3	2	III o IV	2	Moderadas
3	4 o 5	3	V o VI	3	Frecuentes

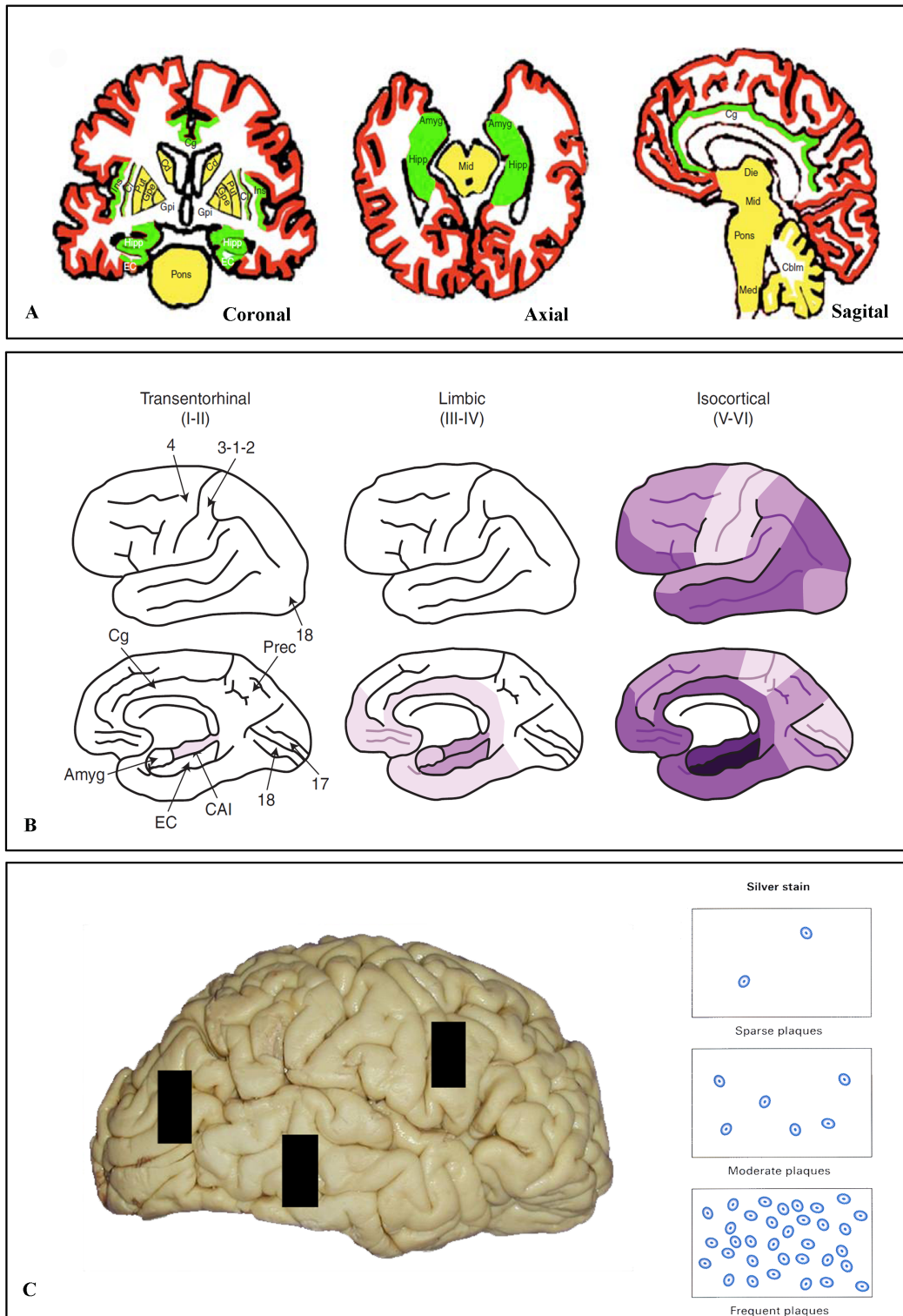


Figura 1. Escala ABC de diagnóstico neuropatológico. **A:** Fases de Thal et al. (2002) en relación a la distribución de depósitos de amiloide. En rojo se indica la primera fase o inicial (isocortical); en naranja, fase 2 o moderada (límbico), y en amarillo, fase 3 o tardía (subcortical); **B:** Distribución espaciotemporal de patrones de degeneración neurofibrilar, de Braak y Braak (1991). Amyg: Amígdala; EC: Corteza entorrinal; Cg: Córtex cingulado; Prec: Precúneo; 4: Córtex motor primario; 3-1-2: Córtex sensorial primario; 17: Córtex visual primario; 18: Córtex visual asociativo; **C:** Criterios de análisis semicuantitativos de placas $A\beta_{-ir}$ en tres regiones cerebrales (frontal, temporal y parietal), establecido por CERAD (*Consortium to Establish a Registry for Alzheimer Disease*, Mirra et al., 1991). Mediante el método de tinción de plata se establece la cantidad de placas neuríticas en estas regiones. Modificada de Serrano-Pozo et al., 2011.

Actualmente, el desarrollo de técnicas de neuroimagen y la caracterización de marcadores han facilitado un diagnóstico temprano, y han proporcionado una ventana temporal de actuación para nuevas terapias orientadas a disminuir la progresión de la enfermedad (Remi et al., 2012).

No obstante, se ha propuesto que la degeneración a nivel microanatómico comienza décadas antes de la aparición de los primeros síntomas, siendo por tanto muy relevante determinar el momento en el cual ocurren los cambios microanatómicos que, años después, podrían ocasionar el deterioro cognitivo (**Figura 2**).

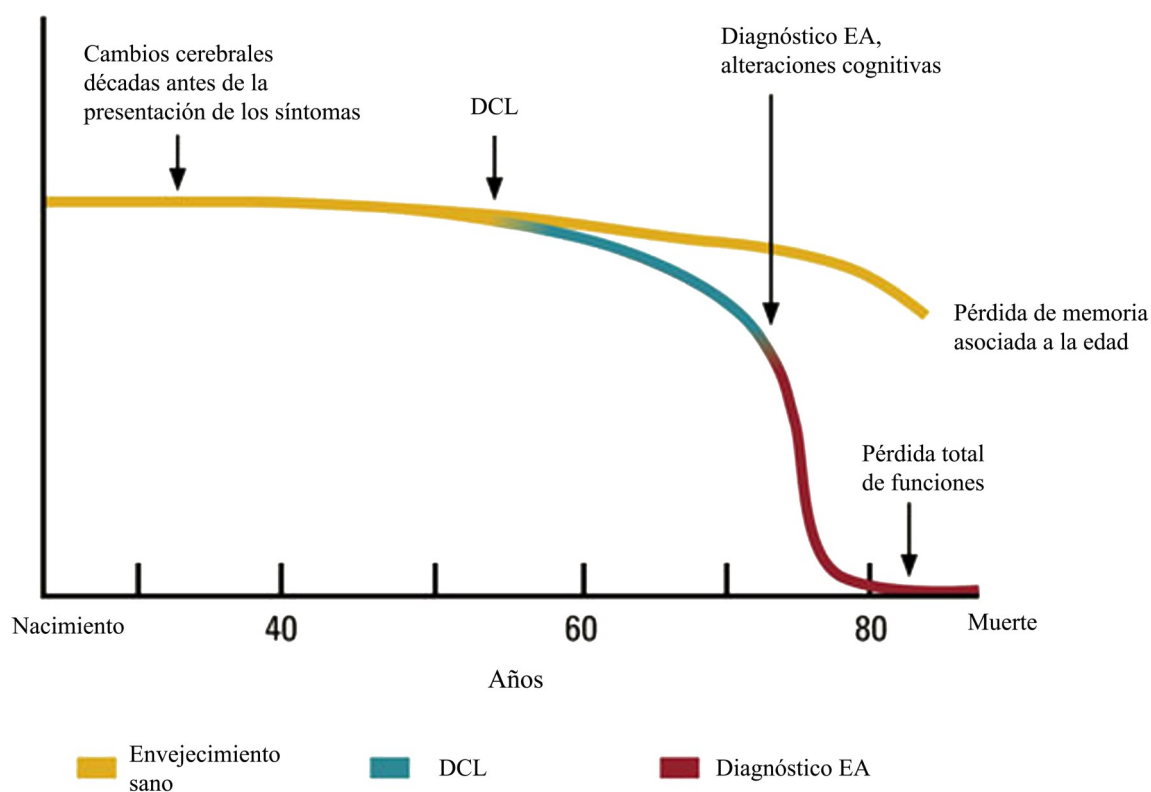


Figura 2. Gráfica que ilustra la curva de deterioro de un paciente diagnosticado con EA. La línea amarilla indica la pérdida de memoria asociada a la edad, mientras que la línea azul ilustra una pérdida de funciones más pronunciada y que se correspondería a un diagnóstico de deterioro cognitivo leve (DCL). La línea roja hace referencia al periodo correspondiente a los estadios tardíos de la EA donde hay una pérdida total de funciones cognitivas. Tal y como se indica en la gráfica, los cambios cerebrales podrían aparecer décadas antes de la aparición de los síntomas. Modificada de Hampel y Lista, 2016.

1.2.3. Características histopatológicas

A nivel macroscópico, un cerebro de un paciente con EA se caracteriza por una atrofia generalizada, acompañada de una disminución del volumen cerebral, un ensanchamiento de los surcos cerebrales y de los ventrículos, así como un encogimiento de determinadas regiones cerebrales como el hipocampo (**Figura 3**). Estas alteraciones macroscópicas son el reflejo de cambios a nivel microanatómico (DeFelipe, 2010).

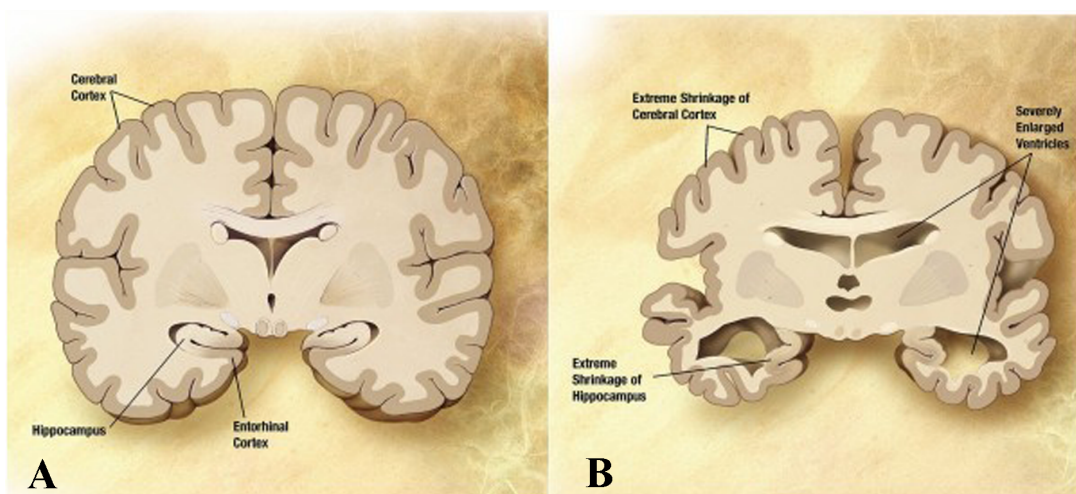


Figura 3. Fotografías de secciones coronales de cerebro humano. A la izquierda se observa un cerebro control y a la derecha un cerebro de un paciente con EA. En este último, se aprecia un encogimiento del córtex cerebral y del hipocampo en particular, una disminución de la sustancia blanca, y una expansión de los ventrículos cerebrales. Tomada de ADEAR (*Alzheimer's Disease Education and Referral Center, a service of the National Institute on Aging*).

Microscópicamente, las principales características patológicas incluyen la presencia extracelular de placas seniles formadas por el péptido β -amiloide ($A\beta$), ovillos neurofibrilares (NFT, del inglés, *neurofibrillary tangles*) intracelulares, y otras alteraciones, incluyendo la pérdida neuronal y sináptica (Blennow et al., 2006). Estos cambios patológicos se encuentran principalmente en la corteza cerebral (formación del hipocampo y neocorteza), pero también se observan en estructuras subcorticales, como la amígdala, los núcleos basales, el tálamo anterior, el locus coeruleus y los núcleos del rafe (Jucker et al., 2006), quedando afectados diversos circuitos cerebrales.

1.2.3.1. Patología amiloide

A pesar de que la presencia de placas seniles fue descrita a principios de siglo por Alzheimer (1907), no fue hasta mediados de los años 80 cuando se descubrió que el componente principal de estas placas extracelulares es el péptido $A\beta$ (Selkoe et al., 1986). Por tanto, las placas seniles están compuestas de agregados del péptido $A\beta$ extracelular. En condiciones no patológicas, $A\beta$ está involucrado en procesos de metabolismo celular y actividad sináptica, siendo degradado por ciertas peptidasas en su forma soluble, y puede ser internali-

zado y degradado por la acción de la microglía (Shoji et al., 1992; Carson y Turner, 2002). Según la teoría de la cascada amiloide, en la EA, existiría un desajuste entre la cantidad de péptido A β que se produce y la que se degrada, produciéndose un aumento de la misma en el espacio extracelular lo que conduciría a su agregación patológica (Hardy y Higgins, 1992).

Las placas inmunorreactivas para A β (A β _{ir}) están compuestas principalmente por fibras de A β , axones y dendritas que han degenerado, pero también por fibras de proteína tau (Su et al., 1996). Su morfología no presenta un patrón definido, aunque se ha propuesto una clasificación que engloba placas difusas, compactas y con un núcleo claramente definido, así como placas distróficas (García-Marín et al., 2007; **Figura 4**). Se ha observado que las placas A β _{ir} en contacto con las neuronas producen alteraciones morfológicas locales en las dendritas de estas neuronas (Spires et al., 2005; Knafo et al., 2009a, b), incidiendo así en la transmisión sináptica y alterando la transmisión de la información (revisado en Guo y Lee, 2014). Además, la presencia de placas A β _{ir} se ve incrementada durante el curso de la enfermedad en el espacio extracelular: desde regiones isocorticales en fases iniciales de la EA, hacia regiones límbicas en la fase moderada, alcanzando áreas subcorticales en las fases tardías de la enfermedad, y expandiéndose por toda la corteza en fases avanzadas de la EA (**Figura 1**; Thal et al. 2006).

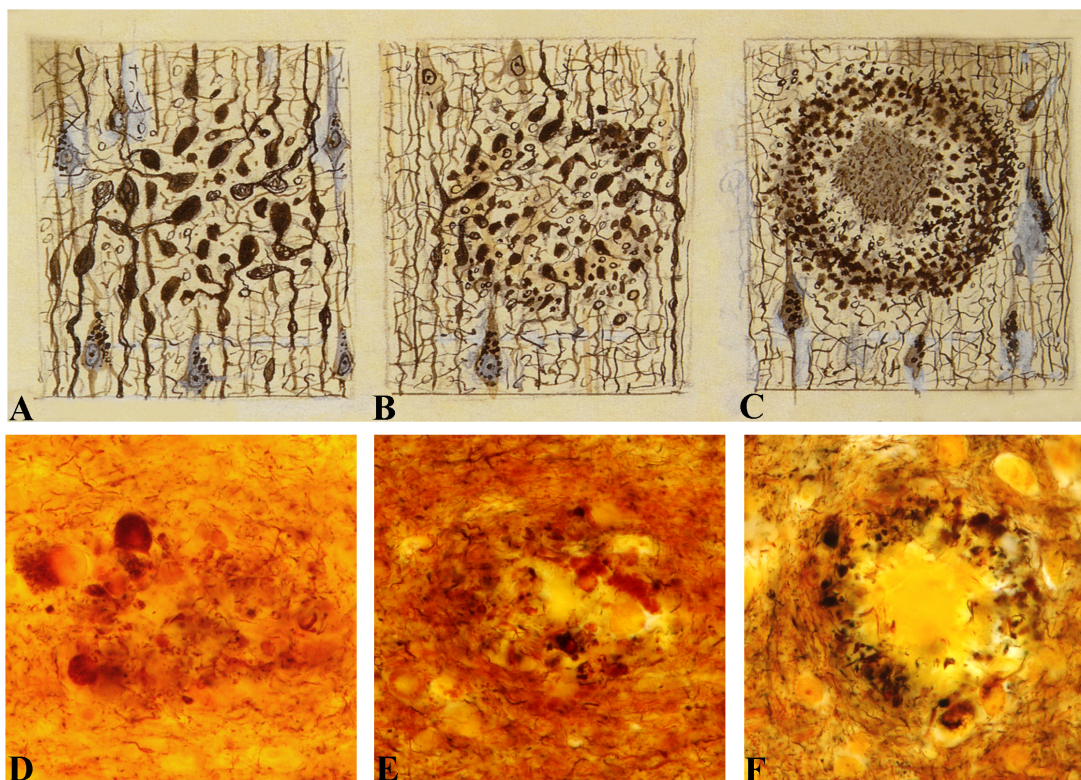


Figura 4. Dibujos originales realizados por Santiago Ramón y Cajal, para ilustrar distintos tipos de placas (A-C) y preparaciones de tejido cerebral teñidas con el método de nitrato de plata reducido (D-F). Tomado de García-Marín et al., 2007.

1.2.3.2. Patología neurofibrilar

Como ya se ha mencionado, otra de las principales características de la EA es la presencia de ovillos neurofibrilares. Estos ovillos están constituidos por la proteína tau hiperfosforilada que forman los filamentos pareados helicoidales (PHF_{Tau}) en el interior de las neuronas (Grundke-Iqbal et al., 1986; revisado en Ávila, 2004). La proteína tau, en condiciones no patológicas, es una proteína citosólica principalmente localizada en los axones de las neuronas, y realiza funciones de ensamblaje axonal, modulando la dinámica de los microtúbulos, y afectando directamente a la estructura y funcionamiento neuronal (Goode & Feinstein, 1994; Johnson, 2006).

En la EA, la proteína tau se hiperfosforila, es decir, existe un aumento de los grupos fosfato en la cadena de aminoácidos de la proteína. Esta alteración conlleva el desprendimiento de la proteína tau de los microtúbulos, desestabilizando la estructura de la neurona y desajustando su funcionamiento normal. La acumulación de PHF_{Tau} en el interior neuronal ocurre de forma gradual (Merino-Serrais et al., 2013). Se han descrito alteraciones en el cuerpo neuronal según avanza la patología neurofibrilar, produciendo una degeneración de las dendritas y axones (neuritas distróficas), así como un deterioro del núcleo y, finalmente, la muerte neuronal. Se ha propuesto que el estadio final de la formación de ovillos correspondería a las neuronas que han perdido sus funcionalidades por completo (Braak et al., 1994), denominándose “ovillos fantasma” (del inglés, *ghost tangles*).

La distribución de los ovillos neurofibrilares en el cerebro también ocurre de manera gradual, acumulándose primero en áreas temporales y mesiales (corteza transentorrinal; estadio I-II), sistema límbico (estadio III-IV) y, finalmente, en regiones isocorticales (estadio V-VI) (**Figura 5**; Braak y Braak, 1991).

Se desconocen los mecanismos exactos que producen la hiperfosforilación de tau (Ávila, 2004), así como la posible relación entre distintos marcadores de PHF_{Tau} y el estadio de la enfermedad. Para visualizar la proteína PHF_{Tau} en tejido cerebral humano de pacientes con EA, se utilizan principalmente dos anticuerpos, PHF_{Tau-AT8} y PHF_{Tau-pS396} (Godert et al., 1995; Duyckaerts et al., 2009), que presentan diferencias en su expresión en relación a la progresión de la enfermedad (Su et al., 1996; Mondragón-Rodríguez et al., 2013). El anticuerpo PHF_{Tau-AT8} (reconoce la hiperfosforilación en las posiciones Ser202 y Thr205) se emplea en la clasificación de la degeneración neurofibrilar (estadios de Braak; Braak y Braak, 1991), mientras que el anticuerpo PHF_{Tau-pS396} (reconoce la fosforilación en Ser396) se observa en numerosos ovillos neurofibrilares en estadios tardíos de la enfermedad (Kimura et al., 1996).

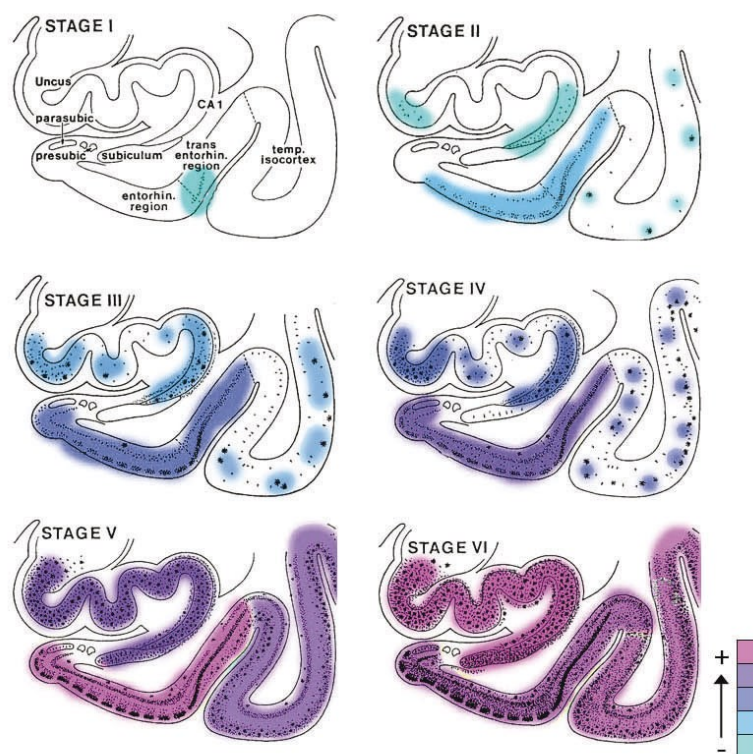


Figura 5. Esquema de los cambios neurofibrilares observados en la formación del hipocampo y en la neocorteza temporal adyacente. Nótese la evolución desde el estadio I hasta estadio VI. Modificada de Braak y Braak (1995).

1.2.3.3. Relación entre la patología amiloide y la patología neurofibrilar

Actualmente, uno de los temas más controvertidos en la EA es establecer si $A\beta$ y PHF_{Tau} , por sí mismos, o su interacción, correlacionan con el progreso de la enfermedad (Bloom, 2014; Nelson et al., 2012), ya que hay evidencias de que la patología amiloide puede preceder a la neurofibrilar y viceversa (Price y Morris, 2004).

La acumulación de placas $A\beta_{ir}$ por sí sola no parece correlacionar con el deterioro cognitivo de pacientes con EA, ya que un gran número de individuos sin síntomas asociados muestran acumulaciones de $A\beta$ en sus cerebros (Giannakopoulos et al., 2003; Ingelsson et al., 2004; revisado en Ferrer, 2012 y Kametani y Hasegawa, 2018). Sin embargo, la presencia de PHF_{Tau} sí se ha relacionado con el deterioro cognitivo en la EA (Nelson et al., 2012), y hay evidencias de que produce cambios en la microanatomía de las neuronas piramidales (Merino-Serrais et al., 2011), neurodegeneración (Spires-Jones y Hyman, 2014), así como alteraciones en la actividad mitocondrial y el transporte axonal, haciendo a las neuronas más vulnerables a la proteína $A\beta$ (Ittner y Götz, 2011). Pese a ello, la presencia de PHF_{Tau} no implica necesariamente la muerte neuronal, pues las neuronas cuentan con mecanismos de protección celular que intentan evitar la formación de ovillos PHF_{Tau} (Iqbal et al., 2008). Por

tanto, se desconoce hasta qué punto la presencia de proteína tau hiperfosforilada produce los signos de demencia por sí sola (Andrade-Moraes et al. 2013).

En resumen, a pesar de que aún se desconoce qué proteína promueve la degeneración, ambas patologías podrían actuar de manera conjunta, produciendo incluso una potenciación de la acción de cada una por separado (Spires-Jones y Hyman, 2014; Polanco et al., 2017; Bennett et al., 2017).

1.2.3.4. Otras patologías asociadas a la enfermedad de Alzheimer

Las patologías amiloide y neurofibrilar no son las únicas alteraciones que se observan en los cerebros de los pacientes con EA. Entre los cambios descritos se encuentran la pérdida neuronal, principalmente en la corteza entorrinal (CE) y en algunas regiones del hipocampo (Gomez-Isla et al., 1996, 1997). En algunos casos la pérdida neuronal masiva de la región CA1 del hipocampo, da lugar a una esclerosis del hipocampo, una patología que se ha relacionado con la EA (Kawas et al., 2015; Ihara et al., 2018). Asimismo, se han encontrado diversas alteraciones sinápticas que varían según la región, y que incluyen una disminución en el número de sinapsis, así como otras alteraciones sinápticas (revisado en Blazquez-Llorca, 2010). También, se ha descrito una alteración de la proteína de unión al ADN TDP-43, así como la presencia de otros agregados como α -sinucleína (revisado en Robinson, 2018).

Es decir, la concurrencia de otras alteraciones histopatológicas puede producir mecanismos de potenciación que afecten el curso de la enfermedad (Jucker y Walker, 2013).

1.3. Formación del hipocampo

La formación del hipocampo se sitúa en la cara medial del lóbulo temporal, adyacente al asta ventral del ventrículo lateral (**Figura 6A**) y en general hace referencia al conjunto formado por el giro dentado (GD), el hipocampo propio y el complejo subicular. Sin embargo, ciertos autores incluyen también a la CE por su estrecha relación funcional con el resto de las estructuras hipocampales (Amaral y Insausti, 1990; Duvernoy, 1998).

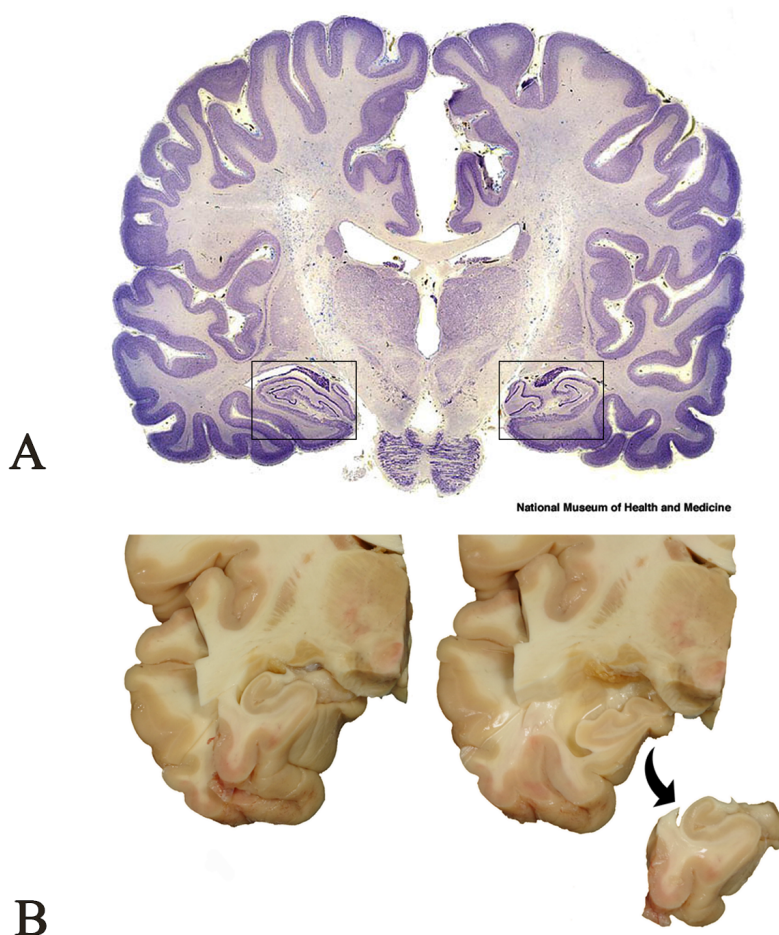


Figura 6. A: Fotografía panorámica de un corte coronal de cerebro humano teñido con el método de Nissl. Los recuadros indican la ubicación de la formación del hipocampo. Imagen tomada del National Museum of Health and Medicine. B: dos cortes coronales que muestran la ubicación del hipocampo, así como su formación antero-posteriormente.

Como se ha mencionado anteriormente, los estadios iniciales de la EA se caracterizan por una pérdida de contexto, desorientación y deterioro de la memoria episódica o autobiográfica. Estos síntomas correlacionan con funciones específicas de la formación del hipocampo (Olton et al., 1978), ya que el hipocampo posee neuronas que codifican secuencias de eventos relacionados con la memoria autobiográfica (Eichenbaum et al., 1999), dando lugar a un mapa cognitivo, es decir, a una representación del mundo que nos rodea (O'Keefe y Nadel, 1978). Scoville y Milner (1957), en sus estudios con pacientes sometidos a neurocirugía, confirmaron que el hipocampo es crucial en la formación de nuevas memorias.

En el hipocampo converge información procedente de áreas de asociación y de la corteza frontal, de la amígdala, del tálamo y del hipotálamo, convirtiéndose en el lugar donde se almacena información relacionada con la memoria semántica (conceptos; Manns et al., 2003), memoria autobiográfica (eventos personales y la relación entre ellos; Tulving y Markowitsch; 1998; Cabeza y St Jacques, 2007) y memoria espacial (orientación y reconocimiento; Shrager et al., 2007).

En pacientes con EA, se postula que el fallo en la transmisión de la información se originaría en la corteza entorrinal, concretamente la región transentorrinal, y alteraría la funcionalidad de las regiones del hipocampo con las que está fuertemente interconectada (Braak y Braak, 1991; Braak y Tredici, 2012; Schultz, et al., 2015).

1.3.1. Organización citoarquitectónica y laminar

La formación del hipocampo presenta una gran complejidad, tanto en términos de conectividad local y cortical como en términos anatómicos (Burgess et al., 2002), siendo heterogéneo en su distribución medio-lateral (**Figura 6B**).

Citoarquitectónicamente, la formación del hipocampo está compuesta por distintas regiones (Insauti y Amaral, 2004). El GD, el hipocampo propio, y el subículo, corresponden al tipo arquitectónico de allocorteza, mientras que el presubículo, el parasubículo, y la CE corresponden a mesocorteza.

1.3.1.1. Giro dentado

El GD es una región trilaminada que contiene las siguientes capas: capa molecular, capa granular y capa polimórfica (**Figura 7**; Amaral y Lavenex, 2007). Las principales células que se encuentran en el GD son las células granulares, formando una capa en forma de V o de U, denominada capa granular (**Figura 7A**). Esta capa es la principal capa celular del GD, está compuesta principalmente por los somas de las células granulares, cuyo árbol dendrítico se sitúa en la capa molecular (localizada sobre la capa granular) donde comienza a bifurcarse. La capa molecular alberga las fibras aferentes procedentes de otras regiones (como las proyecciones de la CE), así como los axones de las interneuronas que se ubican a lo largo de la capa granular. La capa polimórfica (denominada también hilus) contiene las células polimórficas y las fibras musgosas (Ramón y Cajal, 1984) que provienen de las células granulares. Las fibras musgosas forman sinapsis con las células polimórficas de esta capa, así como con las células piramidales de la región CA3 (revisado en Amaral y Lavenex, 2007). Asimismo, la capa polimórfica también contiene fibras aferentes de otras regiones. Por último, en la parte inferior de la capa granular se encuentra la zona subgranular, región donde tiene lugar el proceso de neurogénesis adulta (Eriksson et al. (1998).

1.3.1.2. Campos amónicos

Desde el punto de vista anatómico, la nomenclatura de Lorente de Nó (1934) divide el hipocampo propio en los campos CA1, CA2, CA3 y CA4. Las neuronas del asta de Amón comprendidas dentro de la concavidad de la capa de células granulares del GD constituyen el campo CA4, sin embargo, tal y como apuntaron Insausti y Amaral (2004), el término CA4 es confuso, pues en ocasiones se aplica bien a la capa polimórfica (hilus) del GD, o bien a la porción insertada dentro de la capa de células piramidales de CA3. Además, las características citoarquitectónicas no están claramente definidas, así como tampoco está definida una clara conectividad que sirva para distinguir la capa piramidal de las neuronas de CA3 de las de CA4. Por lo tanto, siguiendo la nomenclatura de Insausti y Amaral (2004), en el presente trabajo se usará el término CA3 para referirse a estos campos.

De manera general, CA2 está formada por neuronas piramidales grandes y densamente empaquetadas, mientras que CA1 empieza a aparecer cuando la capa piramidal comienza a ensancharse y los cuerpos de las neuronas están más separados entre sí. CA3, ubicado entre la capa inferior del giro dentado y el hilus, posee en general numerosas células relativamente grandes.

Los campos amónicos (CAs) varían rostrocaudalmente en su estructura, dificultando a veces su división anatómica. A nivel citoarquitectónico, se distinguen los siguientes estratos: *lacunosum-moleculare*, *radiatum*, *pyramidale*, y *oriens*. El principal componente neuronal del estrato *pyramidale* son los somas de las células piramidales. Tanto las dendritas apicales como las dendritas basales de las neuronas piramidales se encuentran en el estrato *pyramidale*, aunque algunas dendritas apicales alcanzan el estrato *lacunosum-moleculare* (**Figuras 7B**). El hecho de que las dendritas apicales (con sus colaterales) y las dendritas basales estén entremezcladas en la capa piramidal es una diferencia importante del hipocampo humano con respecto a la organización de las células piramidales en roedores y otras especies (Benavides-Piccione et al., 2019).

Los axones de las células piramidales del hipocampo atraviesan el estrato *oriens*, y llegan al alveus (sustancia blanca), donde forman la fimbria que, a su vez, representa el inicio del fórnix. Esta vía representa la principal vía de eferencias del hipocampo (Stanfield y Cowan, 1988; Cooper y Lowenstein, 2002).

1.3.1.3. Subículo

El subículo es una zona de transición entre el hipocampo propio y la CE y forma parte del complejo subicular, junto con el presubículo y el parasubículo, y sus principales elemen-

tos son las células piramidales. Está formado por tres capas: la capa molecular (la más superficial), compuesta principalmente por fibras y por las dendritas apicales de las células piramidales, la capa piramidal, que a su vez posee dos láminas (interna o profunda cerca del estrato *oriens*, y externa o superficial cerca del estrato *radiatum*), y la capa polimórfica, limitando con la sustancia blanca, formada por células piramidales más pequeñas, (**Figura 7**). La capa piramidal externa contiene agrupaciones pequeñas de células piramidales, diferenciándose así de CA1. En general, la capa piramidal profunda posee células piramidales de gran tamaño, cuyas dendritas apicales se extienden a la capa molecular, y sus dendritas basales se distribuyen en las porciones más profundas de la capa piramidal (O'Mara, 2005).

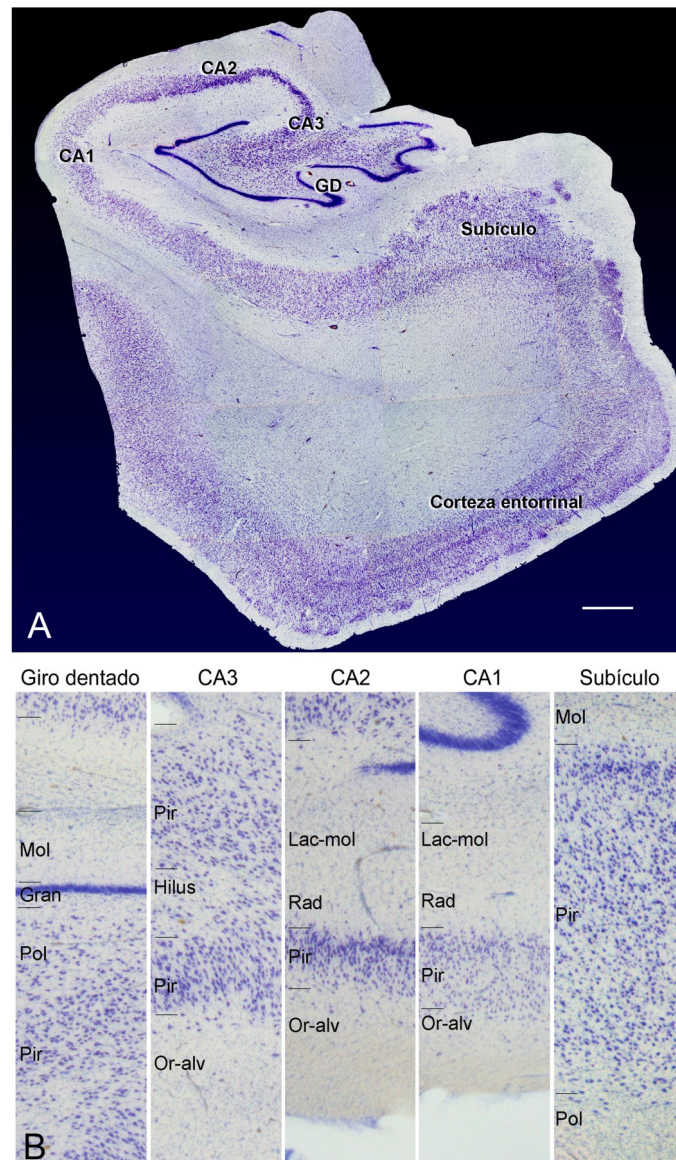


Figura 7. A: Formación del hipocampo humano de una sección teñida con el método de Nissl. B: Microfotografías que muestran las características citoarquitectónicas de las diferentes regiones de la formación del hipocampo. GD: giro dentado; CA1-3: campos amónicos. Mol: capa molecular; Gran: capa granular; Pol: capa polimórfica; Lac-mol: estrato *lacunosum-moleculare*; Rad: estrato radiatum; Pir: estrato piramidal; Or-alv: estratos oriens y alveus. Barra de escala 1200 μm (en A); 320 μm (en B). Modificada de DeFelipe et al. (2007).

1.3.2. Circuitos hipocampales

La información disponible en la literatura científica sobre estos circuitos procede mayoritariamente de estudios realizados en rata, gato y mono (Witter et al., 1989), debido a que no hay métodos adecuados para el estudio del tejido humano postmortem.

Las aferencias y eferencias del hipocampo son muy amplias y diversas (Insausti y Amaral 2004; Dickerson & Eichenbaum, 2010), tal y como se muestra en la **Figura 8**. Brevemente, la entrada de información cortical es la principal aferencia que llega al hipocampo a través de la corteza entorrinal (CE) que, a su vez, recibe aferencias desde diversas regiones del sistema límbico y áreas de asociación, siendo además estas conexiones recíprocas (Amaral & Witter, 1989; Amaral & Insausti, 1990). Además, el hipocampo recibe numerosas aferencias de origen subcortical, incluyendo las de la amígdala, claustrum, el complejo septal, el área supramamilar y varios núcleos talámicos, mientras que emite sus proyecciones a una gran variedad de regiones corticales y subcorticales (Lavenex y Amaral, 2000). Una vez que la información llega al hipocampo, ésta se propaga entre sus distintas regiones a través de conexiones locales. La principal característica de las conexiones intrínsecas del hipocampo es que el circuito es unidireccional, es decir, desde el GD la excitación neuronal sigue una vía unidireccional (Amaral & Insausti, 1990; Eichenbaum, 2000; revisado por Dickerson & Eichenbaum, 2010), proyectándose la información hacia CA3, CA2 y CA1, principalmente (Insausti & Amaral, 2004), donde, a su vez, la mayor parte de las proyecciones de CA1 van hacia el subículo (Amaral et al., 1991).

Como se ha mencionado, la CE representa la principal entrada de información al hipocampo a través de la vía perforante (Witter y Amaral, 1991; revisado en Knierim, 2015) que, a su vez, puede subdividirse en vía perforante lateral y vía perforante medial. Las células de la capa II de la CE lateral se proyectan hacia la parte externa de la capa molecular del GD y hacia la mitad externa del estrato *lacunosum-moleculare* de la región CA3, mientras que la capa II de la CE medial establece conexiones con la parte media del GD y la mitad interna del estrato *lacunosum-moleculare* de CA3. Por otro lado, las neuronas de la capa III de la CE lateral proyectan a la parte distal de CA1 y la parte proximal del subículo, mientras que, la capa III de la CE medial conecta con la parte proximal de CA1 y distal del subículo. En términos generales, el circuito trisináptico (EC → DG → CA3 → CA1; **Figura 8**) representa la entrada principal de estímulos al hipocampo a través de las proyecciones procedentes de la CE.

El GD no proyecta fuera de la formación del hipocampo, sino que envía sus axones de forma recurrente a las neuronas del GD y CA3 en una vía unidireccional (revisado en Insausti y Amaral, 2012). CA3 recibe proyecciones del GD a través de las fibras musgosas, y

proyecta hacia CA1 (a través de las colaterales de Schaeffer), a otras regiones subcorticales, y recurrentemente a CA3 (Neher et al., 2015).

CA1 recibe aferencias de CA3 a través de las colaterales de Schaeffer formando sinapsis en las dendritas apicales y basales de las células piramidales de CA1, pero también de la CE por una vía directa monosináptica (Cohen y Squire, 1980; revisado en Llorens-Martín et al., 2014 y Knierim, 2015). A su vez, CA1 proyecta predominantemente al subículo y a la CE (Finch y Babb, 1981; Finch et al., 1983), pero también recibe aferencias de múltiples regiones corticales y subcorticales, incluyendo los cuerpos submamilares, núcleos del tálamo y el septum, entre otras regiones (revisado en Buhl & Whittington, 2009), convirtiéndose en una región de intercambio continuo de información. Finalmente, el subículo proyecta al parasubículo y desde ahí a la CE (Witter et al., 2000; Insausti y Amaral, 2004; Witter, 2007; revisado en Blazquez-Llorca, 2010).

En estudios realizados en ratones, se ha descrito que la región CA2 recibe aferencias del GD y, a su vez, conecta con CA3 y CA1. (Kohara et al., 2014), y se ha propuesto que CA2 está involucrado en un circuito trisináptico diferente al de la vía perforante. Sin embargo, en el hipocampo humano, aún está pendiente de esclarecer tanto su organización como su función.

Sin embargo, las conexiones del hipocampo varían a lo largo de su eje longitudinal. Además, se han atribuido funciones específicas a su región dorsal (o posterior) y a su región ventral (o anterior) que podrían verse afectados de manera diferencial durante el proceso de envejecimiento (Stark et al., 2019). En general, la región posterior estaría implicada en la navegación espacial y memoria, mientras que la región anterior del hipocampo se encargaría también del procesamiento emocional (revisado en Zeidman y Maguire, 2016). Sin embargo, estudios realizados con herramientas genéticas (Thomson et al., 2008) y registros electrofisiológicos en roedores (Killian et al., 2012), así como la aplicación de técnicas de neuroimagen en humanos (Small et al., 2001), han sugerido que el papel funcional del hipocampo puede ser mucho más complejo, ya que establece múltiples conexiones entre dominios específicos de sus propias regiones y a lo largo de todo el eje hipocampal (revisado en Strange et al., 2014). Por tanto, se ha sugerido revisar el modelo de dicotomía funcional anteroposterior y reemplazarlo por un modelo de funcionalidades superpuestas con el fin de esclarecer los mecanismos neuronales implicados en funciones específicas, como el almacenamiento y recuperación de la memoria espacial en humanos (revisado en Strange et al., 2014; Zeidman y Maguire, 2016).

rior unión al receptor postsináptico e internalización (revisado en Mohamed et al., 2013). Posteriormente, cuando ésta empieza a acumularse en el compartimento somatodendrítico, se liberaría, contribuyendo a la propagación. Se ha descrito que la transmisión de proteínas tóxicas a través de las sinapsis ocurría tanto en el caso de la proteína tau, como en el de la proteína β -amiloide (Guo & Lee, 2014).

Además, los síntomas relativos a los primeros estadios de la EA se correlacionan con las áreas hipocampales, por tanto, es relevante entender la relación entre las características histopatológicas de las distintas regiones del hipocampo y la posible implicación en los circuitos intra- y extra-hipocampales.

Se postula que la vía más susceptible de sufrir degeneración es la trisináptica, siendo CA1 la región con mayor daño neuronal por las numerosas células piramidales que presenta (Llorens-Martín et al., 2014). Otros estudios mostraron que las lesiones en esta región serían razón suficiente para producir un déficit de memoria (Zola-Morgan et al., 1986), pues se trata de una región muy vulnerable a los cambios metabólicos (revisado en Bartch & Wulff, 2015). El circuito trisináptico se ha relacionado con la adquisición de nuevas memorias (Cohen y Squire, 1980), es decir, la distinción entre objetos nuevos y otros previamente almacenados (Dillon et al., 2017), donde la separación de patrones está funcionalmente localizada en el GD (Dillon et al., 2017). Esta función la lleva a cabo gracias a una continua comunicación con CA3 (Suwabe et al., 2018) que, a su vez, tiene un papel específico en la asociación de objetos en el tiempo. Por otro lado, la región CA1 se ve involucrada en recuperación de memoria autobiográfica y consolidación de nuevas memorias (Cherubini y Miles, 2015). CA1 es una región crítica para el procesamiento de información espacial, así como para el aprendizaje y la memoria (Henriksen et al., 2010; Nakazawa et al., 2016). Finalmente, el subículo es un área importante en la transmisión de la información hacia otras regiones corticales (O'Mara, 2005, 2006); la información que se procesa en el hipocampo sale hacia el neocórtex desde el subículo, convirtiéndose así en una región muy relevante para el intercambio de información con el resto de la corteza cerebral.

Las descripciones sobre la funcionalidad de CA2 son escasas, pero se le han atribuido funciones mnésicas sociales específicas y, a nivel molecular, se ha observado, en pacientes con esquizofrenia, una fuerte acción estrógena ligada a la actividad de las interneuronas (revisado en Chevaleyre y Piskorowski, 2016), sugiriendo la existencia de mecanismos protectores frente a la degeneración en cerebros de mujeres. Hay evidencias que sustentan la idea de que la región CA2 actúa modulando la actividad normal dentro de la red hipocampal, estableciendo conexiones sólidas, especialmente con el GD, pero también con CA3 y las capas profundas de CA1 (Keigo et al., 2014; Boehringer et al., 2017). Por tanto, CA2

soporta muchas funciones fisiológicas (revisado en Robert et al., 2018), pero su posible atrofia o pérdida neuronal en la EA no están claramente establecidas (West et al., 1994; Zarow et al., 2007; revisado en deFlores et al., 2015), probablemente debido a diferencias en los protocolos o el procesamiento de las muestras.

1.4. Estudio de la enfermedad de Alzheimer: análisis multidimensional

Los modelos animales han facilitado una mejor comprensión de la enfermedad, aislando o sobreexpresando las proteínas A β o PHF_{Tau}, con el fin de observar únicamente su vía de actuación, modulación e interacción con otros componentes y procesos cerebrales. Sin embargo, en la EA, los modelos animales pueden ofrecer una visión limitada de la complejidad de la patología, obviando factores cognitivos, psicológicos y sociales que se presentan en un paciente con esta enfermedad. La enorme variabilidad interindividual de los pacientes con EA hace muy difícil extraer conclusiones válidas sobre la enfermedad y sus implicaciones. Asimismo, se ha planteado la posibilidad de que sea la proteína A β el principal desencadenante de la EA, orientándose todos los ensayos clínicos en eliminar su agregación, pero las evidencias científicas indican que ni esta proteína, ni la presencia de ovillos neurofibrilares son exclusivos de la EA, sino que representan un factor de riesgo cuya presencia puede, o no, dar lugar a la fase sintomática (revisado en Morris et al., 2018). Además, se han observado cerebros con patología amiloide y/o neurofibrilar, pero sin síntomas clínicos, así como pacientes diagnosticados con EA sin rastro de proteína A β en el análisis post-mortem (Ferrer, 2012; revisado en Morris et al., 2018). Por tanto, la EA se empieza a concebir como una enfermedad mucho más compleja que la mera presencia y/o interacción de las proteínas A β y tau.

Por otro lado, la investigación en la EA genera una gran cantidad de datos que, generalmente, resulta difícil de analizar, principalmente por la falta de herramientas que evalúen de manera conjunta los hallazgos obtenidos desde distintos campos. La EA, así como otras enfermedades neurodegenerativas, necesitan estar vinculadas a nuevas herramientas de investigación que permitan un análisis multivariado y multidisciplinar, con el fin de encontrar patrones de expresión, alteración e interacción proteicas, ligados a la mayor cantidad posible de información procedente de los sujetos, como la información clínica, psicológica y social.

Para ello, es necesario el desarrollo de herramientas de exploración y de visualización de conjuntos de datos multidimensionales que permitan, no solo almacenar información, sino también analizarla en todos sus niveles. El análisis exploratorio de datos se refiere a un conjunto de técnicas desarrolladas para mostrar datos de tal manera que las características que podrían considerarse particularmente relevantes para un determinado análisis se vuelvan evidentes. Los métodos tradicionales requieren que se proponga la hipótesis antes de adqui-

rir los datos, sin embargo, esta utilidad de los análisis exploratorios proporciona al usuario un punto de vista diferente y dinámico, ayudándole a decidir el tipo de análisis que se realizará u ofreciendo la posibilidad de proponer nuevas hipótesis.

Los estudios sobre EA han generado bases de datos muy grandes y complejos y, por consiguiente, difíciles de manejar e interpretar. Las técnicas de análisis convencionales resultan insuficientes, siendo cada vez más necesario utilizar recursos que permitan otro tipo de análisis. Es decir, disponer de herramientas capaces de reunir información procedente de diversas disciplinas con el fin de analizar los datos de manera conjunta. Esta necesidad, evidente en el estudio de la EA, se hace visible en otras muchas áreas de la investigación biomédica que implican estudios multidisciplinares.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis doctoral es analizar las alteraciones histopatológicas en la formación del hipocampo de pacientes EA. Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio de las densidades neuronales en el hipocampo de pacientes con EA:

1.1. Cuantificación de las densidades neuronales en distintas regiones hipocampales (CA1-CA3 y subículo) mediante estimaciones estereológicas en secciones marcadas con el método de Nissl y con un anticuerpo específico para visualizar neuronas (NeuN).

2. Análisis de la patología neurofibrilar en el hipocampo de pacientes con EA:

2.1. Estimación de la densidad de las neuronas con marcaje neurofibrilar en diferentes regiones del hipocampo (GD, CA1-CA3, subículo) mediante técnicas de inmunohistoquímica simple con anticuerpos frente a dos isoformas de PHF_{Tau} (PHF_{Tau-AT8}/PHF_{Tau-pS396}).

2.2. Caracterización y distribución de neuronas marcadas con doble inmunofluorescencia frente a PHF_{Tau-AT8}/PHF_{Tau-pS396}.

3. Análisis de la patología amiloide en el hipocampo de pacientes con EA:

3.1. Estimación de la densidad de placas marcadas con anticuerpo frente a A β mediante inmunohistoquímica simple en diferentes regiones del hipocampo (GD, CA1-CA3, subículo).

3.2. Análisis del volumen ocupado por las placas A β _{ir}, así como de las dimensiones de las placas mediante inmunohistoquímica simple en cada una de las regiones (GD, CA1-CA3, subículo).

3.3. Caracterización y distribución de placas marcadas con doble inmunofluorescencia A β /PHF_{Tau-AT8}, A β /PHF_{Tau-pS396} y PHF_{Tau-AT8}/PHF_{Tau-pS396} en la región CA1.

3.4. Cuantificación y caracterización de los tipos de placas mediante triple marcaje inmunofluorescente para Methoxy-X04/anti-PHF_{Tau-AT8}/anti-PHF_{Tau-pS396}.

4. Desarrollo y validación de una herramienta exploratoria de visualización de datos multi-dimensionales: InTool Explorer y su aplicación para estudiar la posible relación entre la patología neurofibrilar, la patología amiloide, y la densidad neuronal, así como con las variables técnicas, clínicas y demográficas de los pacientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Obtención y procesamiento del tejido cerebral humano

El tejido cerebral humano utilizado fue obtenido de autopsias procedentes de pacientes con la EA y de casos sin enfermedades neurológicas. También se utilizaron muestras de tejido cerebral postoperatorio obtenido del tratamiento quirúrgico de 7 pacientes con epilepsia del lóbulo temporal (ETL) farmacorresistente (**Tabla 3**).

El tejido humano procedente de pacientes con EA se obtuvo de 11 casos (cuyos tiempos postmortem fueron entre 2h - 5:30h; y edades comprendidas entre 76 y 95 años, en el momento del fallecimiento; **Tabla 3**). El tejido de estos pacientes fue evaluado para su diagnóstico mediante el análisis neuropatológico establecido por Braak y Braak (1991) y CERAD (Mirra et al., 1991). Estos 11 casos fueron obtenidos de dos fuentes distintas: Banc de Teixits Neurologics del Hospital Universitari Clínic de Barcelona (Dr. I. Ferrer, Servicio de Anatomía Patológica, IBIDELL-Hospital Universitario de Bellvitge, Barcelona, España) y del Banco de Tejidos Fundación CIEN (Dr. A. Rábano, Área de Neuropatología, Centro Alzheimer, Fundación Reina Sofía, Madrid, España). En todos los casos, las muestras se procesaron siguiendo las indicaciones de la Declaración de Helsinki (WMA, 2013) y con la aprobación del Comité Ético local.

Estos bloques de tejido fueron fijados por inmersión en una solución de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB) 0.1M con pH 7.4, durante 24h a 4°C. Posteriormente, fueron crioprotegidos en una solución de sacarosa al 30% durante, al menos, 24h para, finalmente, ultracongelarlos a -80°C. Los bloques que contenían el hipocampo se cortaron con un microtomo de deslizamiento (Thermo Fischer Scientific, MICROM, HM450; unidad de congelación, KS34, Massachusetts, EEUU), a -40°, en secciones seriadas coronales de 50µm de grosor, y recogidas en PB 0.1M para su posterior procesamiento.

El tejido de autopsias sin demencia se obtuvo de 3 casos (rango de edad 49-69 años; **Tabla 3**) sin enfermedades neurológicas (supervisado por el Dr. R. Alcaraz, Servicio de Patología Forense, Instituto Vasco de Medicina Legal, Bilbao, España).

El tejido postoperatorio se obtuvo de 7 pacientes sin demencia (3 mujeres, 4 hombres y rango de edad 21-45 años; **Tabla 3**) que sufrían epilepsia del lóbulo temporal farmacorresistente (Andrioli et al., 2017; Alonso-Nanclares et al., 2011). Los pacientes epilépticos fueron evaluados en el Hospital la Princesa (Madrid, España), tal y como se describe en Sola et al., (2005). En todos los casos se obtuvo un consentimiento informado de todos los participantes de acuerdo con la Declaración de Helsinki (WMA, 2013), y todos los protocolos recibieron una aprobación del Comité Ético del Hospital la Princesa. La resección de la corteza

temporal y del área amígdalo-hipocampal se realizó según el método quirúrgico descrito por Spencer y Engel (1998).

Tanto en el tejido procedente de autopsias controles como en las biopsias de pacientes epilépticos, los bloques que contenían la formación del hipocampo se sumergieron en una solución de paraformaldehído al 4% en PB 0.1M con pH 7.4 a 4°C durante 24-36h para su fijación. Posteriormente, fueron cortados en secciones coronales de 50µm de grosor mediante un vibratomo. Tanto en las autopsias consideradas controles como en las biopsias de tejido postoperatorio, se realizaron análisis histológicos que no mostraron alteraciones patológicas en el hipocampo.

3.2. Microscopía óptica: histología e inmunohistoquímica

Para obtener una visualización de los límites anatómicos y de las áreas hipocampales de interés se utilizaron secciones teñidas con el método de Nissl (azul de toluidina), una técnica histológica que permite la visualización tanto de neuronas como de células gliales (**Figura 9B**).

Además, para estimar las densidades neuronales se utilizaron secciones marcadas utilizando el anticuerpo NeuN y la tinción de Nissl (**Figura 9B**), así como secciones marcadas con dos anticuerpos diferentes frente a la proteína PHF_{Tau} (PHF_{Tau-AT8} y PHF_{Tau-396}; **Figura 9C, D**).

3.2.1. Inmunohistoquímica convencional

Las secciones seleccionadas para inmunohistoquímica fueron pretratadas en una solución que contenía H₂O₂ al 2% durante 30 minutos para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. Posteriormente, con el fin de mejorar la penetración del anticuerpo, fueron sumergidas en una solución con Triton-X (Merck, Darmstadt, Alemania) al 0.25% y 3% suero de cabra o caballo en PB 0.1M (según se utilicen anticuerpos policlonales o monoclonales, respectivamente; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). A continuación, las secciones fueron incubadas durante 48h a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo monoclonal de ratón anti-NeuN (1:2000; Chemicon; MAB377, Temecula, CA, EEUU), anticuerpo monoclonal de ratón anti-PHF_{Tau-AT8} (1:2000, MN1020, Thermo Scientific, Waltham, MA, EEUU) y anticuerpo policlonal de conejo anti-PHF_{Tau-pS396} (1:2000, Invitrogen Corp, 44752G, Carlsbad, CA, EEUU). Para marcar las placas β-amiloide las secciones fueron previamente tratadas con ácido fórmico al 88% (Sigma-Aldrich, No. 251364, St. Louis, MO, EEUU), y posteriormente se incubaron con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Aβ (clone 6F/3D, 1:50, Dako M0872, Glostrup, Dinamarca; **Figura 9E**). Posteriormente, las secciones se incubaron durante 1h con anticuerpos secundarios biotinilados específicos para

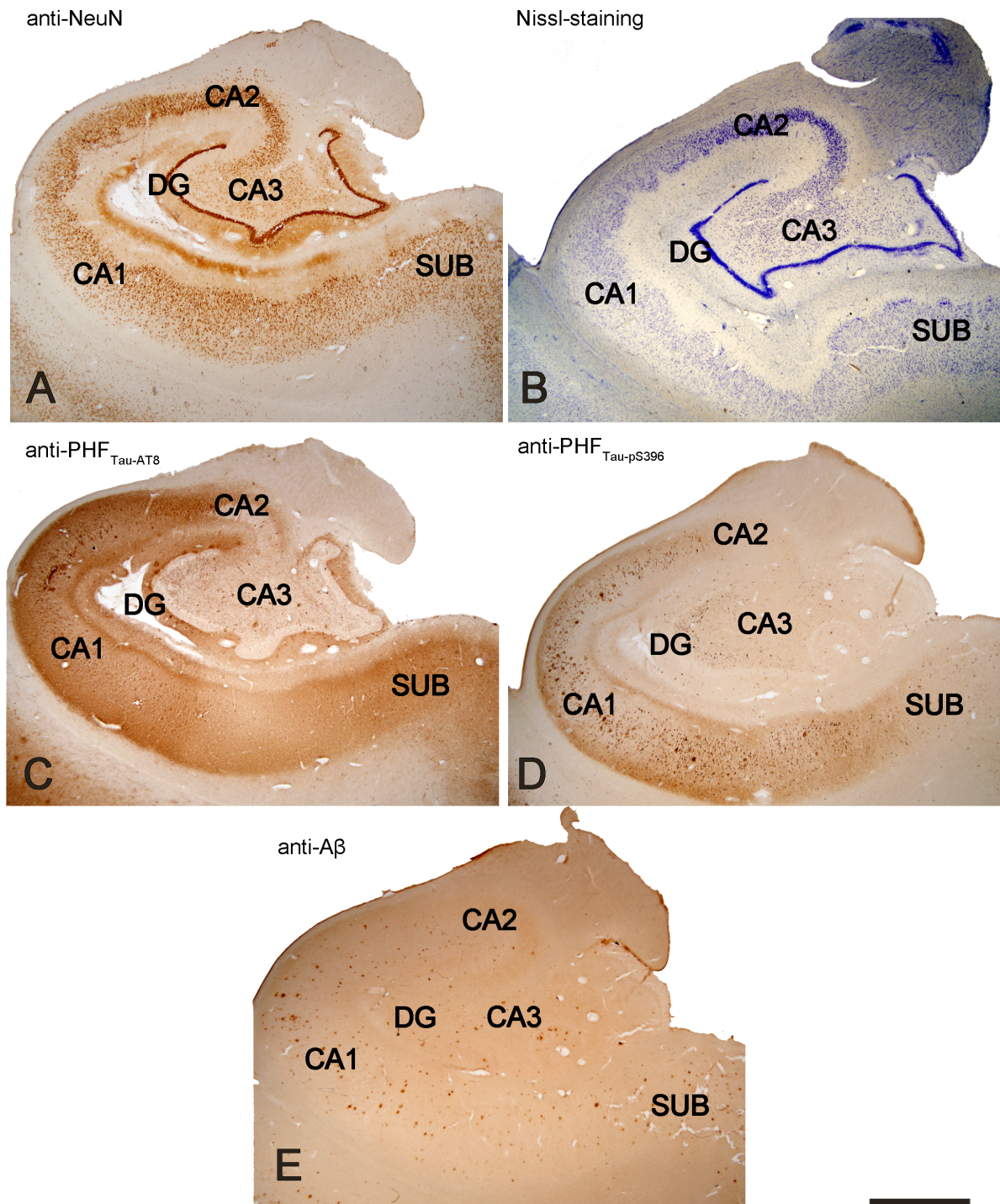


Figura 9. Microfotografías ilustrando la formación hipocampal de un paciente con EA de secciones inmunoteñidas para NeuN (A), Nissl (B), PHF_{Tau-AT8} (C), PHF_{Tau-pS396} (D) y Aβ (E). Barra de escala (en E): 1000μm. GD: giro dentado; CA3-CA1: campos amónicos; SUB: subículo.

Tabla 3. Resumen de los datos clínicos y patológicos. Escala de Braak (Braak and Braak, 1991): I-II (ovillos neurofibrilares en la corteza entorrinal y áreas adyacentes); III-IV (abundantes ovillos neurofibrilares en amígdala e hipocampo, extendiéndose ligeramente hacia el córtex de asociación); V-VI (ovillos neurofibrilares ampliamente distribuidos a lo largo del neocórtex, envolviendo, en última instancia, las áreas motoras y sensoriales). Escala CERAD (ART): A (baja densidad de placas neuríticas); B (densidad moderada de placas neuríticas); C (alta densidad de placas neuríticas). α Syn: proteína Alpha Sinucleína; EA: enfermedad de Alzheimer; DCL: Deterioro Cognitivo Leve; ^BBanc de Teixits Neurologics (Hospital Universitari Clinic de Barcelona); ^MBanco de Tejidos Fundación CIEN (Madrid); TDP43: proteína de unión ADN. ND: Dato no disponible.

Grupo	Paciente	Sexo	Edad en el momento del diagnóstico	Escalas Braak y CERAD	Progresión EA (años)	Histopatología	Tiempo post-mortem (h:m)
EA	Az1 ^B	M	80	VI, C	10	Microinfartos	4:30
EA	Az2 ^B	F	70	V, C	12	α Syn (amígdala)	2:00
EA	Az3 ^B	F	79	V, C	2	TDP-43	5:30
EA	Az4 ^B	F	78	IV, B	9	TDP-43, esclerosis del hipocampo	5:30
EA	Az5 ^B	F	69	V/VI, C	14	Infartos corticales	4:00
EA	Az6 ^B	F	69	V, C	7	TDP-43 (límbico), esclerosis del hipocampo	5:00
EA	Az7 ^B	F	89	VI, C	-	TDP-43 (amígdala), esclerosis del hipocampo	4:15
EA	Az8 ^B	F	77	VI, C	8	esclerosis del hipocampo	5:45
EA	Az9 ^B	F	76	VI, C	8	TDP-43 (límbico), α Syn (orbitofrontal), esclerosis del hipocampo	5:00
EA	Az10 ^B	F	71	V, C	9	po	5:00
EA	Az11 ^M	F	82	V, -	13	Meningioma	4:00
Control	M7Bi	M	49	NA	NA	esclerosis del hipocampo	2:00
Control	M8Bi	M	69	NA	NA	Hipocampo normal	2:00 - 3:00
Control	M10Bi	F	63	NA	NA	Hipocampo normal	3:00
ELT	H65P	F	21	NA	NA	Hipocampo normal no esclerótico	0
ELT	H87P	M	34	NA	NA	Hipocampo normal no esclerótico	0
ELT	H206P	F	44	NA	NA	Hipocampo normal no esclerótico	0
ELT	H216P	M	41	NA	NA	Hipocampo normal no esclerótico	0
ELT	H242P	F	38	NA	NA	Hipocampo normal no esclerótico	0
ELT	H200P	M	27	NA	NA	Hipocampo normal no esclerótico	0
ELT	H248P	M	45	NA	NA	Hipocampo normal no esclerótico	0

cada anticuerpo primario: caballo anti-ratón para anti-NeuN, anti-PHF_{Tau-AT8} y anti-A β , y cabra anti-conejo para anti-PHF_{Tau-pS396} (1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.). Finalmente, las secciones fueron sumergidas durante 1h en el complejo ABC (avidina-biotina peroxidasa, Vectastain, ABC Elite PK1600, Vector). Para la visualización del marcaje, las secciones fueron tratadas con el cromógeno DAB al 0,05% (3, 3' tetrahidrocloreuro de diaminobencidina Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) en PB 0.1M y H₂O₂ al 0,01%, durante 1 minuto. Finalmente, las secciones fueron montadas, deshidratadas, clarificadas con xileno y cubiertas con el medio de montaje DePeX (VWR, Rannor, Pensilvania, EEUU).

3.3. Microscopía confocal: doble y triple inmunofluorescencia

Para estudiar la posible relación entre las proteínas PHF_{Tau} y A β , así como la relación entre ambos epítomos de la proteína tau y su implicación en el estadio de la enfermedad, se combinaron anticuerpos frente a PHF_{Tau} (PHF_{Tau-AT8} y PHF_{Tau-396}) y anticuerpos A β -ir, obteniendo dobles y triples marcajes de inmunofluorescencia.

En primer lugar, se seleccionaron las secciones de tejido para dobles marcajes de inmunofluorescencia. Siguiendo el procedimiento anteriormente descrito, las secciones seleccionadas fueron, en primer lugar, tratadas con ácido fórmico al 88%, siendo posteriormente incubadas en una solución que contenía la siguiente combinación de los anticuerpos primarios descritos previamente: anti-A β /anti-PHF_{Tau-pS396}, anti-A β /anti-PHF_{Tau-AT8} y anti-PHF_{Tau-pS396}/anti-PHF_{Tau-AT8} (**Figura 10**). Después se incubaron durante 2h a temperatura ambiente, en diferentes soluciones que contenían un anticuerpo secundario específico de cabra anti-conejo acoplado a Alexa fluor 594 y uno de cabra anti-ratón acoplado a Alexa fluor 488 (1:1000; Molecular Probes, Eugene, OR, EE. UU.). Finalmente, las secciones fueron tratadas con el reactivo Eliminator (Chemicon) para reducir o eliminar la auto-fluorescencia. Finalmente, las secciones fueron montadas con el medio de montaje ProLong Gold Antifade Reagent (Invitrogen Corp.) para su conservación y visualización.

Además, también se examinó la posible relación entre la proteína A β y ambos epítomos de la proteína PHF_{Tau} (PHF_{Tau-AT8} y PHF_{Tau-396}), empleando para ello secciones triplemente teñidas (**Figura 11**). Aquellas secciones que fueron doblemente inmunomarcadas para los anticuerpos anti-PHF_{Tau-pS396} y PHF_{Tau-AT8}, se contratiñeron con el reactivo Methoxy-X04 (**0.01mg/ml en PB 0.1M**), un marcador histológico fluorescente (Xcess Biosciences Inc., San Diego, CA, EE. UU.), derivado del Congo Red, que tiñe placas en secciones postmortem de tejido cerebral con EA. De esta manera, conseguimos visualizar las placas A β -ir y ambos epítomos de la proteína PHF_{Tau} de manera simultánea.

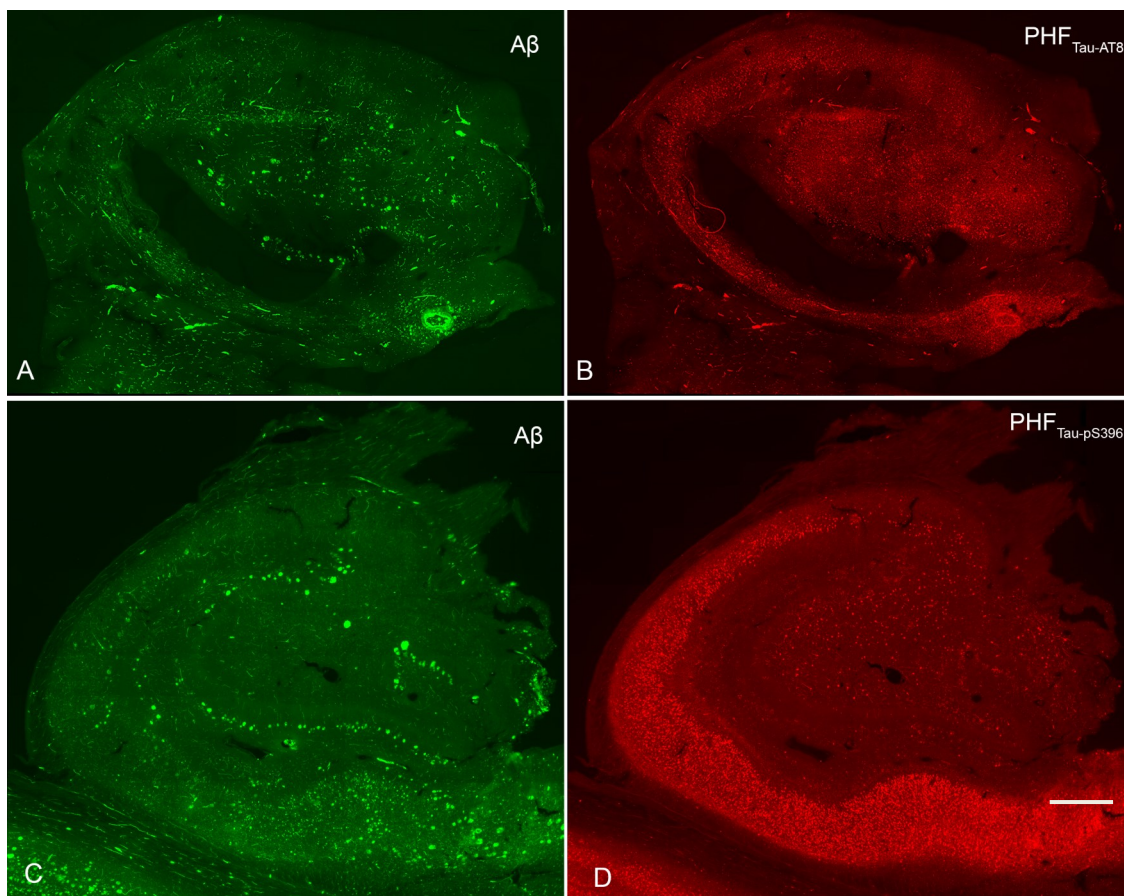


Figura 10. Imágenes de microscopía confocal de la formación hipocampal de un paciente con EA que muestra tinción para anti-A β (A, C) y anti-PHF_{Tau} (anti-PHF_{Tau-AT8} y anti-PHF_{Tau-pS396} en B y D, respectivamente). Barra de escala (en D): 50 μ m.

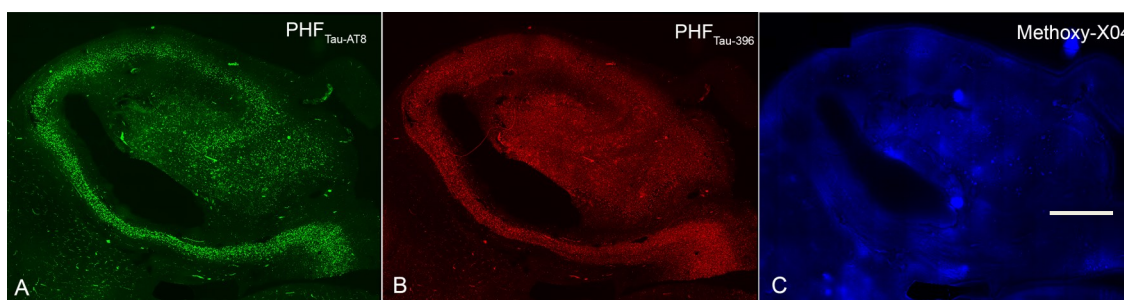


Figura 11. Imágenes de microscopía confocal de la formación hipocampal de un paciente con EA que muestra tinción para anti-PHF_{Tau} (anti-PHF_{Tau-AT8} y anti-PHF_{Tau-pS396}; A y B, respectivamente) y tinción para Methoxy-X04 (C). Barra de escala (en C): 50 μ m.

3.4. Estimaciones estereológicas mediante microscopía óptica

3.4.1. Estimación del encogimiento del tejido

El procesamiento histológico de las secciones produce un encogimiento del tejido, por lo que se estimó el grosor de las secciones antes y después del procesado inmunohistoquímico, corrigiendo así los valores finales obtenidos en la estimación de densidades neuronales y de placas $A\beta_{ir}$, así como el volumen y el porcentaje ocupado por estas últimas.

Todas las medidas se realizaron en cinco puntos aleatorios en diferentes secciones, usando el software Stereo Investigator (Stereo Investigator 11.0, MicroBrightField Inc., Williston, VT, EEUU). En las secciones marcadas con DAB, el grosor medio de las secciones antes del procesamiento inmunohistoquímico fue $50.2\mu\text{m}$, y después del procesado, $16.49\mu\text{m}$ en secciones marcadas con anti-NeuN, anti-PHF_{Tau} y anti- $A\beta$, mientras que, en secciones teñidas con el método de Nissl, el grosor medio después del procesado fue $17.4\mu\text{m}$. Por lo tanto, los valores finales de las estimaciones estereológicas se corrigieron para obtener una estimación homogénea de todas las variables a medir.

3.4.2. Análisis de densidades neuronales

Las estimaciones neuronales se realizaron aplicando disectores ópticos (**Figura 12**; West y Gundersen, 1990), en particular, mediante la herramienta “Fraccionador Óptico” (Stereo Investigator) que permite estimar las densidades neuronales.

Las densidades neuronales, expresadas como el número de neuronas marcadas por volumen, fueron estimadas en las regiones CA3, CA1 y subículo en secciones teñidas con el método de Nissl y en secciones marcadas con anti-NeuN, anti-PHF_{Tau-AT8} y anti-PHF_{Tau-pS396} (**Figura 12**). Puesto que la mayoría de las neuronas se localizan en la capa piramidal, las densidades neuronales se estimaron en esta capa en los CAs del hipocampo y el subículo. En secciones teñidas con el método de Nissl, una neurona se contabilizaba si su nucléolo se identificaba y enfocaba claramente a lo largo del eje-z del marco de conteo, mientras que en secciones anti-NeuN, una neurona se contabilizaba si su núcleo se visualizaba y enfocaba.

Se aplicaron parámetros estereológicos específicos para cada muestra y marcador neuronal. Después de escoger aleatoriamente una sección de tejido cerebral, se seleccionaron 6 secciones a intervalos igualmente espaciados (entre 4-8). Los disectores ópticos se emplearon en secciones teñidas con el método de Nissl y con anti-NeuN a 100x aumentos, en una superficie estimada de $2050\mu\text{m}^2$, con una profundidad de los disectores de $10\mu\text{m}$, obteniendo un volumen analizado de $20500\mu\text{m}^3$ por disector óptico por caso.

Las secciones marcadas con los anticuerpos frente a PHF_{Tau-AT8} y PHF_{Tau-396} se analizaron a 40x aumentos, en una superficie de 14450µm², usando disectores de 10µm de profundidad, y obteniendo un volumen analizado de 144500µm³ por caso.

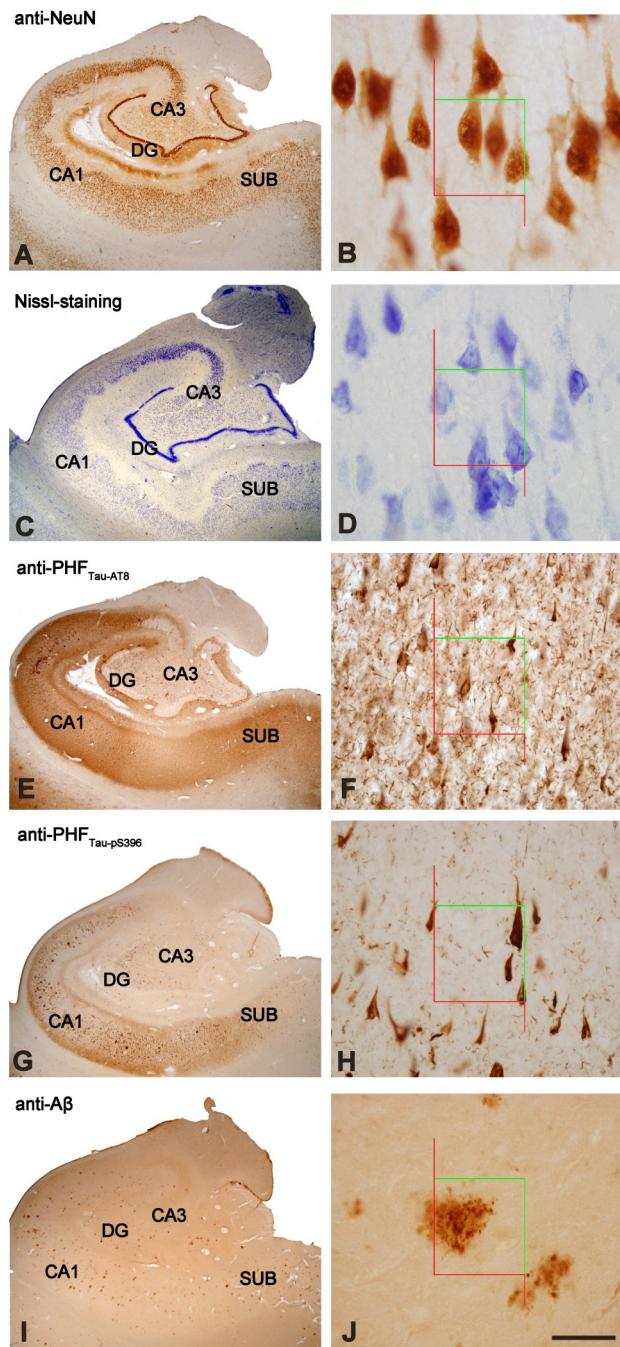


Figura 12. Columna de la izquierda: microfotografías ilustrando la formación hipocampal de un paciente con EA de secciones inmunoteñidas para NeuN (A), Nissl (C), PHF_{Tau-AT8} (E), PHF_{Tau-pS396} (G) y Aβ (I). Columna de la derecha (B, D, F, H, J): mayor aumento de la región CA1 para ilustrar el marco de conteo aplicado en los procedimientos estereológicos (las líneas verdes corresponden a los bordes de inclusión y las líneas rojas a los bordes de exclusión). En las secciones con tinción de Nissl, una neurona se contó solamente si el nucléolo se identificaba claramente en el plano óptico a lo largo del eje z, mientras que en las secciones NeuN_{ir}, una neurona se contó cuando su núcleo se identificaba claramente. Barra de escala (en J): 1000 µm en A, C, E, G e I; 37 µm en B y D; 90 µm en F, H and J. GD: giro dentado; CA3-CA1: campos amónicos; SUB: subículo.

3.4.3. Análisis de las placas de β -amiloide

El número de placas $A\beta_{-ir}$ por volumen se estimó en las regiones GD, CA3, CA1 y subículo, aplicando la herramienta descrita anteriormente (**Figura 12**). Se seleccionaron un mínimo de 6 secciones por cada paciente con EA, con intervalos equivalentes (entre 4-8), empleando un objetivo de 40x para su estudio. La superficie analizada fue de $22500 \mu\text{m}^2$ y con una profundidad del disector de $10 \mu\text{m}$, obteniendo un volumen estudiado de $225000 \mu\text{m}^3$ por disector óptico por caso.

Para estimar el volumen de las placas, se delimitaron los límites de cada placa con la herramienta *Nucleator* (Stereo Investigator; Gundersen, 1986), que permite obtener el volumen de cada placa $A\beta_{-ir}$ analizada, además del volumen relativo ocupado por las mismas en cada campo analizado de la formación hipocampal.

3.5. Microscopía confocal

Para analizar la distribución y expresión de neuronas PHF_{Tau-ir} (PHF_{Tau-AT8} y PHF_{Tau-396}) y de placas $A\beta_{-ir}$ en CA1, así como su posible interacción se analizaron las secciones doblemente marcadas mediante inmunofluorescencia. Las secciones fueron escaneadas con un microscopio láser confocal multiespectral Zeiss LSM 710 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Alemania), utilizando las líneas de láser 488 y 594 nm.

Para el análisis de las neuronas PHF_{Tau-ir} (PHF_{Tau-AT8} y PHF_{Tau-396}) y placas $A\beta_{-ir}$ presentes en estas secciones doblemente marcadas, obtuvimos series de imágenes, con un intervalo de $3 \mu\text{m}$ en el eje z, y con una lente de inmersión en aceite a 40x aumentos (Objetivo Plan-Apochromat 40x NA, 1.3 aceite). La señal de cada marcador fue adquirida en canales independientes, 488 nm para la detección de Alexa 488 y 594 nm para Alexa 594. El número de planos ópticos en el eje z obtenidos para cada serie fue entre 12 y 20. Para el estudio y visualización del marcaje se combinaron las series de imágenes adquiridas en sus diferentes canales, con el software Zen (ZEN 2012, Carl Zeiss Microscopy GmbH; **Figura 13**).

Por otro lado, se examinaron las secciones con triple inmunofluorescencia marcadas con anti-PHF_{Tau-pS396} y PHF_{Tau-AT8}, y contrateñidas con Methoxy-X04 (para marcar las placas de $A\beta$). Se estudiaron 113 placas individualmente, para cada una se obtuvo una serie de imágenes con un intervalo en el eje z de 0.5 a $1 \mu\text{m}$, con un número total de planos ópticos comprendido entre 34 y 69, en canales separados, y con el objetivo 40x. Igualmente, la señal de cada marcador fue adquirida en canales independientes, 488 nm para la detección de Alexa 488 y 594 nm para Alexa 594 y 405 nm para la detección de Methoxy-X04.

El software Zen se utilizó para obtener la proyección en z de todas las imágenes (resolución 1024 x 1024 píxeles). El programa utilizado para componer las figuras fue Adobe Photoshop (CS4, v11.0, Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, EE. UU.).

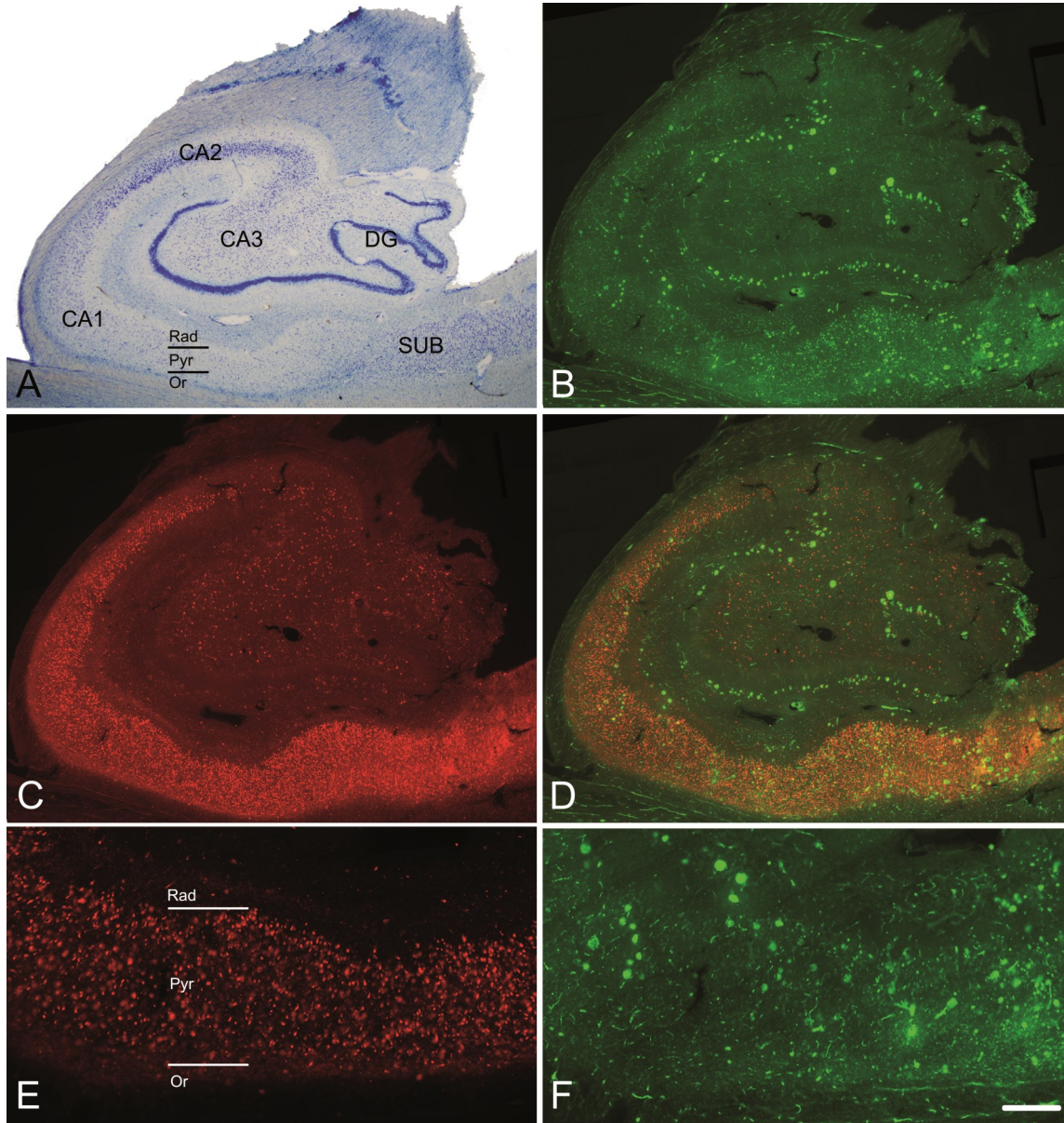


Figura 13. Formación hipocámpal de un paciente con EA. (A) Sección marcada con la tinción de Nissl de un paciente con EA (Az6) para ilustrar las áreas hipocámpales. Note la pérdida neuronal en CA1. Las imágenes de confocal muestran tinción para anti-A β (B) y anti-PHF_{Tau-pS396} (C) y fueron tomadas de una sección doblemente marcada para ilustrar el patrón de distribución de las placas A β _{ir} y las neuronas PHF_{Tau-pS396-ir}, respectivamente. (D) Ambos canales mostrando tanto el marcaje anti-A β como el marcaje anti-PHF_{Tau-pS396}. (E, F) Región CA1 mostrando el marcaje de neuronas PHF_{Tau-pS396-ir} (E) y de placas A β _{ir} (F). CA1-CA3: campos amónicos; GD: giro dentado; SUB: subículo; Pyr: *stratum pyramidale*; Rad: *stratum radiatum*; Or: *stratum oriens*. Barra de escala (en F): 20 μ m en A; 25 μ m en B, C, D; 50 μ m en E, F.

3.5.1. Análisis de la patología neurofibrilar en CA1

El análisis de las neuronas que expresaban PHF_{Tau-AT8} y/o anti-PHF_{Tau-pS396} consistió en una segmentación semiautomática de las neuronas, con la ayuda del software Imaris (7.1.5 Bitplane AG, Zurich, Suiza), colocando esferas de 20µm de diámetro (tamaño medio del soma neuronal) en cada neurona teñida. De esta manera, las neuronas PHF_{Tau-AT8-ir} se marcaron con esferas rojas, las neuronas PHF_{Tau-pS396-ir} con esferas verdes, y aquellas neuronas que mostraban ambos marcadores (PHF_{Tau-AT8}/PHF_{Tau-pS396}), con esferas amarillas. (**Figura 14**). Una vez marcadas todas las neuronas, el programa Imaris ofrece el número total de neuronas PHF_{Tau-ir} de cada paciente analizado, así como la posición de cada neurona dentro de la región CA1.

3.5.2. Análisis de la patología amiloide en CA1

El análisis de las placas se realizó en las series de imágenes obtenidas de las secciones con doble inmunofluorescencia: anti-Aβ/anti-PHF_{Tau-AT8}, anti-Aβ/anti-PHF_{Tau-pS396} y anti-PHF_{Tau-AT8}/anti-PHF_{Tau-pS396}, que contenían la región CA1 en su totalidad.

Para caracterizar cada placa, se analizó cada plano y canal por separado con el fin de visualizar su marcaje. Para ello, se utilizó el programa ZEN blue (Zen 2012). Este programa permite colocar un identificador a cada placa, generando así una lista con la totalidad de las placas analizadas. De esta manera, obtuvimos el número total de placas marcadas, pudiendo además determinar si había o no co-localización entre los distintos marcadores, así como la localización exacta de cada placa dentro de CA1.

Adicionalmente, las series de imágenes de las placas adquiridas individualmente, en las secciones triplemente teñidas (PHF_{Tau-AT8}/PHF_{Tau-pS396}/Methoxy-X04) también fueron analizadas con el programa ZEN blue. En este caso, se analizó el marcaje específico de cada placa, pero no su localización. Por tanto, se obtuvieron los datos de placas que expresaban alguno de los marcadores empleados, es decir, PHF_{Tau-AT8}, PHF_{Tau-pS396} y/o Methoxy-X04.

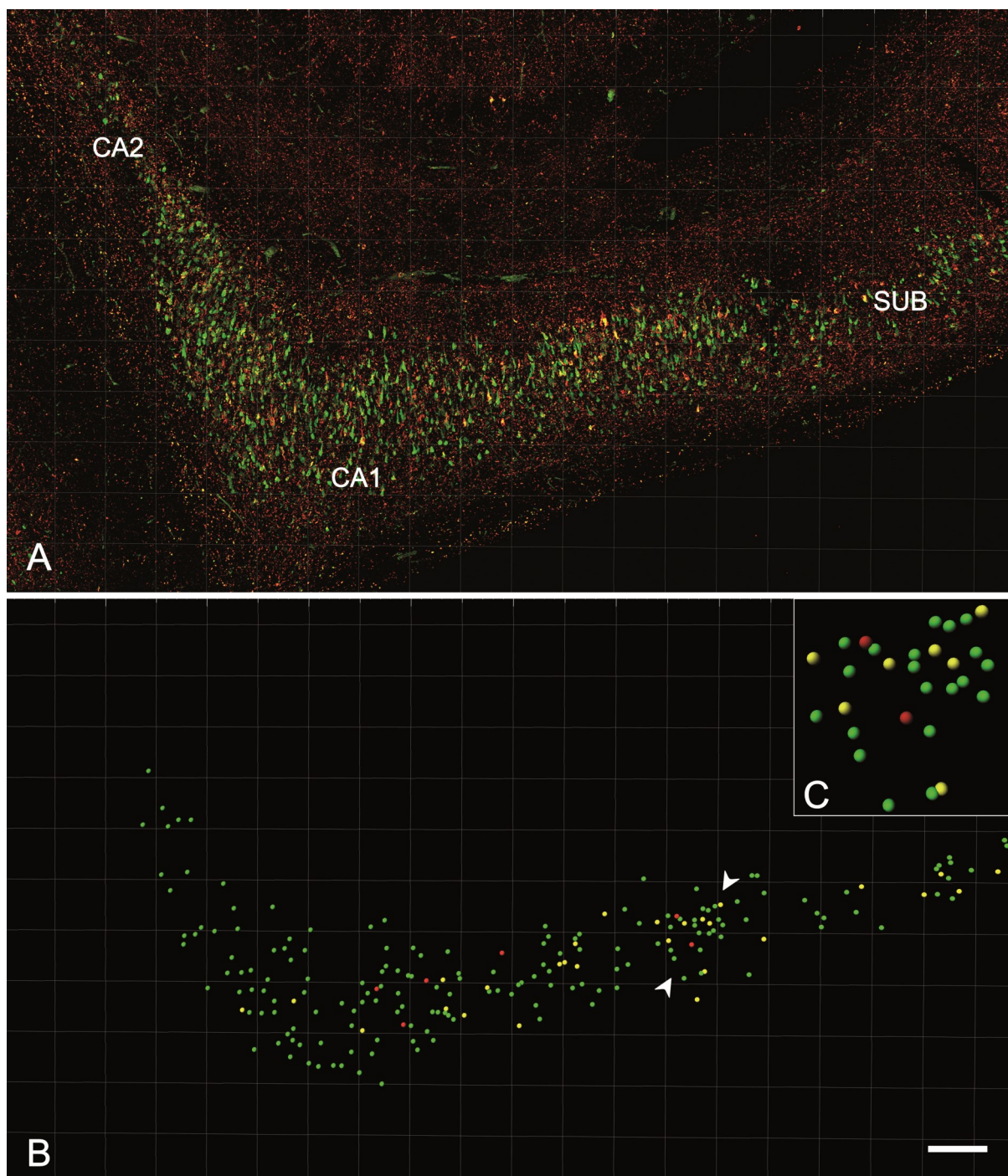


Figura 14. Análisis de la distribución y expresión de neuronas $\text{PHF}_{\text{Tau-ir}}$ mediante el software Imaris. **A:** Imagen de microscopía confocal mostrando una sección doblemente teñida para anti- $\text{PHF}_{\text{Tau-AT8}}$ (rojo) y anti- $\text{PHF}_{\text{Tau-pS396}}$ (verde), en la región CA1, la cual puede ser visualizada entera, del paciente Az4. **B:** Los puntos son asignados a cada neurona, siendo fácilmente visualizados al apagar los canales de fluorescencia. **C:** El rectángulo es la región marcada por puntas de flecha en **B**. Los diferentes colores de los puntos corresponden a neuronas $\text{PHF}_{\text{Tau-AT8-ir}}$ (rojo), neuronas $\text{PHF}_{\text{Tau-pS396-ir}}$ (verde), y neuronas que coexpresan ambos marcadores PHF_{Tau} (amarillo). Barra de escala: 200 μm (en **B**); 50 μm (en **C**).

3.6. Análisis multidimensional

El análisis de tejido hipocampal de pacientes con EA generó una gran cantidad de datos histopatológicos. Gracias al análisis estereológico se obtuvieron densidades neuronales y de placas $A\beta_{-ir}$, así como el volumen de estas placas y el porcentaje que ocupan, todo ello por cada marcador, paciente y región. Por otro lado, se obtuvo la expresión y distribución de neuronas PHF_{Tau-ir} en CA1, así como la expresión y distribución de placas $A\beta_{-ir}$ en la misma región. A pesar de que todo ello ofrece una descripción muy detallada de las posibles alteraciones hipocampales en pacientes con EA, resulta relevante analizar la posible relación de estos datos con las variables clínicas y demográficas de los pacientes. Para ello, se desarrolló una nueva herramienta informática con el fin de visualizar y explorar la posible relación entre variables cualitativas, obtenidas de los historiales clínicos de los pacientes, y variables cuantitativas, obtenidas de los estudios de microscopía óptica y microscopía confocal.

3.6.1. InTool Explorer

InTool Explorer (Interactive Tool Explorer) es una herramienta desarrollada en colaboración con la Universidad Rey Juan Carlos y el CESVIMA (Universidad Politécnica de Madrid) dentro del proyecto Cajal Blue Brain, que ofrece un análisis exploratorio de los datos, permitiendo analizar variables multidimensionales procedentes de distintas fuentes.

InTool Explorer ha sido conceptualizado como una herramienta de descarga gratuita, instalable tanto en Windows como en Linux. Además, es accesible desde cualquier ordenador, caracterizándose por ello como una web multi-usuario y siguiendo un modelo cliente-servidor, es decir, los datos de un determinado usuario se almacenan en un servidor externo, facilitando de esta manera el acceso a los mismos desde cualquier dispositivo.

Actualmente, dos versiones de InTool Explorer están disponibles en http://cajalbbp.es/intoolexplorer_web, donde el usuario puede descargar una versión de escritorio (standalone), o acceder a la versión en línea (versión web), la cual no requiere una descarga o instalación local para comenzar a trabajar con la herramienta. El sistema se ha probado completamente con los navegadores más populares como Google Chrome, Microsoft Edge y Mozilla Firefox. InTool Explorer requiere un procedimiento de registro muy simple en el que el usuario proporciona un identificador de inicio de sesión y un correo electrónico. Este proceso de registro permite a los neurocientíficos tener acceso a sus conjuntos de datos desde cualquier ordenador a través de una conexión a Internet, y permitiendo además la posibilidad de compartir los datos si se desea. Asimismo, permite el cifrado de los datos y las comunicaciones para garantizar la protección de los mismos y cumplir con las leyes de privacidad.

3.6.1.1. Estructura informática y tecnologías empleadas

De manera general, el diseño de la interfaz está basado en un tablero infinito donde poder desplegar todas las tarjetas que quiera el usuario, situándolas y redimensionándolas al gusto. La herramienta está diseñada para trabajar con dos tipos de tarjetas. El primer tipo de tarjetas son las visualizaciones, donde todas las tarjetas comparten la misma finalidad, es decir, permiten ver al usuario una representación determinada de los datos cargados en el sistema. El segundo tipo de tarjetas son los filtros; cada una de estas tarjetas añade al tablero algún tipo de control para filtrar la información que el resto de las tarjetas son capaces de representar.

3.6.1.2. Manejo de datos

La aplicación está diseñada para trabajar con datos tabulares genéricos (.csv y .xls) y formatos de imagen 2D estándar (.png, .jpeg, .tif, .bmp, etcétera). Los datos tabulares deben organizarse en una hoja de datos, ordenándose los elementos del conjunto de datos en filas e, idealmente, cada columna debe contener todos los valores de una variable determinada. No obstante, el sistema puede tratar con datos incompletos, comúnmente llamados **NaN** (*No valor*; del inglés, *Not a number*). Para trabajar con varias tablas a la vez éstas deben estar relacionadas entre sí, es decir, deben compartir alguna columna como, por ejemplo, identificadores de “Caso” (**Figura 15**).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	Caso	Condición	Esclerosis del hipocampo	Región	Vol estimado NeuN (µm3)	Vol estimado Nissl (µm3)	Vol estimado AT8 (µm3)	Vol estimado pS396 (µm3)	Vol estimado Aβ (µm3)
2	Az1	EA	NO	GD			14373400000	7715700000	13067300000
3	Az1	EA	NO	CA3	4305130000	3701570000	12947100000	8708460000	9800080000
4	Az1	EA	NO	CA1	8362600000	4419100000	9462090000	7922140000	4277620000
5	Az1	EA	NO	SUB	3013720000	1967630000	11752400000	5926180000	3182750000
6	Az2	EA	NO	GD			4893590000	8887140000	6765020000
7	Az2	EA	NO	CA3	5829220000	6373950000	3848200000	7530240000	7376380000
8	Az2	EA	NO	CA1	4948150000	7178540000	3911920000	4609870000	6728070000
9	Az2	EA	NO	SUB	2371800000	4120560000	4712240000	5884800000	6049550000
10	Az3	EA	NO	GD			6949450000	4945410000	8426990000
11	Az3	EA	NO	CA3	8939600000	8079480000	5910570000	6915590000	6693750000
12	Az3	EA	NO	CA1	7712760000	11603800000	6318320000	9227230000	11211900000
13	Az3	EA	NO	SUB	3763730000	3799300000	4606160000	4789020000	5001830000

Figura 15. Ejemplo de una hoja de datos preparada para InTool Explorer.

3.6.1.3. Visualización de datos

Una vez que el usuario se ha autenticado en la aplicación, el primer paso es importar datos al servidor mediante el menú Archivo (*Open file*). Si los usuarios ya han cargado datos, pueden abrirlos directamente desde el servidor (*Open from server*; **Figura 16A**). El usuario puede cargar un nuevo conjunto de datos desde el servidor, agregar un nuevo conjunto al actual (*Add to current*) o guardar el conjunto de datos actual en el servidor (*Save on server*). Además, las variables del conjunto de datos se clasifican automáticamente, resultando muy útil ante operaciones que son necesarias para el análisis correcto de los datos, pero que generalmente están fuera del alcance del estudio. Por otra parte, el usuario puede modificar manualmente esta categorización, eliminando variables, cambiándolas de posición en la lista, o cambiando el nombre de las mismas editando el esquema del conjunto de datos (*Edit squema*; **Figura 16B**).

Finalmente, la herramienta permite a los usuarios guardar (*Analysis*) localmente el estado del análisis exploratorio actual o visualización, así como cargar un estado guardado anterior (tarjetas activas, filtros, etcétera; *Save*, **Figura 16C**). Asimismo, puesto que InTool Explorer permite al usuario acceder a una misma sesión desde ordenadores distintos, este podrá iniciar una sesión de trabajo y finalizarla posteriormente en otro lugar diferente.

3.6.1.4. Tarjetas de visualización

Una de las mayores contribuciones de InTool Explorer es que ofrece al usuario la posibilidad de elegir su propia ruta de análisis. Además, la herramienta permite personalizar las tarjetas de visualización, las interacciones entre las variables y los análisis estadísticos, así como adaptarlos a las particularidades de los datos. Por ello, InTool Explorer está basado en tarjetas vinculadas, las principales unidades funcionales del sistema, permitiendo interacciones, visualizaciones y operaciones de análisis. La vinculación de las tarjetas propaga los cambios producidos en una tarjeta al resto de tarjetas creadas que contengan las mismas variables. Las tarjetas se clasifican en cuatro grupos:

- **Tarjetas de filtrado:** InTool Explorer clasifica las variables en tres grupos: categóricas, ordinales y cuantitativas. Los usuarios pueden seleccionar cualquiera de estas variables para llevar a cabo operaciones de exploración y filtrado. Los valores categóricos se seleccionan con casillas marcadas, mientras que las variables cuantitativas y ordinales se seleccionan con controles de rango (**Figura 17**).

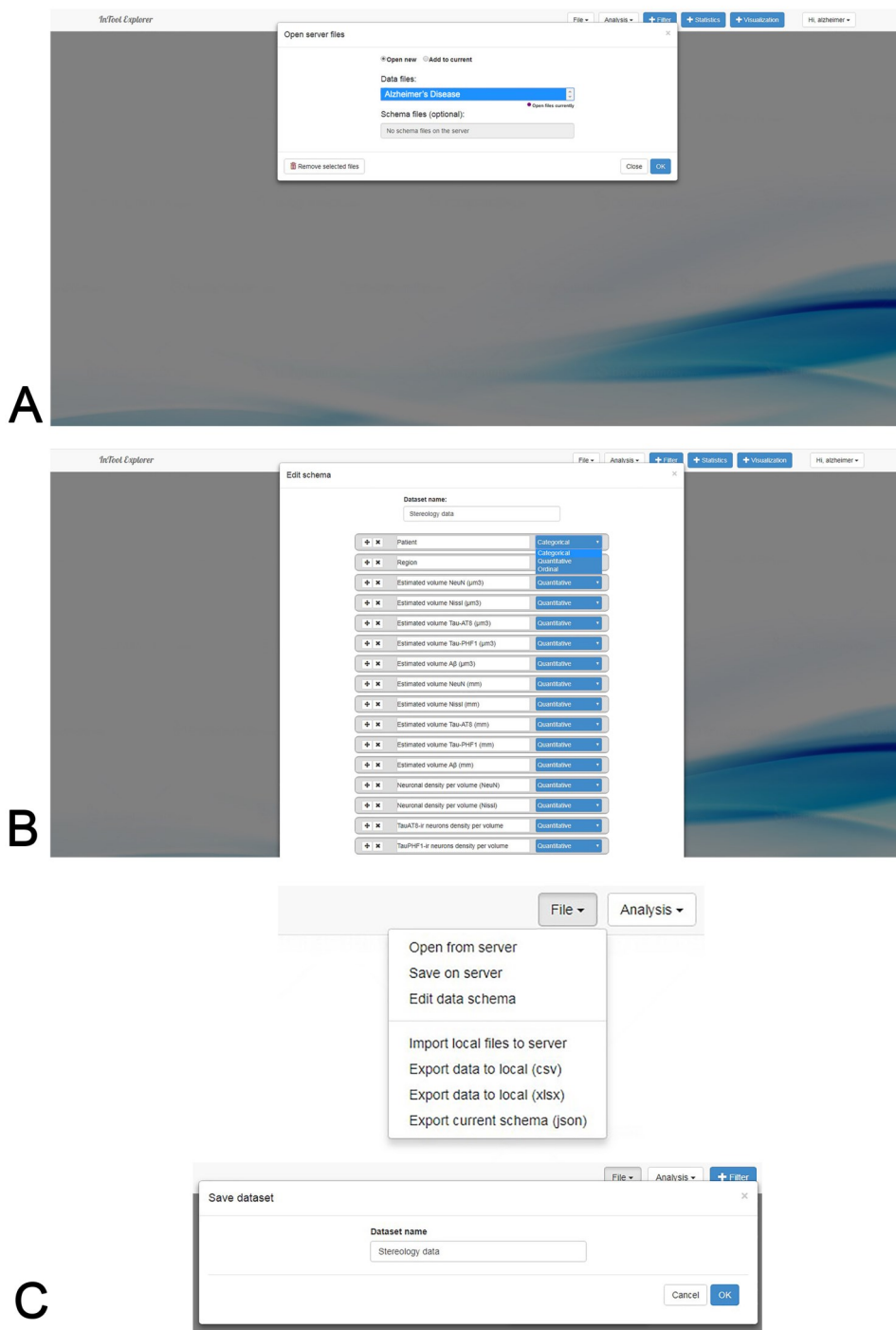


Figura 16. Capturas de pantalla de InTool Explorer para ilustrar el proceso de carga de datos. **A:** abrir desde el archivo de datos desde el servidor. **B:** lista de variables que se clasifican automáticamente como categóricas, cuantitativas u ordinales. **C:** opción de guardar un análisis.

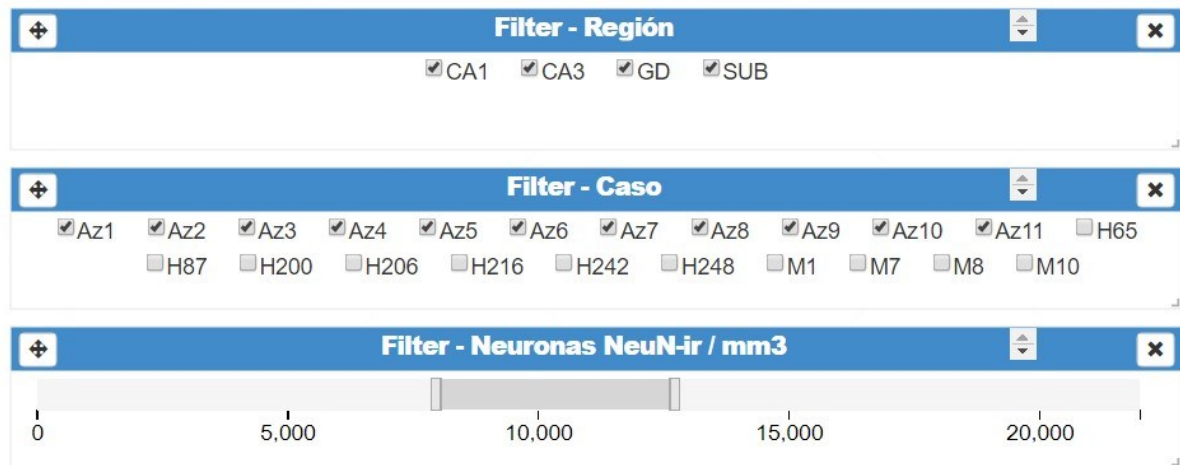


Figura 17. Tarjetas de filtrado de InTool Explorer. **A:** filtrado de variables categóricas como “Región” y “Caso”, con casillas para marcar o desmarcar. **B:** filtrado de una variable cuantitativa (“Neuronas NeuN_{ir}/mm³”) mediante control de rango.

- **Tarjetas de visualización:** los usuarios pueden seleccionar una tarjeta de visualización según su interés de estudio. Estas tarjetas interactúan con las tarjetas de filtrado debido a la vinculación, actualizándose los datos cuando los usuarios cambian los parámetros de filtro. Las principales tarjetas de visualización son el gráfico de coordenadas paralelas, gráfico de conjuntos paralelos, gráfico de barras radiales, gráfico de dispersión y gráfico de cajas (**Figura 18 y Figura 19**).

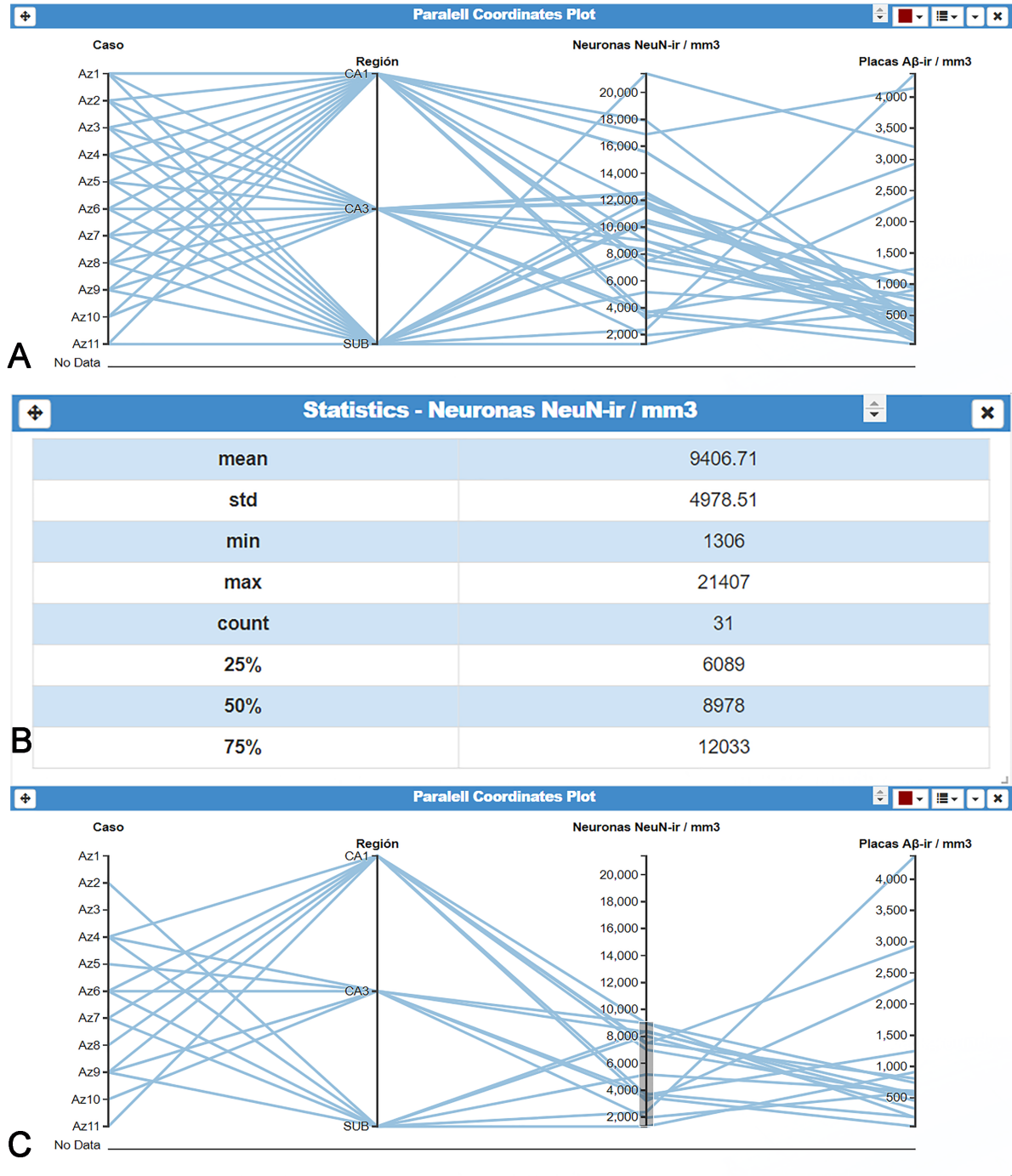


Figura 18. Uso de los gráficos de coordenadas paralelas. (A) Gráfico de coordenadas paralelas de las variables seleccionadas, agrupadas por columnas. (B) Tarjeta de estadística (*Column Statistics*) de la variable “Neuronas NeuN_{ir}/mm³” que facilita la selección de valores específicos. (C) Gráfico de coordenadas paralelas usando valores de rango para la variable “Neuronas NeuN_{ir}/mm³” para visualizar las regiones o los pacientes correspondientes a un rango seleccionado (los valores de la media se muestran en B). Esta selección facilita la visualización de una posible relación con la variable “Placas Aβ_{ir}/mm³”. CA1-CA3: campos amónicos; SUB: subículo.

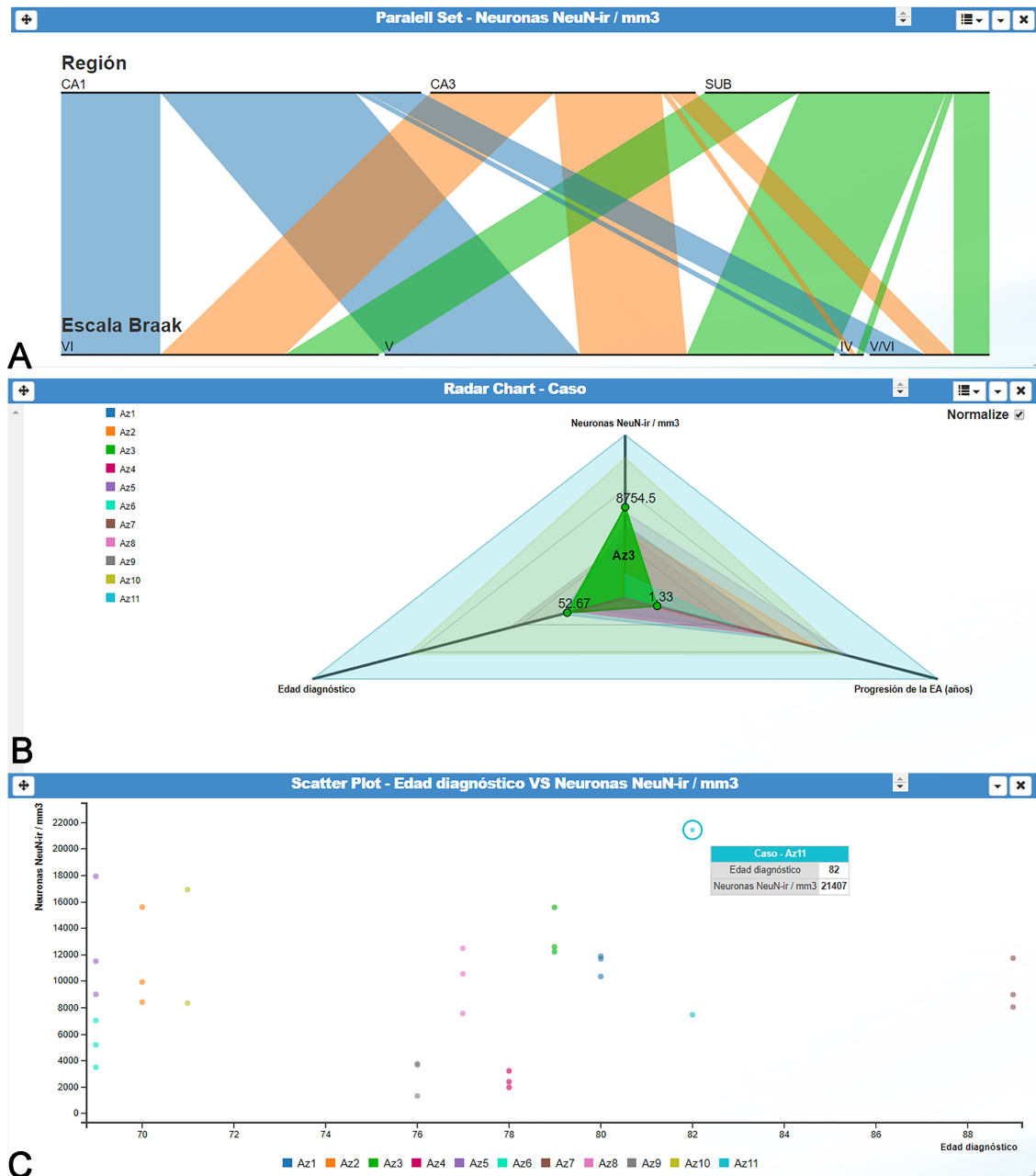


Figura 19. Interfaz de InTool Explorer mostrando varias tarjetas de visualización. **(A)** Gráfico de conjuntos paralelos (*Parallel set*) mostrando las variables “Región”, “Escala de Braak” y “Neuronas NeuN-ir”. Cada barra horizontal representa posibles categorías asociadas a cada variable, mientras que el ancho de la barra indica la fracción proporcional de la categoría total. **(B)** Gráfico radial ilustrando la relación entre tres variables: “Edad en el momento del diagnóstico”, “Neuronas NeuN-ir/mm³” y “Progresión de la enfermedad (años)”. Todos los pacientes se visualizan en el lado izquierdo del gráfico. Esta tarjeta de visualización permite múltiples comparaciones con el fin de visualizar valores similares o extremos. El paciente Az5 (resaltado en verde) se muestra como ejemplo de visualización. **(C)** Gráfico de dispersión mostrando la relación entre las variables “Edad en el momento del diagnóstico” y “Neuronas NeuN-ir/mm³” por paciente. Observe el valor extremo resaltado con el globo azul (paciente Az11). Esta identificación ofrece información adicional sobre el valor seleccionado. CA1-CA3: campos amónicos; SUB: subículo.

- Tarjetas de datos:** este tipo de tarjetas permite visualizar los datos brutos del estudio en cualquier momento que el usuario lo necesite. De esta manera, se puede acceder a los datos rápidamente mientras se exploran las variables en otras tarjetas de visualización. Si el usuario añade al tablero una visualización "Data Table" podrá observar que todos sus datos se encuentran unidos en una misma tabla. Esta operación es comúnmente conocida como *inner join* y consigue unir dos o más tablas duplicando la información de la tabla que tenga menos filas, de manera que, cada fila de la tabla resultante tenga todas las columnas de las tablas originales que compartan un identificador (**Figura 20**). Los datos del sistema se pueden exportar en cualquier momento en formato .xls o .svg y contendrá la tabla resultante de la unión de todas las tablas cargadas. Además, las filas incluidas serán aquellas que pasen todos los filtros que el usuario haya incluido en el tablero.

Caso	Región	Neuronas NeuN-ir / mm3
Az1	CA3	11868
Az1	CA1	11661
Az1	SUB	10330
Az2	CA3	9912
Az2	CA1	15580
Az2	SUB	8399
Az3	CA3	12573

Figura 20. Tarjeta de datos de InTool Explorer para visualizar los datos brutos en cualquier momento que el usuario lo necesite.

- Tarjetas de análisis estadístico:** el programa también ofrece funcionalidades estadísticas integradas con código R, que permiten al usuario acceder al análisis estadístico rápidamente. La primera versión de la herramienta incluye una tarjeta de análisis descriptivo, una tarjeta de correlaciones (correlación de Pearson para muestras paramétricas y correlación de Spearman para muestras no paramétricas), y tarjetas de comparaciones (t-Student, test de Welch, Kolmogórov-Smirnov, ANOVA de un factor o Kruskal Wallis).
- Tarjetas de imágenes:** son tarjetas que se pueden utilizar para filtrar y seleccionar. Los usuarios pueden usar los valores de una variable asociada a una imagen para seleccionar o filtrar datos. Este tipo de tarjetas ofrece la posibilidad de crear tarjetas de filtro espacial definidas por el usuario (**Figura 21** y **Figura 22**).

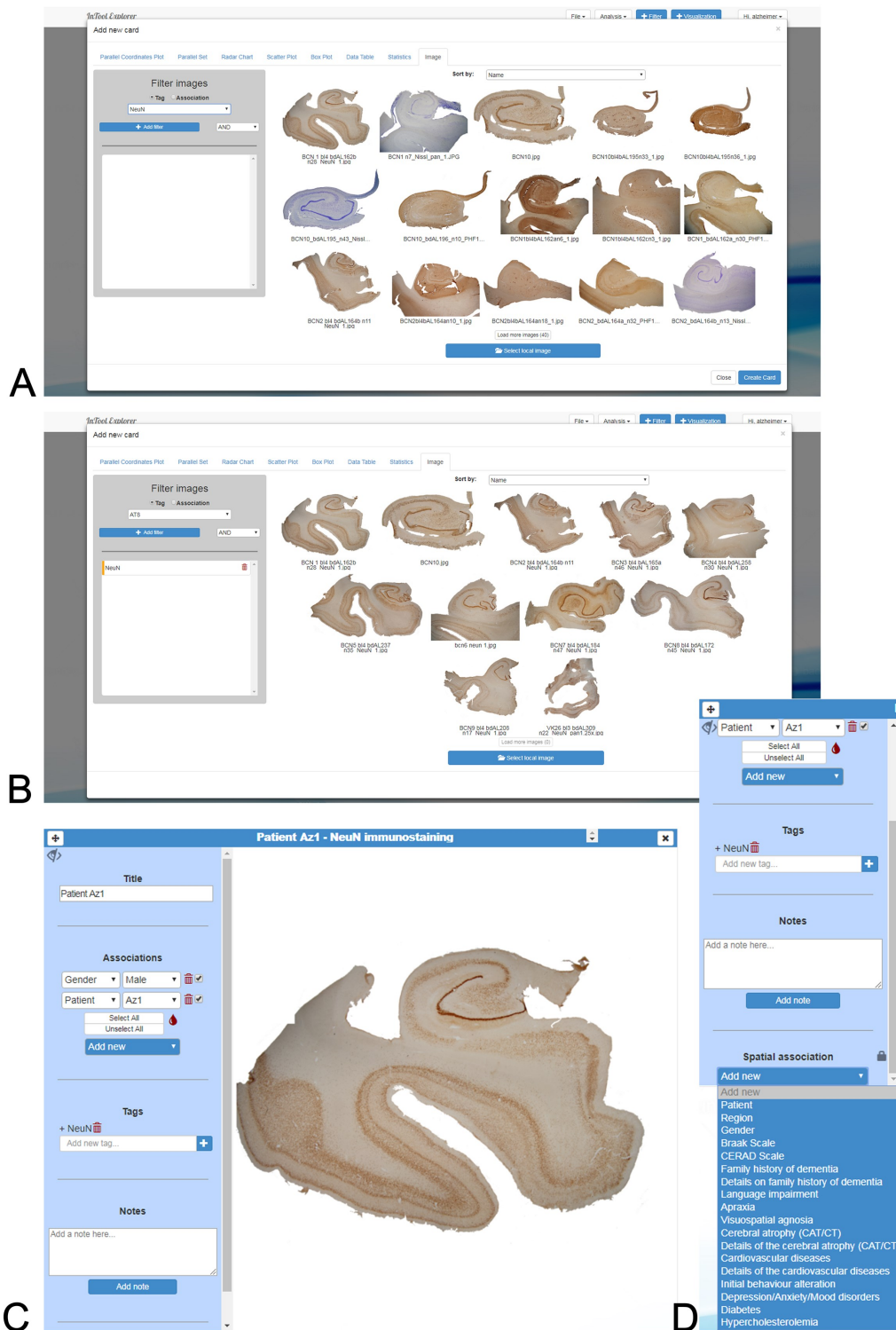


Figura 21. Tarjetas específicas de dominio creadas en InTool Explorer a partir de imágenes histológicas de muestras de cerebro humano de pacientes con EA. (A) Las imágenes cargadas en la herramienta puede ser visualizadas de manera conjunta. (B) Puesto que las imágenes pueden filtrarse por etiquetas, todas las imágenes presentadas corresponden al marcador “NeuN”. (C) La tarjeta creada muestra información relativa a la imagen seleccionada: título, variables asociadas a la imagen, etiquetas y notas, así como la asociación espacial (*Spatial association*; detalles en D). (D) Esta característica proporciona la facilidad de añadir filtros visuales de variables categóricas a la imagen seleccionada (véase Figura 22 para más detalles).

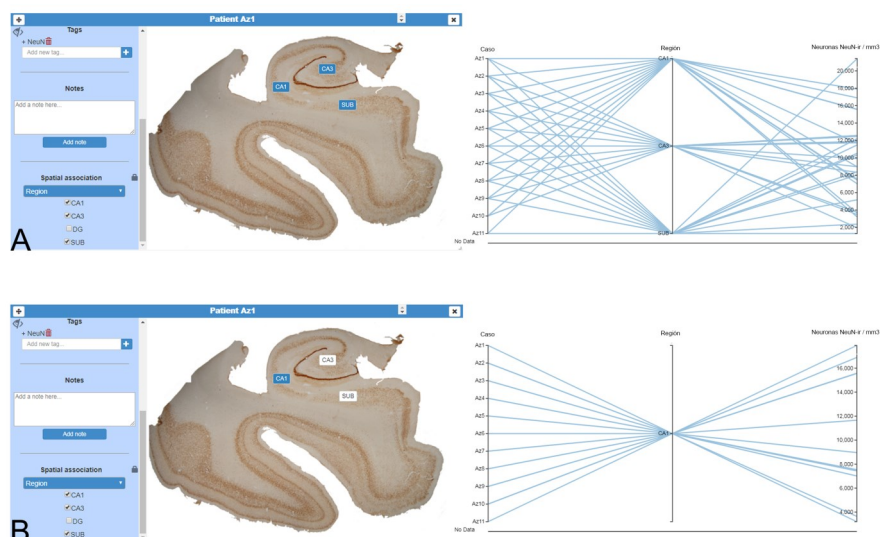


Figura 22. Tarjetas específicas de dominio para filtrado espacial. **(A)** Tarjeta de imagen del hipocampo de una sección anti-NeuN de un paciente con EA (Paciente Az1). La variable “Región” se añadió a la tarjeta de imagen con la función de asociación espacial (*Spatial association*) como un filtro para cualquier visualización simultánea. A la derecha, se creó un gráfico de coordenadas paralelas para mostrar la dinámica de la interacción del usuario. **(B)** En la misma tarjeta de imagen ilustrada en A, se seleccionó una región particular (CA1, resaltada en azul). A la derecha, en el gráfico de coordenadas paralelas, aparecen solamente los datos filtrados. CA1-CA3: campos amónicos; SUB: subículo.

Todas estas representaciones se ven afectadas por los filtros que el usuario vaya incorporando al tablero. Los filtros actualizan automáticamente los datos que se muestran en el resto de las tarjetas, y lo que proporciona la verdadera potencia al análisis exploratorio de datos es la capacidad de excluir variables a voluntad, ver rápidamente el resultado de una hipótesis o poder crear visualizaciones flexibles ágilmente. El principal objetivo de InTool Explorer es ofrecer al usuario el poder de realizar todas estas tareas de una manera eficiente y siguiendo un razonamiento continuo.

3.7. Análisis estadístico

Para determinar las posibles diferencias entre regiones, marcadores y casos de los datos obtenidos del análisis de estereología, se realizaron comparaciones estadísticas de las densidades neuronales obtenidas de las secciones marcadas con el método de Nissl, anti-NeuN, anti-PHF_{Tau-AT8} y anti-PHF_{Tau-pS396}, así como de densidad de placas A β _{ir}, mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (MW) para muestras no pareadas test U o Kruskal-Wallis (no se cumplieron las pruebas de normalidad y homocedasticidad). Para analizar posibles correlaciones entre variables se utilizó el coeficiente de Spearman. Todos los procedimientos estadísticos y gráficas fueron generados con el paquete estadístico GraphPad Prism 7 (Prism, San Diego, CA, EEUU) y el programa SPSS (IBM SPSS Statistics v25, IBM Corp., EEUU).

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

En el presente trabajo, se utilizaron los términos: GD, hipocampo propio (CA1 y CA3) y subículo (**Figura 1**). Asimismo, la distinción entre CA1 y subículo se estableció por las agrupaciones de células piramidales que aparecen en la parte superficial de la capa piramidal del subículo adyacente a CA1 (Alonso-Nanclares et al., 2011). Los límites de las otras regiones del hipocampo se delimitaron en base a descripciones establecidas por Amaral et al. (2004).

Por otro lado, para el análisis de la región CA1 en secciones con inmunofluorescencia, usaremos los términos “co-localización” y “co-expresión”. Se denominó co-localización al solapamiento parcial o completo de los diferentes elementos marcados en las placas al hacer uso de dos o más marcadores, y co-expresión a la visualización conjunta de dos marcadores dentro de una misma neurona.

4.1. Estimación de la densidad neuronal

La densidad neuronal total fue estimada tanto en secciones teñidas con el método de Nissl, como en secciones inmuno-marcadas con anti-NeuN, en la capa piramidal de CA3, CA1 y subículo (**Tabla 4, Figura 23**). Debido a la gran densidad de células granulares en el GD, esta región no fue incluida, ya que las estimaciones no eran consistentes.

Las densidades neuronales de las muestras procedentes de biopsias y autopsias sin demencia fueron previamente analizadas en secciones marcadas mediante el método de Nissl (Alonso-Nanclares et al. 2011), y no se observaron diferencias entre ambos grupos. Por tanto, en el presente trabajo se consideraron como un único grupo y fue denominado como “sin demencia” en las comparaciones (**Tabla 4; Figura 23**).

Las estimaciones realizadas en las secciones marcadas con anti-NeuN mostraron una mayor variabilidad entre los pacientes con EA que aquellas densidades obtenidas en secciones teñidas con el método de Nissl (**Tabla 4, Figura 23**). Por otro lado, la densidad neuronal en CA1, estimada en secciones teñidas con el método de Nissl, mostró una disminución del 32% en pacientes con EA ($p=0.009$; **Figura 23**), comparada con el grupo sin demencia. Además, 5 de los pacientes con EA presentaban esclerosis del hipocampo, una patología que, como se ha mencionado, se caracteriza por una pérdida neuronal severa y gliosis, principalmente en la región CA1 (**Figura 24**) y que se ha relacionado con la EA (Dickson et al., 1944; Attems and Jellinger, 2006; Amador-Ortiz et al., 2007).

Sin embargo, no se observaron diferencias en la densidad neuronal total estimada mediante Nissl en la región CA3, ni en el subículo, cuyos valores en el grupo con EA fueron similares al grupo sin demencia (**Tabla 4**).

Tabla 4. Resumen de las distintas densidades estimadas por región hipocampal y marcador en pacientes con EA y casos sin demencia (los datos se expresan como media \pm desviación típica). GD: giro dentado; CA3-CA1: campos amónicos; SUB: subículo. NA: No aplicable. (-): Dato no disponible.

Grupo	Región	Neuronas NeuN _{ir} / mm ³	Neuronas Nissl / mm ³	Neuronas PHF _{Tau-AT8-ir} / mm ³	Neuronas PHF _{Tau-pS396-ir} / mm ³	Placas A β _{ir} / mm ³
EA	GD	-	-	875 \pm 597	363 \pm 172	303 \pm 158
	CA3	8262 \pm 3845	9176 \pm 1831	755 \pm 290	1223 \pm 1085	240 \pm 188
	CA1	10152 \pm 5010	8353 \pm 3452	2542 \pm 779	10062 \pm 5311	1378 \pm 1244
	SUB	9121 \pm 5709	9590 \pm 2966	951 \pm 407	3414 \pm 2333	1331 \pm 1307
ND	CA3	-	10006 \pm 2471	-	-	-
	CA1	-	12253 \pm 1672	-	-	-
	SUB	-	10930 \pm 1787	-	-	-

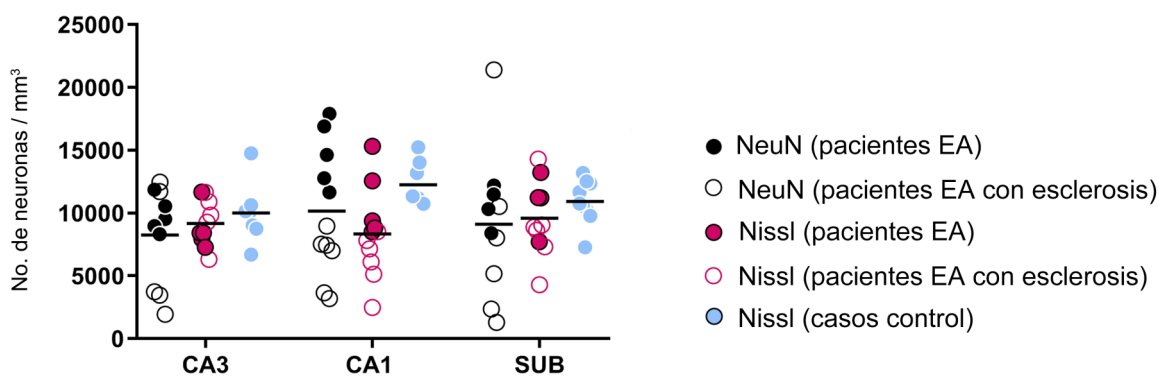


Figura 23. Gráfico mostrando la media de las densidades neuronales en las áreas hipocampales examinadas, estimadas en secciones con tinción de Nissl y anti-NeuN, en pacientes con EA y sujetos sin demencia. Las densidades representadas corresponden al número de neuronas marcadas por volumen (mm³) por cada caso analizado. Los círculos blancos corresponden a los pacientes con EA que también presentan esclerosis del hipocampo. CA3-CA1: campos amónicos; SUB: subículo.

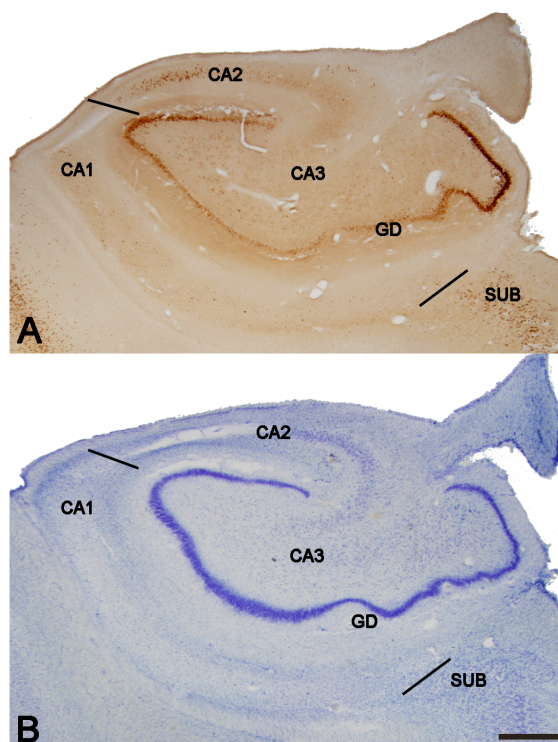


Figura 24. Microfotografías de la formación hipocámpal del paciente Az4 para ilustrar la esclerosis del hipocampo. Las secciones anti-NeuN (**A**) y con tinción de Nissl (**B**) muestran la pérdida neuronal en CA1. Las líneas (en **A** y **B**) indican la transición entre CA1, CA2 y el subículo. GD, giro dentado; CA1-CA3, campos amónicos; SUB, subículo. Barra de escala (en **B**) 1000 μ m.

4.2. Estudio de la patología neurofibrilar

Para examinar la presencia de la proteína PHF_{Tau} en la formación hipocámpal en pacientes con EA, y con el fin de esclarecer la posible relación entre la presencia de la proteína PHF_{Tau} y la EA, se cuantificaron dos isoformas de la misma: PHF_{Tau-AT8} y PHF_{Tau-pS396}.

4.2.1. Estimación de la densidad de neuronas PHF_{Tau-ir}

En todas las regiones hipocámpales analizadas observamos una mayor densidad de PHF_{Tau-pS396} (expresada como el número de neuronas por volumen, en mm³) que de PHF_{Tau-AT8}, de acuerdo a estudios previos en la región CA1 (Su et al., 1994, 1996; Blázquez-Llorca et al., 2010; Furcila et al., 2018; **Tabla 4, Figura 25**). La mayor densidad neuronal, tanto de PHF_{Tau-AT8} como de PHF_{Tau-pS396}, se observó en CA1, seguida del subículo, mientras que CA3 y GD presentaron los valores de densidades más bajos (**Tabla 4, Figura 25**). Además, la densidad de neuronas PHF_{Tau-pS396-ir} mostró una mayor variabilidad entre pacientes que la densidad de neuronas PHF_{Tau-AT8-ir}, especialmente en la región CA1 donde, además, la densidad de PHF_{Tau-pS396-ir} alcanzó valores cercanos a la densidad neuronal total estimada con Nissl y NeuN, sugiriendo que la mayoría de las neuronas de CA1 en pacientes con EA contienen PHF_{Tau-pS396}.

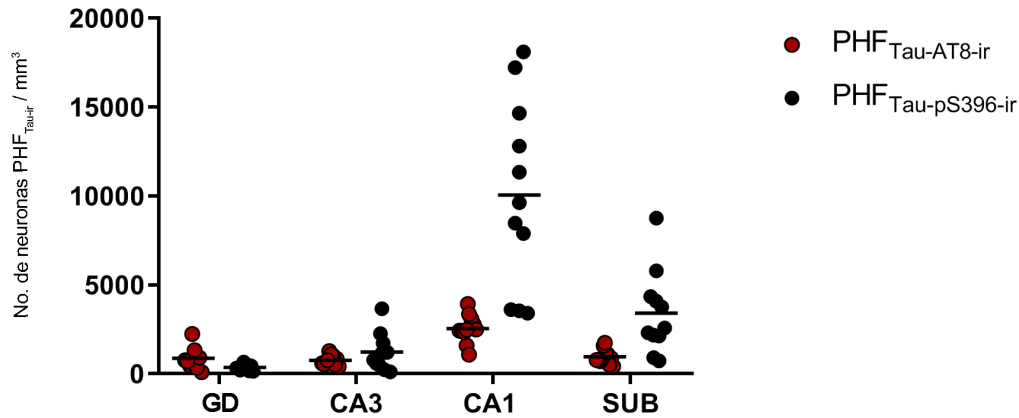


Figura 25. Gráfico mostrando la media de densidades neuronales por volumen de neuronas PHF_{Tau-AT8-ir} y PHF_{Tau-pS396-ir} en las áreas hipocámpicas analizadas. Las densidades representadas corresponden con el número de neuronas marcadas por volumen (mm³) por cada caso analizado. GD: giro dentado; CA3-CA1: campos amónicos; SUB: subículo.

Para comprobar esto último, se estimó la proporción de neuronas PHF_{Tau-ir} con respecto a las neuronas totales estimadas en la región CA3, CA1 y subículo. En las estimaciones realizadas con NeuN, estas proporciones mostraron que en CA3, las neuronas PHF_{Tau-AT8-ir} representan un 9% del total de las neuronas, y un 10% en el subículo, mientras que PHF_{Tau-pS396} representan el 15% de las neuronas de CA3 y el 37% de las neuronas del subículo. En CA1, PHF_{Tau-AT8-ir} representan el 25% de las neuronas, mientras que PHF_{Tau-pS396} alcanza el 99%, es decir, los ovillos neurofibrilares teñidos con PHF_{Tau-pS396} están presentes en todas las neuronas de CA1 (**Tabla 4**). Las proporciones calculadas con respecto a las densidades neuronales estimadas en secciones marcadas con el método de Nissl mostraron porcentajes similares en CA3 y subículo, sin embargo, en CA1, encontramos que el número de neuronas PHF_{Tau-pS396-ir} excede al número total de neuronas estimadas en un 20% (**Figura 26**), lo que podría sugerir la presencia de marcaje de “ovillos fantasma” (ver Discusión).

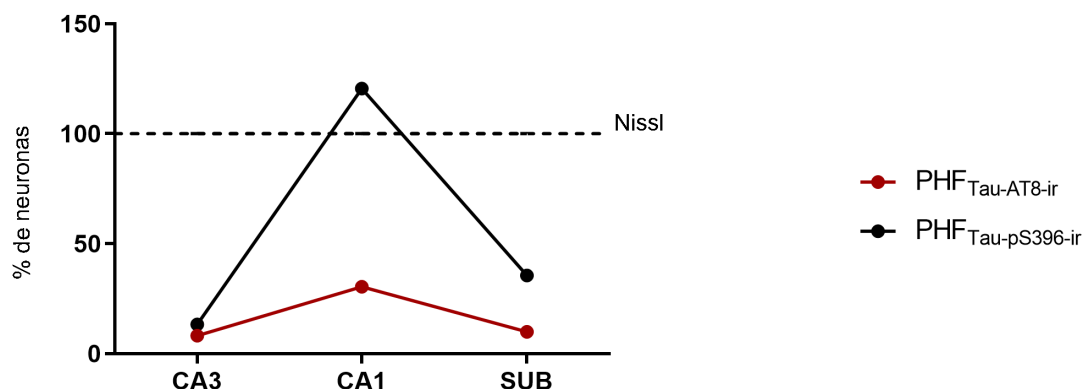


Figura 26. Representación gráfica de los porcentajes de neuronas PHF_{Tau-AT8-ir} y PHF_{Tau-pS396-ir}, considerando las neuronas teñidas con el método de Nissl como la población total de neuronas. Los datos corresponden al promedio de los porcentajes por región. Nótese que el porcentaje de elementos PHF_{Tau-pS396-ir} sobrepasa la población neuronal total, que podría ser una consecuencia de ovillos neurofibrilares extracelulares marcados u “ovillos fantasma” (ver Discusión para más detalles). CA3-CA1: campos amónicos; SUB: subículo.

4.2.2. Caracterización de las neuronas PHF_{Tau-ir}

El estudio de la co-expresión de PHF_{Tau-AT8}/PHF_{Tau-pS396} en CA1 se realizó en secciones doblemente marcadas con inmunofluorescencia (anti-PHF_{Tau-AT8}/anti-PHF_{Tau-pS396}; **Figura 27**) en seis pacientes con EA (Az1-Az6) mediante el software Imaris (descrito en la sección 3.3.1 de Material y Métodos). Se analizaron un total de 5678 neuronas, y los datos indicaron que el 64% de las neuronas marcadas expresaban solamente PHF_{Tau-pS396}, mientras que el 28% mostraban ambos marcadores y, el 8% restante, mostraba inmunorreactividad solamente frente a PHF_{Tau-AT8} (**Tabla 5**; **Figura 28**). Sin embargo, observamos una gran variabilidad entre los pacientes.

Tabla 5. Número de neuronas marcadas en la región CA1, por caso, en secciones doblemente marcadas para anti-PHF_{Tau-AT8} y PHF_{Tau-pS396}. Los números entre paréntesis indican sus porcentajes relativos.

Paciente	PHF _{Tau-AT8-ir}	PHF _{Tau-pS396-ir}	PHF _{Tau-AT8-ir} / PHF _{Tau-pS396-ir}	Total neuronas
Az1	119	668	196	983
Az2	83	424	322	829
Az3	66	646	462	1174
Az4	23	492	84	599
Az5	101	496	424	1021
Az6	39	890	143	1072
Total	431 (8%)	3616 (64%)	1631 (28%)	5678

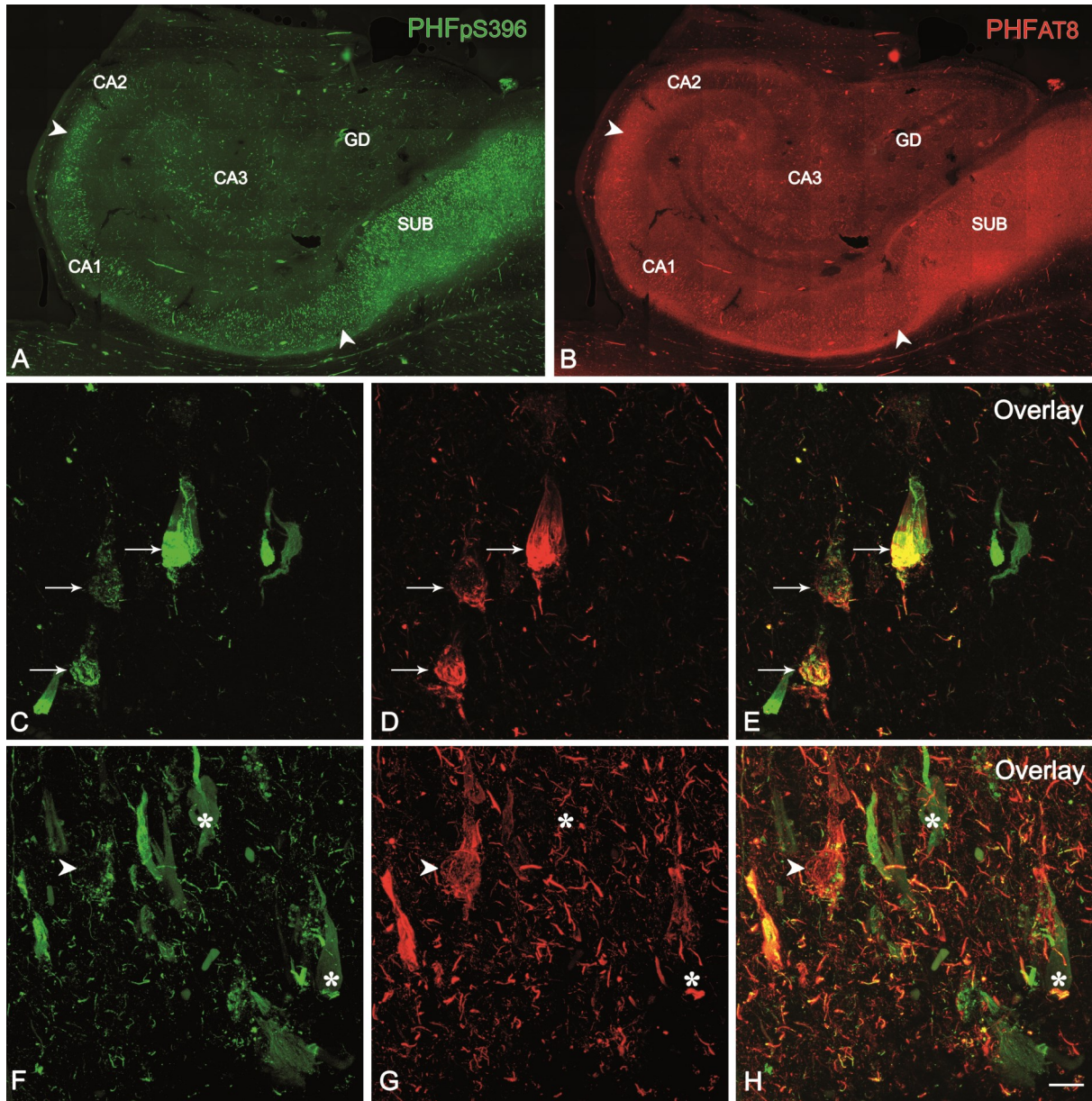


Figura 27. Proyecciones de pilas de imágenes para ilustrar el marcaje de neuronas en secciones doblemente marcadas para PHF_{Tau-AT8} y PHF_{Tau-pS396}. **A, B:** Microfotografías de confocal a bajo aumento de la formación hipocámpal mostrando marcaje para PHF_{Tau-pS396} (**A**, en verde) y PHF_{Tau-AT8} (**B**, en rojo). Las puntas de flecha indican los límites de CA1. **C-H:** Tríos de proyecciones de pilas de imágenes tomadas de secciones doblemente inmunoteñidas para PHF_{Tau-PHF1}/PHF_{Tau-AT8}. Las flechas indican neuronas que expresan anti-PHF_{Tau-AT8} y anti-PHF_{Tau-pS396} (**C-E**). Las puntas de flecha indican una neurona que expresa anti-PHF_{Tau-AT8}, y los asteriscos indican dos neuronas que expresan solamente PHF_{Tau-pS396}. GD: giro dentado; CA1-CA3: campos amónicos; SUB: subículo. Barra de escala (en H): 922µm (in **A, B**) and 50µm (in **C-H**).

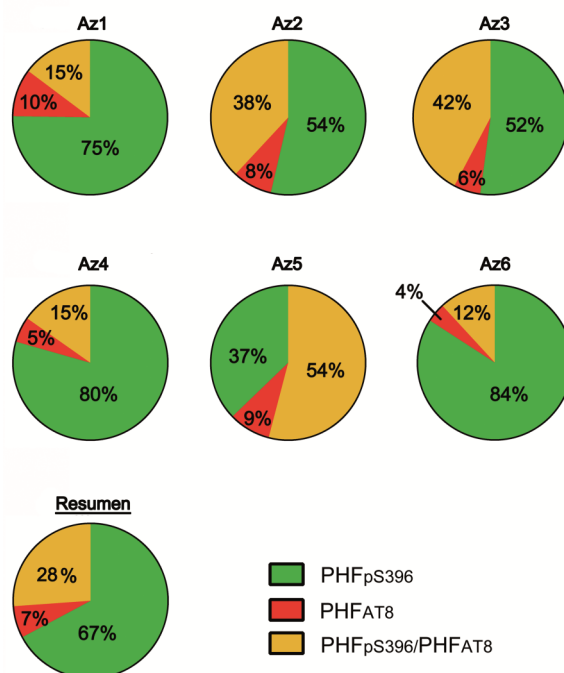


Figura 28. Gráfico circular que ilustra los porcentajes de neuronas teñidas en secciones doblemente marcadas para PHF_{Tau-AT8} y PHF_{Tau-pS396}. A pesar de la gran variabilidad en los patrones de expresión, las medias de los porcentajes de expresión en el gráfico “Resumen” muestran claramente una mayor proporción de neuronas PHF_{Tau-pS396}.

4.2.3. Distribución de neuronas PHF_{Tau-ir}

El análisis de la distribución de neuronas PHF_{Tau-ir} se realizó en las mismas secciones que fueron empleadas para el estudio de co-expresión (con doble inmunofluorescencia para PHF_{Tau-pS396} y PHF_{Tau-AT8}). Para ello, la región CA1 fue dividida arbitrariamente en tres partes iguales: proximal (cerca de CA2), medial y distal (cercano al subículo), tal y como se describió previamente (Andrioli et al 2007; Kastanauskaite et al., 2009).

Se determinó la localización dentro de la capa piramidal de CA1 de las 5678 neuronas analizadas (**Figura 14**). El 41% de las neuronas se ubicaban en regiones mediales de la capa piramidal de CA1, seguido por regiones distales (33%) y, regiones proximales (26%; **Tabla 6**). Respecto a la localización dentro de las capas de CA1, las neuronas marcadas parecían estar igualmente distribuidas en las capas superficiales (cerca del *stratum radiatum*) y profundas (cerca del *stratum oriens*) de la capa piramidal.

Tabla 6. Número de neuronas PHF_{Tau-ir} en la capa piramidal de la región CA1, según la localización de cada neurona en las distintas subregiones, y la tinción (PHF_{Tau-AT8}, PHF_{Tau-pS396} o PHF_{Tau-AT8}/PHF_{Tau-pS396}). Los números entre paréntesis indican sus porcentajes relativos.

	Marcador			Total
	PHF _{Tau-AT8-ir}	PHF _{Tau-pS396-ir}	PHF _{Tau-AT8-ir} / PHF _{Tau-pS396-ir}	
Proximal	134	843	521	1498 (26%)
Medial	189	1416	715	2320 (41%)
Distal	108	1357	395	1860 (33%)
Total	431 (8%)	3616 (64%)	1631 (28%)	5678 (100%)

4.3. Estudio de la patología amiloide

4.3.1. Estimación de la densidad de placas A β -ir

La estimación estereológica del número de placas por volumen en secciones inmunomarcadas con anti-A β , reveló que CA1 presentaba los valores más altos (1378 placas/mm³), seguido del subículo (1331 placas/mm³), GD (303 placas/mm³) y CA3 (240 placas/mm³) (**Tabla 4, Figura 29A**). En concreto, CA1 y subículo presentaron la mayor densidad de placas por volumen. Los resultados sobre el volumen ocupado por las placas mostraron que también CA1 y subículo presentaron la mayor proporción (entre 4-6%), comparado con el GD (2 %) y CA3 (1 %) (**Figura 29**). Por el contrario, encontramos que el volumen medio de las placas fue mayor en el GD (52350 μm^3), seguido del subículo (51979 μm^3), CA3 (41670 μm^3) y CA1 (30805 μm^3 ; **Figura 29**).

En resumen, CA1 y subículo, que mostraron un mayor número de placas A β -ir por volumen, también mostraron los valores más altos de tejido ocupado por placas, aunque el tamaño de las mismas era relativamente pequeño. Por el contrario, el GD y CA3 mostraron el número más bajo de placas por volumen, y aunque eran mayores en tamaño, el volumen relativo ocupado por las placas en estas regiones fue menor que en CA1 y subículo.

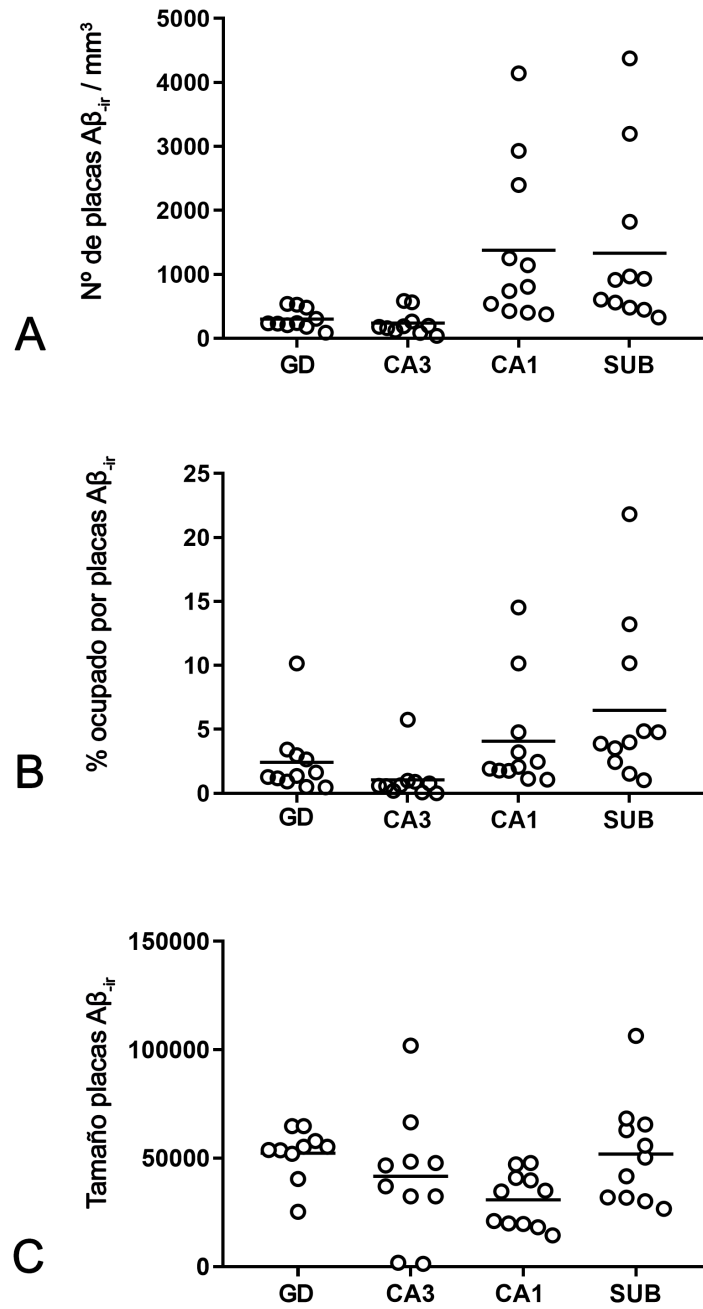


Figura 29. Gráficos para ilustrar las variables estimadas de las placas $A\beta_{-ir}$ en las áreas hipocampales analizadas. **A:** Número medio de placas $A\beta_{-ir}$ por volumen. **B:** Volumen medio ocupado por placas $A\beta_{-ir}$. **C:** Estimación del volumen medio de placas $A\beta_{-ir}$. GD: giro dentado; CA3-CA1: campos amónicos; SUB: subículo.

4.3.2. Caracterización de la expresión de placas $A\beta_{-ir}$

Con el fin de completar el análisis de la región CA1, se estudió la co-localización de la inmunorreactividad frente a $A\beta$ y PHF_{Tau} en placas de los pacientes con EA. Las placas se estudiaron tanto en secciones con doble marcaje inmunofluorescente: $A\beta/PHF_{Tau-AT8}$, $A\beta/PHF_{Tau-pS396}$ y $PHF_{Tau-AT8}/PHF_{Tau-pS396}$, como en secciones con triple marcaje (Methoxy-X04/anti- $PHF_{Tau-AT8}$ /anti- $PHF_{Tau-pS396}$). Como se mencionó en el apartado 3.3 de **Material y Métodos**, la tinción con Methoxy-X04 permite para la visualización de placas en tejido de pacientes con EA (**Figura 30**).

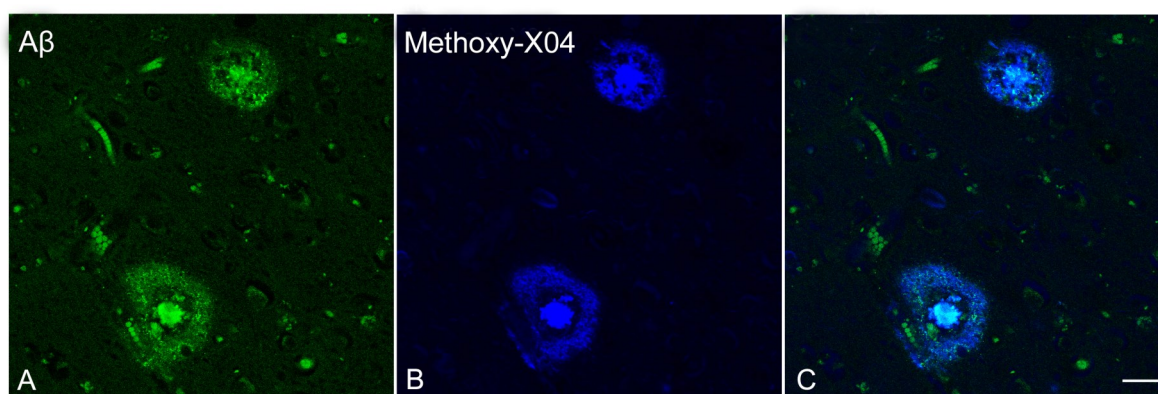


Figura 30. Proyecciones de pilas de imágenes para ilustrar la visualización de placas mediante doble marcaje $A\beta$ (A) y Methoxy-X04 (B). Como puede apreciarse en C, la placa se visualiza claramente con ambos marcadores. Barra de escala (en C): 50 μ m.

En primer lugar, se analizaron las imágenes con los dobles marcajes: $A\beta/PHF_{Tau-AT8}$, $A\beta/PHF_{Tau-pS396}$ y $PHF_{Tau-AT8}/PHF_{Tau-pS396}$, en 6 de los pacientes con EA. El estudio completo de CA1 se realizó con el software Zen, que permite la localización e identificación en tres dimensiones de las placas marcadas en todos los canales adquiridos, con un área de entre 1.14 a 8.8 mm² por caso. A continuación, se examinó la co-expresión de $A\beta$ con $PHF_{Tau-pS396}$ y $A\beta$ con $PHF_{Tau-AT8}$.

Se analizaron un total de 251 placas en las secciones doblemente marcadas para $A\beta/PHF_{Tau-pS396}$. La mayoría de ellas, un 93%, presentaban $A\beta$, incluyendo las que expresaban únicamente $A\beta$ (44%), y las que mostraban marcaje tanto para $A\beta_{-ir}$ como para $PHF_{Tau-pS396-ir}$ (49%; **Tabla 7, Figura 31**). Solamente el 7% de las placas no mostraron marcaje para $A\beta$, siendo únicamente identificadas con anti- $PHF_{Tau-pS396}$.

En el caso de las secciones doblemente marcadas para $A\beta/PHF_{Tau-AT8}$, se analizaron un total de 183 placas, de las cuales el 84% fueron identificadas con anti- $A\beta$ (incluyendo el 57% que expresaban solamente $A\beta$ y el 27% que expresaban ambos marcadores $A\beta/PHF_{Tau-AT8}$), mientras que un 16% de las placas fueron identificadas solamente con anti- $PHF_{Tau-AT8}$ (**Tabla 7, Figura 31 y Figura 32**).

Tabla 7. Número de placas en CA1, por caso, analizadas en secciones doblemente marcadas. Se emplearon tres combinaciones distintas de anticuerpos: A β /PHF_{Tau-AT8}, A β /PHF_{Tau-PHF1} y PHF_{Tau-AT8}/PHF_{Tau-pS396}. En la combinación PHF_{Tau-AT8}/PHF_{Tau-pS396}, todas las placas analizadas expresaban ambas isoformas (PHF_{Tau-AT8} y PHF_{Tau-pS396}). ND: Dato no disponible.

Paciente	A β /PHF _{Tau-AT8}			A β /PHF _{Tau-pS396}			PHF _{Tau-pS396} / PHF _{Tau-AT8}		Total placas
	A β -ir / PHF _{Tau-AT8} -ir	A β -ir	PHF _{Tau} -AT8 -ir	A β -ir / PHF _{Tau} - pS396-ir	A β -ir	PHF _{Tau} - pS396-ir	PHF _{Tau} -pS396-ir	PHF _{Tau} - pS396-ir/ PHF _{Tau} - AT8-ir	
Az1	6	7	8	ND	ND	ND	ND	ND	21
Az2	5	21	5	13	19	2	2	24	89
Az3	ND	ND	ND	38	23	11	11	68	140
Az4	4	13	1	6	24	0	0	15	63
Az5	30	1	13	42	5	3	3	59	153
Az6	5	62	2	24	40	1	1	23	157
No. total de placas	50 (27%)	104 (57%)	29 (5%)	123 (49%)	111 (44%)	111 (44%)	17 (7%)	189 (100%)	623

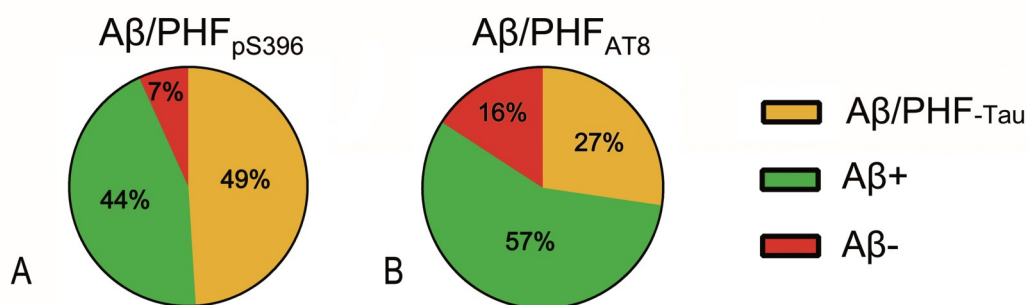


Figura 31. Gráfico circular para mostrar los porcentajes de placas marcadas en los análisis de secciones doblemente marcadas. **A:** A β /PHF_{Tau-PHF1}. **B:** A β /PHF_{Tau-AT8}. Ambos análisis ilustran una mayor proporción de placas A β -ir y una menor proporción de placas A β -ir negativas.

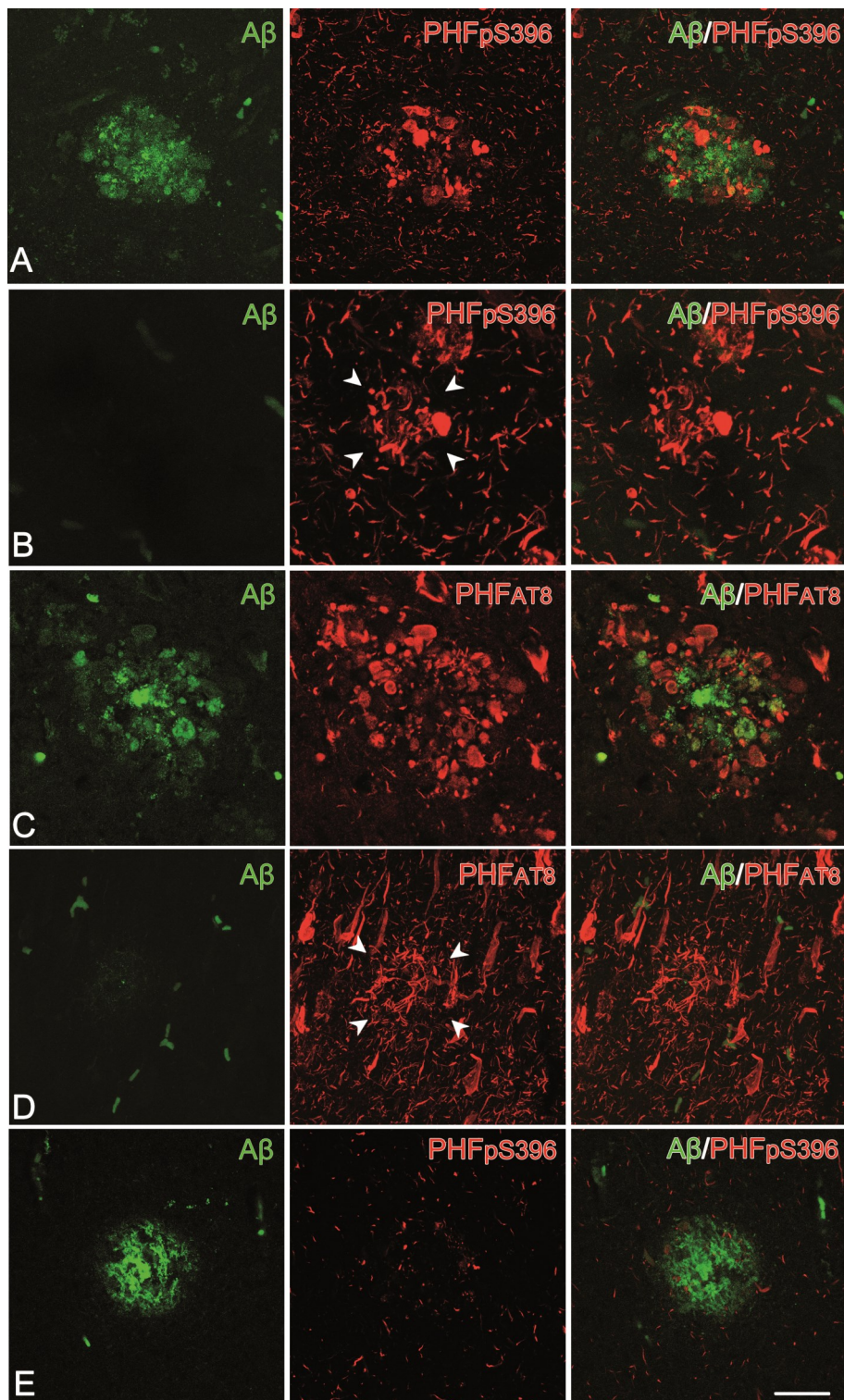


Figura 32. Placas en secciones hipocámpales doblemente teñidas. **A, B, E:** Proyecciones de pilas de imágenes de confocal tomadas de secciones doblemente teñidas para $A\beta$ /PHF_{Tau-pS396}. **C, D:** Proyecciones de pilas de imágenes de confocal tomadas de secciones doblemente teñidas para $A\beta$ /PHF_{Tau-AT8}. Las placas que expresan $A\beta$ y PHF_{Tau-AT8}, así como $A\beta$ y PHF_{Tau-pS396} se muestran en **A** y **C**, respectivamente. En **B** se ilustran las placas que expresan solamente PHF_{Tau-pS396} y en **D**, las que expresan solamente PHF_{Tau-AT8}. Una placa que expresa solamente anti- $A\beta$ se muestra en **E**. Barra de escala (en **E**): 50 μ m.

Puesto que se observaron placas que no expresaban $A\beta_{ir}$, el siguiente paso fue analizar secciones doblemente marcadas mediante la combinación de los anticuerpos anti-PHF_{Tau-AT8} y anti-PHF_{Tau-pS396}. Identificamos un total de 189 placas, de las cuales todas, el 100%, se marcaron para ambos anticuerpos PHF_{Tau} (**Tabla 7**). Puesto que las secciones marcadas con PHF_{Tau-AT8}/PHF_{Tau-pS396} mostraban el 100% de co-localización, cualquier placa visualizada con alguno de los dos anticuerpos frente a una de las isoformas expresaría también la otra.

En resumen, los análisis de las secciones con marcajes dobles indicaban que la mayoría de las placas de CA1 eran $A\beta_{ir}$ (89%), y las pocas que no contenían $A\beta$, expresaban los anticuerpos anti-PHF_{Tau-pS396} (en un 7%) y anti-PHF_{Tau-AT8} (en un 16%).

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos en secciones doblemente marcadas, analizamos las imágenes obtenidas de las secciones con triple marcaje para Methoxy-X04/anti-PHF_{Tau-AT8}/anti-PHF_{Tau-pS396}, en todos los pacientes con EA (Az1-Az11). Para ello, se analizaron individualmente un total de 113 placas, de las cuales el 75% no expresaron ninguna isoforma de PHF_{Tau} y presentaron únicamente marcaje con Methoxy-04 (**Tabla 8, Figura 33**) Sin embargo, el 25% de las placas marcadas con Methoxy-X04 mostraron triple marcaje (Methoxy-X04/anti-PHF_{Tau-pS396}/anti-PHF_{Tau-AT8}), es decir, estas placas expresaban ambas isoformas de PHF_{Tau} y $A\beta$ simultáneamente.

Tabla 8. Número de placas en CA1, por caso, analizadas en secciones triplemente marcadas para Methoxy-X04, anti-PHF_{Tau-AT8} y anti-PHF_{Tau-pS396}. Los números entre paréntesis representan los porcentajes relativos de las placas analizadas.

Paciente	Methoxy-X04/ PHF _{Tau-AT8-ir} / PHF _{Tau-pS396-ir}	Methoxy-X04/ PHF _{Tau-AT8-ir}	Methoxy-X04/ PHF _{Tau-pS396-ir}	PHF _{Tau-AT8-ir} / PHF _{Tau-pS396-ir}	Methoxy X-04	Total placas
Az1	3	0	0	0	7	10
Az2	3	0	0	0	4	7
Az3	4	0	0	0	5	9
Az4	2	0	0	0	11	13
Az5	9	0	0	0	3	12
Az6	1	0	0	0	8	9
Az7	2	0	0	0	6	8
Az8	2	0	0	0	8	10
Az9	0	0	0	0	17	17
Az10	2	0	0	0	9	11
Az11	0	0	0	0	7	7
Total	28 (25%)	0	0	0	85 (75%)	113

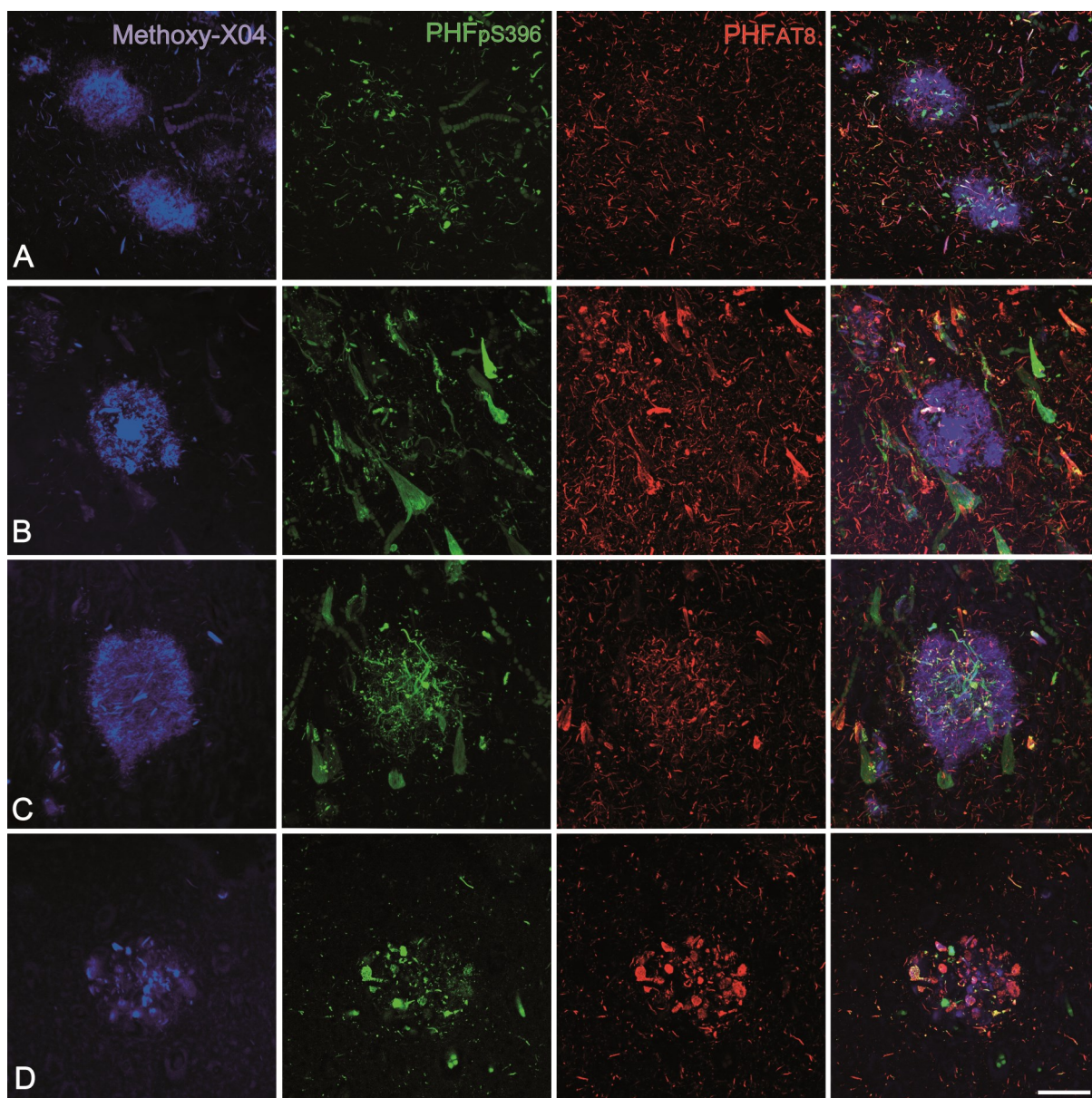


Figura 33. Proyecciones de pilas de imágenes de microscopía confocal tomadas de secciones hipocampales triplemente marcadas (Methoxy-X04/PHF_{Tau-AT8}/PHF_{Tau-pS396}). **A, B:** las placas no expresan ninguna isoforma anti-PHF_{Tau}, pero sí muestran marcaje para Methoxy-X04 que indica la presencia de A β . **C, D:** ejemplos de placas que expresan los tres marcadores (Methoxy-X04/PHF_{Tau-AT8}/PHF_{Tau-pS396}). Barra de escala (en **D**): 50 μ m.

4.3.2.1. Morfología de las placas A β -ir

Con el fin de determinar las características morfológicas de las placas analizadas, se examinaron todas las placas que contenían A β de las secciones con doble (A β /PHF_{Tau-AT8}, A β /PHF_{Tau-pS396}) y triple marcaje (Methoxy-X04/anti-PHF_{Tau-pS396}/anti-PHF_{Tau-AT8}). Es decir, un total de 500 placas, de las cuales 387 fueron obtenidas de dobles marcajes, y 113 placas de las secciones con triple marcaje. Todas las placas mostraron depósitos de A β que permitieron clasificarlas, según un estudio previo (García-Marín et al., 2009), en dos tipos:

- placas con un círculo denso y un núcleo fuertemente marcado, o con una región central rodeada por un marcaje más débil en forma de halo, se clasificaron como “placas neuríticas con núcleo central”.
- placas sin un centro diferenciado, se consideraron “placas neuríticas sin núcleo central”.

En el presente estudio, el 13% de las placas se identificaron como neuríticas con núcleo central, mientras que un 87% como neuríticas sin núcleo central. Estas proporciones fueron independientes de su marcaje, es decir, el tipo de placa no correspondía con una combinación determinada de marcadores (χ^2 test, $p > 0.5$; **Tabla 9**).

Tabla 9. Número de placas analizadas en CA1 acorde a su marcaje (en secciones doble y triplemente marcadas), así como la morfología de las mismas, clasificadas como “neuríticas con núcleo central” y “neuríticas sin núcleo central”. Los números entre paréntesis representan los porcentajes relativos de las placas analizadas.

Co-localización	Con núcleo central	Sin núcleo central
A β -ir /PHF _{Tau-AT8-ir}	6 (12.2%)	43 (87.8%)
A β -ir	14 (13.5%)	90 (86.5%)
A β /PHF _{Tau-pS396}	15 (12.2%)	108 (87.8%)
A β -ir	11 (10%)	100 (90%)
Methoxy-X04/PHF _{Tau-AT8} /PHF _{Tau-pS396}	4 (14.3%)	24 (85.7%)
Methoxy-X04	11 (12.9%)	74 (87.1%)
Total	61 (12.2%)	439 (87.8%)

4.3.3. Distribución de las placas $A\beta_{-ir}$

Además de la caracterización de las placas en función de los marcadores expresados, se realizó un estudio de la distribución de las mismas en secciones doblemente marcadas usando tres diferentes combinaciones: $A\beta$ /PHF_{Tau-AT8}, $A\beta$ /PHF_{Tau-pS396} y PHF_{Tau-AT8}/PHF_{Tau-pS396}.

Para ello, la región CA1 fue dividida arbitrariamente en tres partes iguales: proximal (cerca de CA2), medial y distal (cercano al subículo). Además, las placas fueron categorizadas según su posición en los distintos estratos de CA1: *stratum oriens*, *stratum pyramidale*, *stratum radiatum* y *stratum lacunosum-moleculare*. No obstante, no se observaron placas en este estrato en ningún caso (**Figura 34**). De acuerdo a estos criterios, se estableció la localización exacta de cada placa dentro de la región CA1 (**Figura 35**).

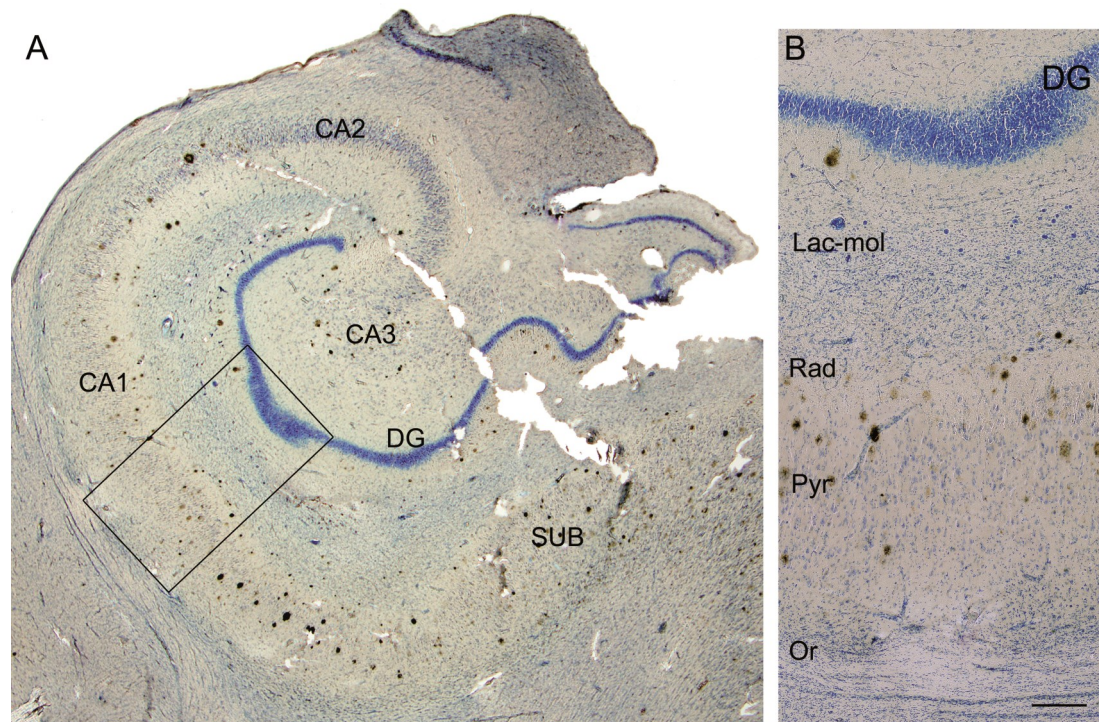


Figura 34. Microfotografía de la formación hipocámpal de un paciente con EA, de una sección doblemente teñida para Nissl y anti- $A\beta$. **A:** Microfotografía a bajo aumento para ilustrar las distintas regiones hipocámpales. **B:** Mayor aumento del área marcada en A, mostrando la distribución de las placas por capas en la región CA1 (Lac-mol: estrato *lacunosum-moleculare*; Rad: estrato *radiatum*; Pyr: estrato *pyramidale*; Or: estrato *oriens*. GD: giro dentado; CA1-CA3: campos amónicos; SUB: subículo. Barra de escala 1000 μ m (en **B**); 860 μ m (en **A**).

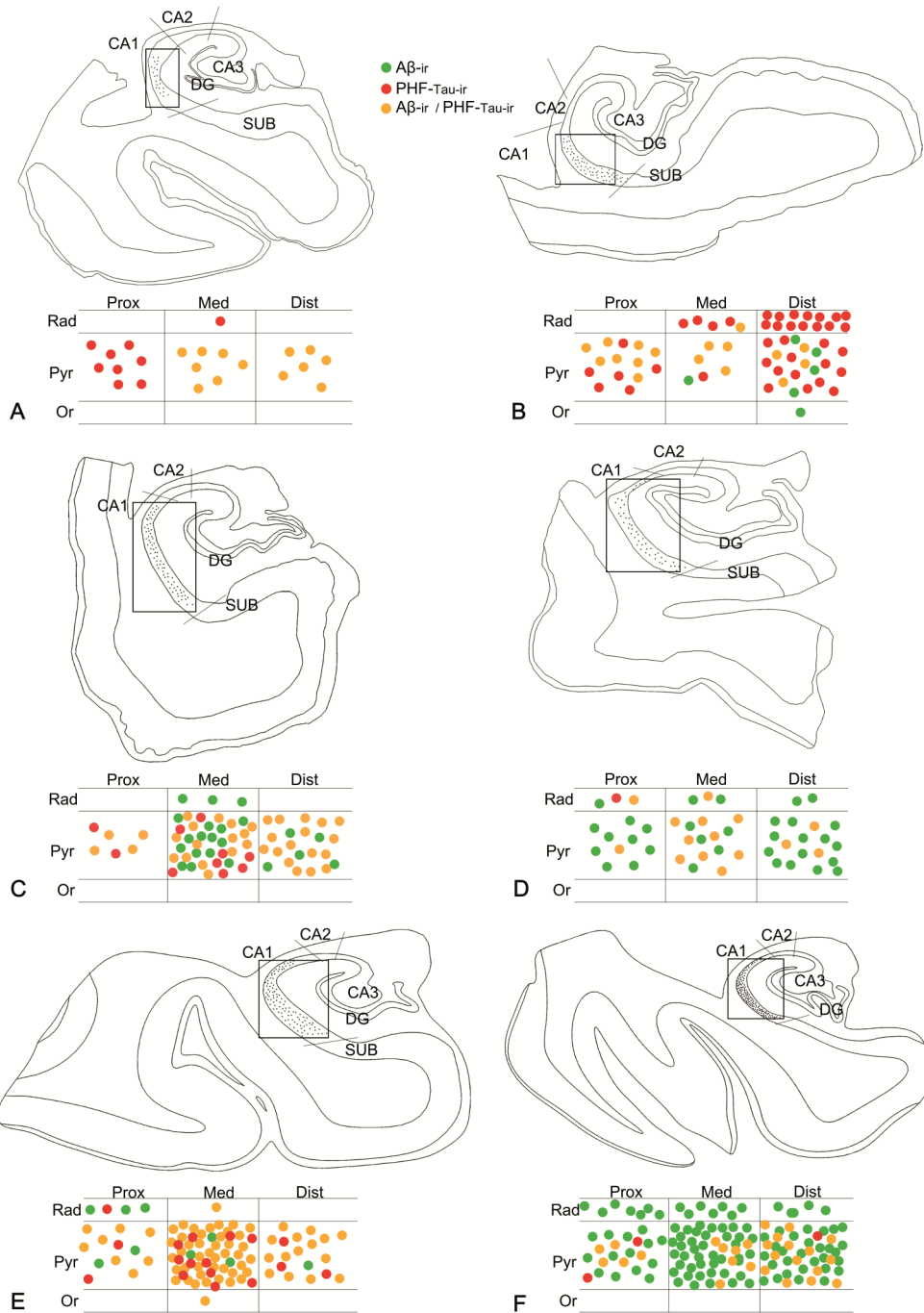


Figura 35. Mapas de la formación hipocampal de pacientes con EA para ilustrar la distribución de placas y los patrones de marcaje en CA1. Los dibujos se basan en el análisis de secciones doblemente marcadas para anti-A β y anti-PHF_{Tau}. Los límites entre las áreas hipocampales se indican con líneas, mientras que CA1 está marcado con un rectángulo. Debajo de cada perfil, CA1 se muestra de manera esquemática con sus correspondientes subregiones y capas. Los puntos verdes corresponden a placas A β -ir, los puntos rojos a placas PHF_{Tau}-ir (PHF_{Tau}-AT8 o PHF_{Tau}-pS396), y los puntos amarillos indican placas que expresan tanto la proteína A β como la proteína PHF_{Tau}. A-F: Dibujos representativos de los pacientes Az1, Az2, Az3, Az4, Az5 y Az6, respectivamente. GD: giro dentado; CA1-CA3: campos amónicos; SUB: subículo; Prox: proximal; Med: medial; Dist: distal; Or: estrato *oriens*; Pyr: estrato *pyramidale*; Rad: estrato *radiatum*. Barra de escala (en F): 2000 μ m.

La mayoría de las placas (41%) se localizaron en la porción medial de la capa piramidal de CA1, seguido de la porción distal de CA1 (37%) y la porción proximal (22%; **Tabla 10**). Por tanto, la distribución de las placas fue similar a la distribución de las neuronas PHF_{Tau-ir} descrita en la sección 4.2.3. Asimismo, la capa piramidal contenía la mayoría de las placas (84%), mientras que en el estrato oriens, las placas eran escasas (1%), lo que coincidía con estudios previos (Hegglund et al. 2015).

Tabla 10. Resumen de las placas identificadas en la región CA1 según su localización en subregiones y capas. Los datos representan el número de placas marcadas con A β /PHF_{Tau-AT8}, A β /PHF_{Tau-pS396} o PHF_{Tau-AT8}/PHF_{Tau-pS396}; ver **Tabla 7** para más detalles. Los números entre paréntesis indican sus porcentajes relativos.

	Estrato <i>Oriens</i>	Estrato <i>Pyramidale</i>	Estrato <i>Radiatum</i>	Total
Proximal	0	113	25	138 (22%)
Medial	1	215	38	254 (41%)
Distal	6	194	31	231 (37%)
Total	7 (1%)	522 (84%)	94 (15%)	623 (100%)

4.4. Análisis multidimensional

La aplicación de un análisis multidimensional, incluyendo las variables histológicas analizadas, así como las variables clínicas y otros datos de los pacientes con EA, permitió explorar las posibles relaciones entre las diferentes variables.

4.4.1. Validación de la herramienta InTool Explorer

Los datos obtenidos de las estimaciones estereológicas, así como aquellos derivados de la caracterización de neuronas PHF_{Tau-ir} y placas A β _{ir} y, las variables clínicas de los pacientes fueron empleados para poner a prueba e ilustrar la utilidad de la herramienta InTool Explorer.

La visualización de los datos estereológicos mediante el gráfico de coordenadas paralelas permitió observar rápidamente la variabilidad interindividual en la variable “Neuronas NeuN_{ir}/mm³” (**Figura 36**). La herramienta permite explorar, en el mismo gráfico, determinados rangos de valores que se quieran visualizar, asignándoles además un color diferente sin necesidad de acceder a la tabla original de los datos (**Figura 36A**). Asimismo, la herramienta permite añadir cualquier otra variable, como “Regiones”, optimizando la interacción

y la exploración inmediata (**Figura 36B**). La selección de un determinado rango de valores como, por ejemplo, las densidades neuronales por encima de la media, permite visualizar a qué pacientes y regiones corresponden dichos valores (**Figura 36C**).

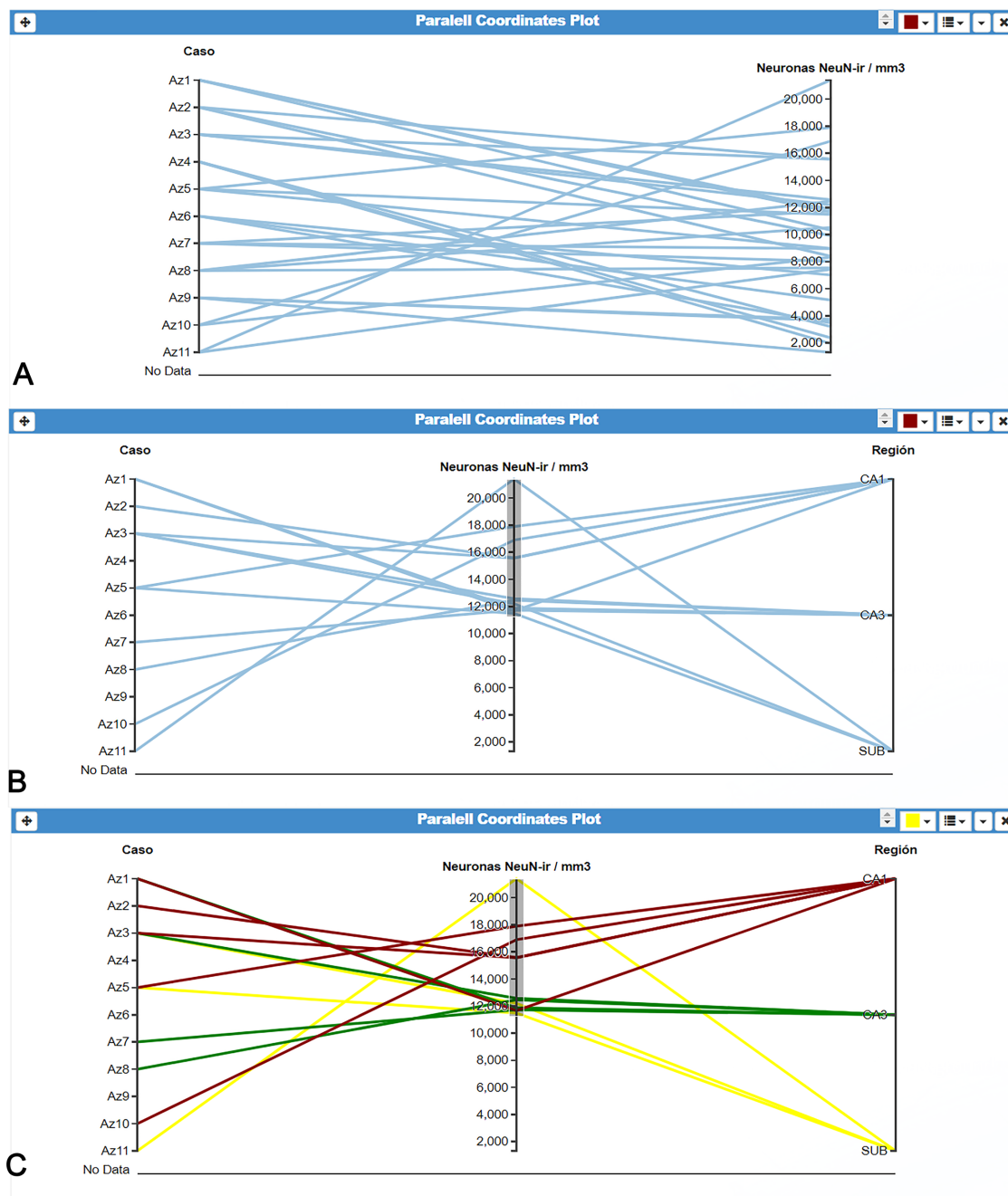


Figura 36. Gráficos de coordenadas paralelas mostrando la densidad neuronal de pacientes con EA. **A:** Relación entre “Neuronas NeuN_{ir}/mm³” y “Caso”. **B:** Selección de valores por encima de la media de la variable “Neuronas NeuN_{ir}/mm³” y su relación con la variable “Región”. **C:** Visualización selectiva de cada región mediante diferentes colores. CA1-CA3: campos amónicos; SUB: subículo.

La posibilidad de visualizar, de una manera rápida, características particulares de los pacientes, ofrece una exploración en profundidad de la variabilidad interindividual o de los valores atípicos de una variable, así como posibles relaciones con las cuantificaciones histopatológicas, produciendo un análisis integrado. Para ilustrar esta utilidad, se exploró la relación entre la variable “Neuronas NeuN_{-ir}/mm³” y las características clínicas “Progresión de la enfermedad” y “Estadio de Braak” (**Figura 37**). Sin embargo, no se encontraron relaciones entre el estadio de Braak y los años de duración de la enfermedad.

Otro ejemplo fue la visualización conjunta de “Neuronas NeuN_{-ir}/mm³”, “Neuronas AT8_{-ir}/mm³” y “Neuronas pS396_{-ir}/mm³”, por paciente y región analizada. Tal y como se observó en los resultados obtenidos de las estimaciones estereológicas, el GD y CA3 fueron las regiones con menor densidad de neuronas con patología neurofibrilar (**Figura 38A, B**), mientras que CA1, seguido del subículo, presentaron una mayor densidad de neuronas PHF_{Tau-ir}, así como una mayor variabilidad entre los pacientes (**Figura 38C, D**). Además, se observó que el rango de valores de la variable PHF_{Tau-AT8} era inferior al rango de valores de la variable PHF_{Tau-pS396}, presentando también más variabilidad entre los pacientes. Por último, el límite superior del rango de valores de la variable PHF_{Tau-pS396} es superior al rango de valores de la variable “Neuronas Nissl/mm³”, y prácticamente alcanza el rango de valores de la variable “Neuronas NeuN_{-ir}/mm³”, sugiriendo que una población neuronal solamente expresa PHF_{Tau-pS396}, tal y como se reflejó en los análisis estadísticos previos.

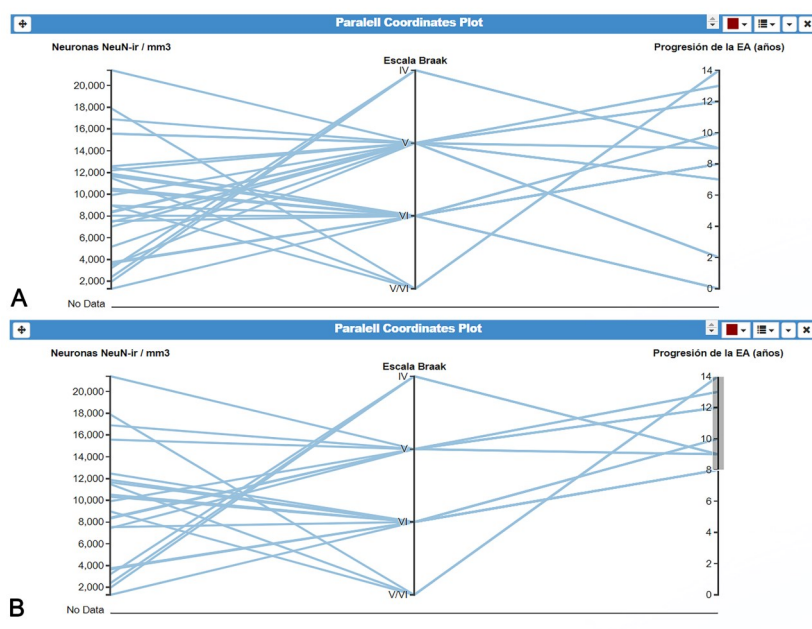


Figura 37. Gráficos de coordenadas paralelas para visualizar variables cuantitativas y categóricas de pacientes con EA. **A:** Las relaciones pueden establecerse entre variables cuantitativas como “Neuronas NeuN_{-ir}/mm³” y “Progresión de la EA (años)”, y variables categóricas como “Escala de Braak”. **B:** selección de un rango de datos en la variable “Progresión de la EA (años)”.

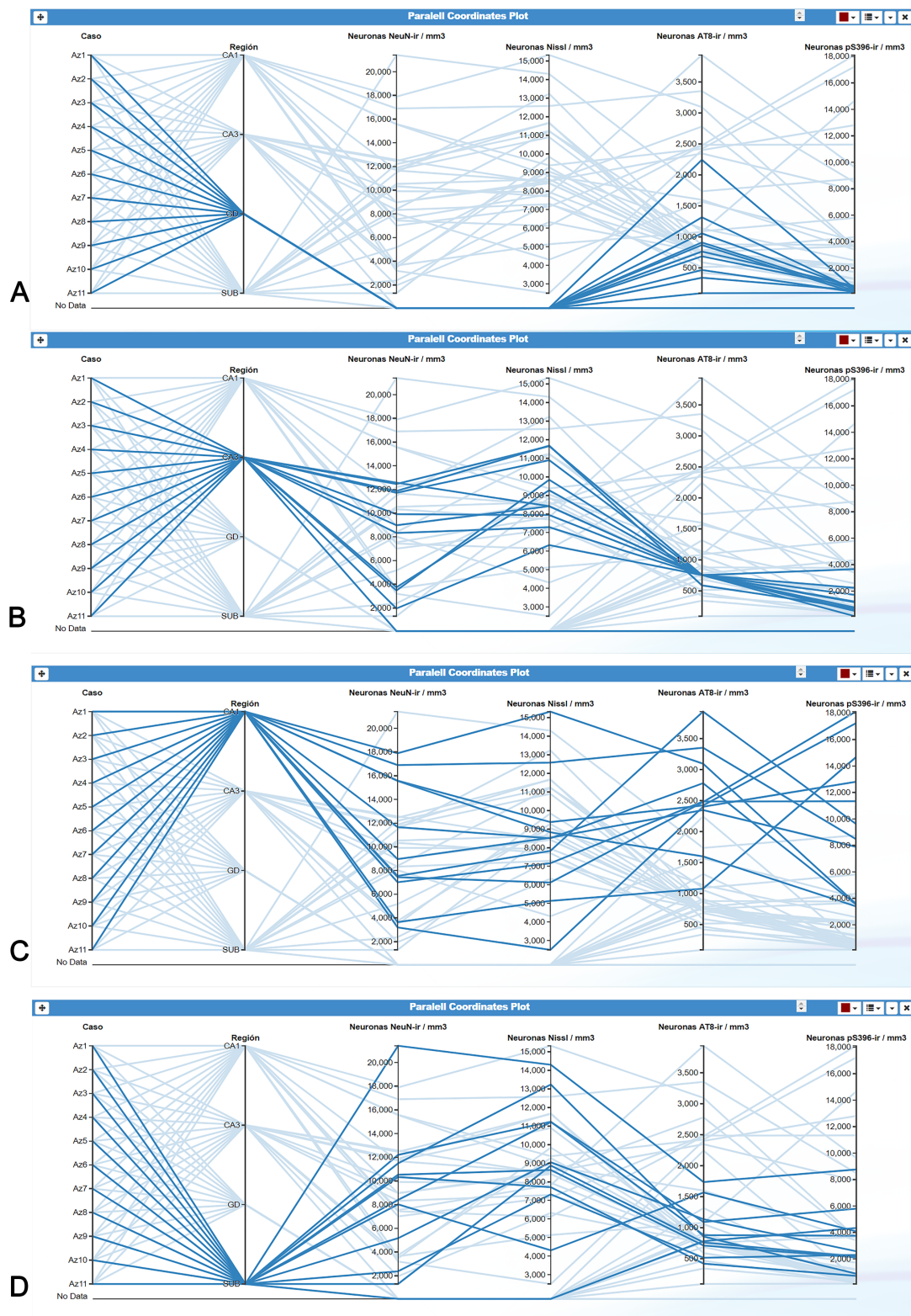


Figura 38. Gráficos de coordenadas paralelas para ilustrar la visualización conjunta de “Neuronas NeuN_{ir}/mm³”, “Neuronas AT8_{ir}/mm³” y “Neuronas pS396_{ir}/mm³”, por paciente y región analizada. Al seleccionar una determinada región, se seleccionan todos los valores asociados a ella, obteniendo rápidamente una imagen de la distribución de las distintas densidades entre todas las regiones analizadas.

Además, se añadieron las variables: “Placas $A\beta_{-ir}$ /mm³”, “% ocupado por placas $A\beta_{-ir}$ ” y el “Tamaño placas $A\beta_{-ir}$ ”, con el fin de visualizar conjuntamente la densidad total de neuronas y todas las variables histopatológicas. Se seleccionó cada región y se observó que tanto el número de placas $A\beta_{-ir}$ como el porcentaje de tejido que ocupaban las placas, eran más bajos en el GD y CA3, mientras que, en CA1 y en el subículo, los valores eran más altos y más variables. Sin embargo, el tamaño de las placas $A\beta_{-ir}$ fue mayor en la región del GD, CA3 y subículo, mientras que los valores más bajos se encontraban en CA1 (Figura 39). Por tanto, CA1 se visualizó como la región más afectada por la presencia de ambas proteínas.

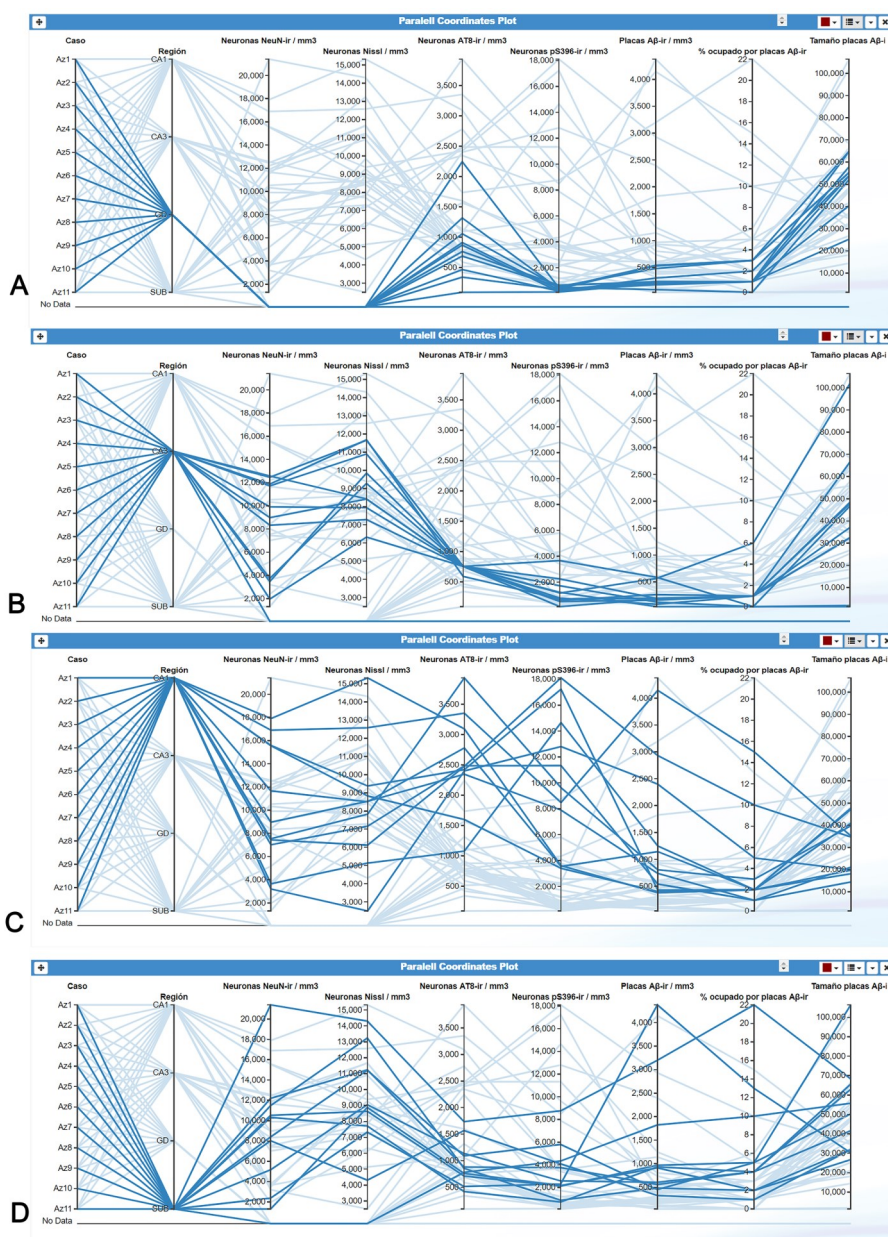


Figura 39. Gráficos de coordenadas paralelas para ilustrar la visualización conjunta de las densidades neuronales, de neuronas PHF_{Tau-ir} (tanto PHF_{Tau-AT8-ir} como PHF_{Tau-pS396-ir}), y de placas $A\beta_{-ir}$, así como el porcentaje de tejido ocupado y el tamaño de las mismas, por paciente y región analizada.

Los análisis estadísticos de distribución de frecuencias y de comparación de las densidades neuronales obtenidas de las secciones marcadas con el método de Nissl, anti-NeuN, anti-PHF_{Tau-AT8} y anti-PHF_{Tau-pS396}, así como de densidad de placas A β _{ir} (véase sección 3.5 de Material y Métodos), corroboraron los hallazgos que se observaron en todas las visualizaciones.

En resumen, los datos obtenidos de las estimaciones estereológicas pueden ser visualizados de una manera rápida y eficaz gracias al gráfico de coordenadas paralelas.

4.4.2. Visualización de nuevas relaciones

Las coordenadas paralelas se caracterizan, principalmente, por las posibilidades de interacción entre variables. La más utilizada es el *brushing* en las dimensiones cuantitativas: cuando el usuario selecciona un rango de valores, sólo se mostrarán las filas que tengan esos valores seleccionados en dicha columna. Esto permite obtener posibles relaciones muy específicas entre las variables. Otra interacción que soporta por este gráfico es la capacidad de mover los ejes de las variables con el fin de reordenarlos y revelar posibles relaciones solo visibles entre dimensiones contiguas. Si se detectan evidencias de posibles relaciones, el siguiente paso sería contrastarlas creando una tarjeta de visualización de un gráfico de dispersión, siendo el más indicado para identificar posibles correlaciones entre dos variables cuantitativas. Además, en el gráfico de dispersión, al seleccionar cualquier valor, se ofrece información adicional acerca de ese dato concreto (**Figura 20**). Por otro lado, tanto los diagramas de coordenadas paralelas como el gráfico de barras radiales pueden reorganizar automáticamente los datos mostrados cuando los usuarios seleccionan sus propios criterios. Por último, para comprar posibles diferencias en la distribución de variables cuantitativas según las diferentes categorías de otra variable categórica, se utilizaría el gráfico de cajas.

La cuantificación de densidades neuronales mostró que CA1 es la región con mayores densidades de neuronas marcadas con anticuerpos frente a las isoformas de PHF_{Tau} y placas de A β . Por tanto, se exploró esta región valorando las particularidades de cada paciente, como la edad del diagnóstico o la duración de la enfermedad.

Para observar qué variables y pacientes se relacionan con los valores más altos de densidad neuronal en CA1, se seleccionó un determinado rango de valores (10.000 – 15.000 neuronas por volumen; **Figura 40**), y permitió observar que el paciente Az10 (destacado con color marrón) era el único paciente cuya densidad de placas A β _{ir} por volumen en CA1 era superior al resto de pacientes. Además, la edad de diagnóstico de este paciente fue relativamente temprana comparado con el resto de los pacientes, y con una duración de la enfermedad de aproximadamente 9 años (**Figura 40A**). Por tanto, InTool Explorer facilita la ob-

servación de una información detallada de los pacientes respecto a su información clínica y las características histopatológicas.

Asimismo, se exploraron los pacientes que presentaban mayores densidades neuronales en la región CA1, y que además presentaban los valores más bajos de densidad de placas $A\beta_{-ir}$ (Figura 40B). Así, se observó que solamente el paciente Az5 (destacado con el color verde) mostraba una alta densidad de neuronas por volumen en la región CA1 y que, además, correspondía a una baja densidad tanto de neuronas PHF_{Tau-ir} como de placas $A\beta_{-ir}$. Este paciente se diagnosticó a una edad temprana y la duración de la enfermedad fue de 14 años. Por tanto, estos datos sugieren una particularidad del paciente Az5 respecto al resto de pacientes que sí mostraron una baja densidad neuronal en la región CA1. El resto de los pacientes que se encuentran en el rango de valores seleccionados pertenecen a la región CA3 (Figura 40).

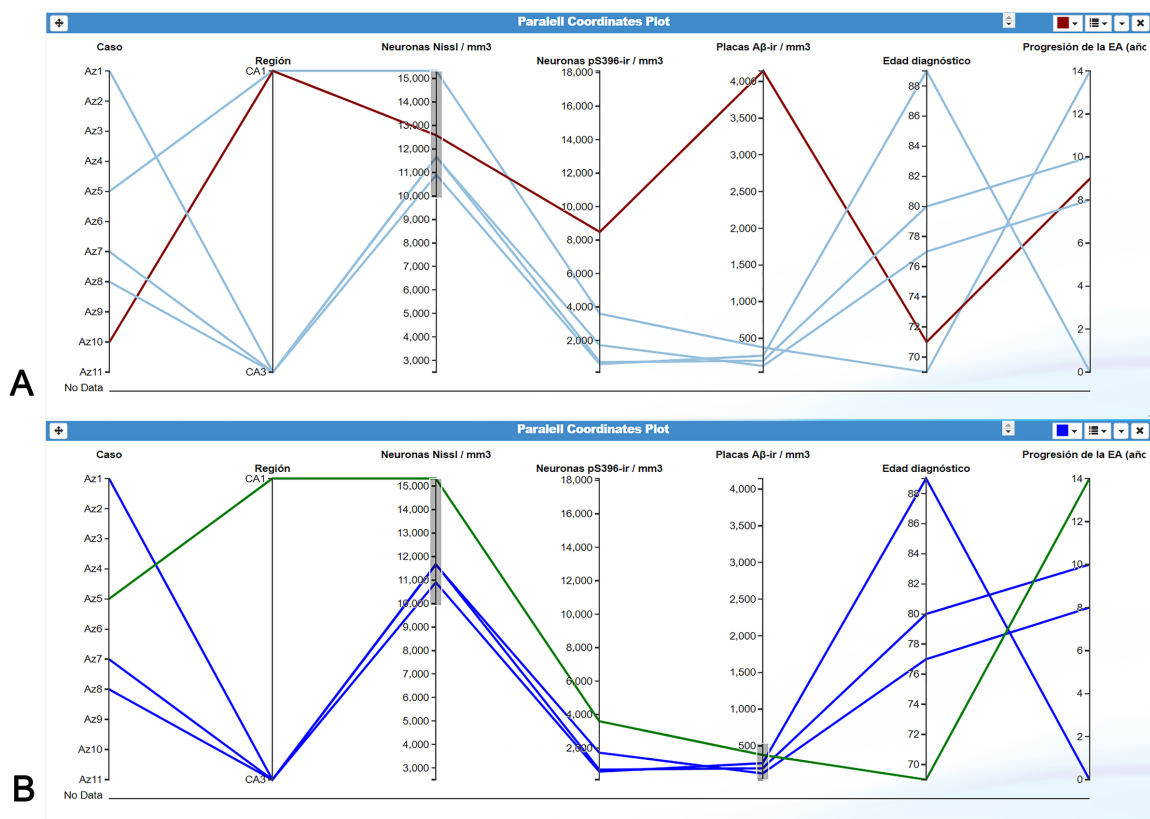


Figura 40. Gráficos de coordenadas paralelas para ilustrar una exploración de datos específicos de diferentes variables en la región CA1. **A:** al seleccionar las “Neuronas Nissl/mm³” por encima de la media, se observa que el paciente Az10 (destacado con color marrón) muestra una densidad de placas $A\beta_{-ir}$ por volumen en CA1 superior al resto de pacientes. **B:** las coordenadas paralelas permiten seleccionar más de un rango de datos en variables cuantitativas (“Neuronas Nissl/mm³” por encima de la media y densidad baja de “Placas $A\beta_{-ir}$ /mm³”). En este caso, se observó que el paciente Az5 (destacado con el color verde) muestra una alta densidad de neuronas por volumen en la región CA1 y que corresponde a una baja densidad tanto de neuronas PHF_{Tau-ir} como de placas $A\beta_{-ir}$.

Por otro lado, se exploraron las características neuropatológicas de los pacientes con EA que presentaban esclerosis del hipocampo. La comparación de las densidades neuronales medias entre el grupo control y los pacientes con EA reveló diferencias significativas mostrando una disminución en estos últimos. El gráfico de coordenadas paralelas permitió seleccionar cada paciente con esclerosis del hipocampo asignándole un color distinto. De esta manera, se observó que sus densidades neuronales por volumen son inferiores al resto de pacientes con EA (**Figura 41**). No obstante, los valores referentes a las variables patológicas (PHF_{Tau} y $\text{A}\beta$) se encontraban dentro de la media del resto de pacientes.

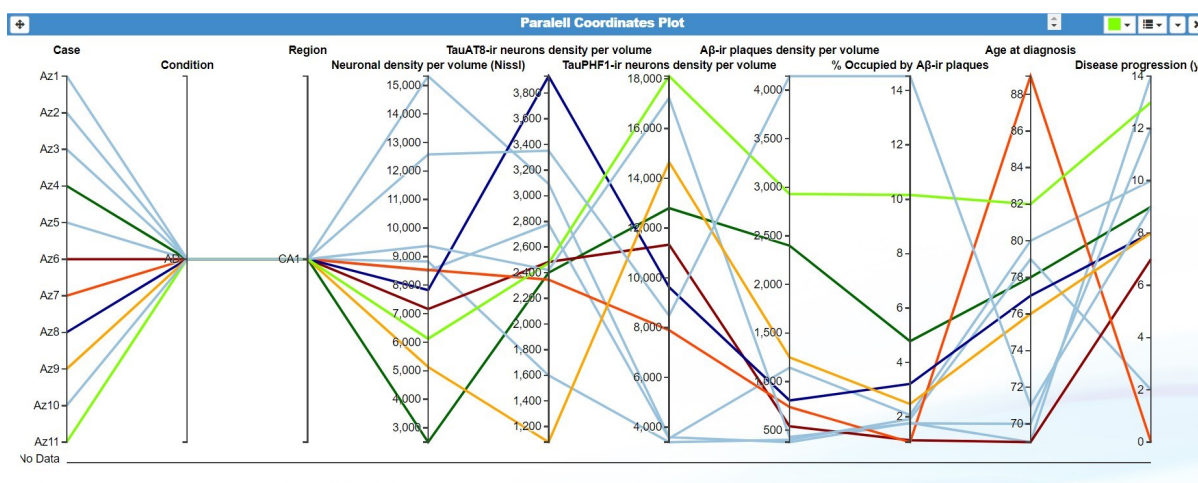


Figura 41. Gráfico de coordenadas paralelas para ilustrar, con distintos colores, los pacientes con EA que muestran esclerosis del hipocampo en CA1. Las densidades neuronales de estos pacientes son inferiores al resto de pacientes con EA.

También se exploró la posible relación entre los porcentajes de expresión de las proteínas PHF_{Tau} y $\text{A}\beta$ en neuronas y placas, obtenidos del estudio de microscopía confocal y descritos en los apartados 4.2.2 y 4.3.2, respectivamente. Para ello, en la variable “% placas $\text{A}\beta_{\text{-ir}}$ ” (es decir, porcentaje de placas que solamente expresan la proteína $\text{A}\beta$) se seleccionó un rango superior al 70% de placas $\text{A}\beta_{\text{-ir}}$ y se observó que los valores tienden a relacionarse con porcentajes bajos de neuronas $\text{PHF}_{\text{Tau-AT8-ir}}/\text{PHF}_{\text{Tau-pS396-ir}}$ y porcentajes bajos de placas $\text{A}\beta_{\text{-ir}}/\text{PHF}_{\text{Tau-ir}}$, pero con porcentajes altos de neuronas $\text{PHF}_{\text{Tau-pS396-ir}}$ (**Figura 42B**). Es decir, los casos con más placas $\text{A}\beta_{\text{-ir}}$, tienen menos placas que expresen tanto $\text{A}\beta_{\text{-ir}}$ como $\text{PHF}_{\text{Tau-ir}}$, así como una menor co-expresión entre $\text{PHF}_{\text{Tau-AT8-ir}}$ y $\text{PHF}_{\text{Tau-pS396-ir}}$ en neuronas $\text{PHF}_{\text{Tau-ir}}$. En otra selección de valores, se eligieron los porcentajes más bajos de placas que expresaban solamente $\text{A}\beta$, observándose una posible relación con un mayor porcentaje de neuronas $\text{PHF}_{\text{Tau-AT8-ir}}/\text{PHF}_{\text{Tau-pS396-ir}}$, así como con un mayor número de placas $\text{A}\beta/\text{PHF}_{\text{Tau}}$. Esto, a su vez, mostró una posible relación con porcentajes bajos de neuronas $\text{PHF}_{\text{Tau-pS396-ir}}$ (**Figura 42C**). Por tanto, gracias a InTool Explorer se pudo encontrar una posible relación inversa

entre la co-expresión de neuronas y la co-localización de placas. Es decir, aquellos casos con más placas $A\beta_{-ir}$ (Az1, Az4, Az6) presentan un menor porcentaje de placas que muestran co-localización entre $A\beta$ y PHF_{Tau}, así como un menor porcentaje de neuronas que co-expresan ambas isoformas de la proteína PHF_{Tau}, habiendo un mayor número de neuronas PHF_{Tau-pS396-ir}. Por el contrario, los casos que expresan un menor número de placas $A\beta_{-ir}$ (Az2, Az3, Az5) presentan un mayor porcentaje de placas que muestran co-localización entre $A\beta$ y PHF_{Tau}, así como un mayor porcentaje de neuronas que co-expresan ambas isoformas de la proteína PHF_{Tau}, disminuyendo el número de neuronas que expresan PHF_{Tau-pS396}.

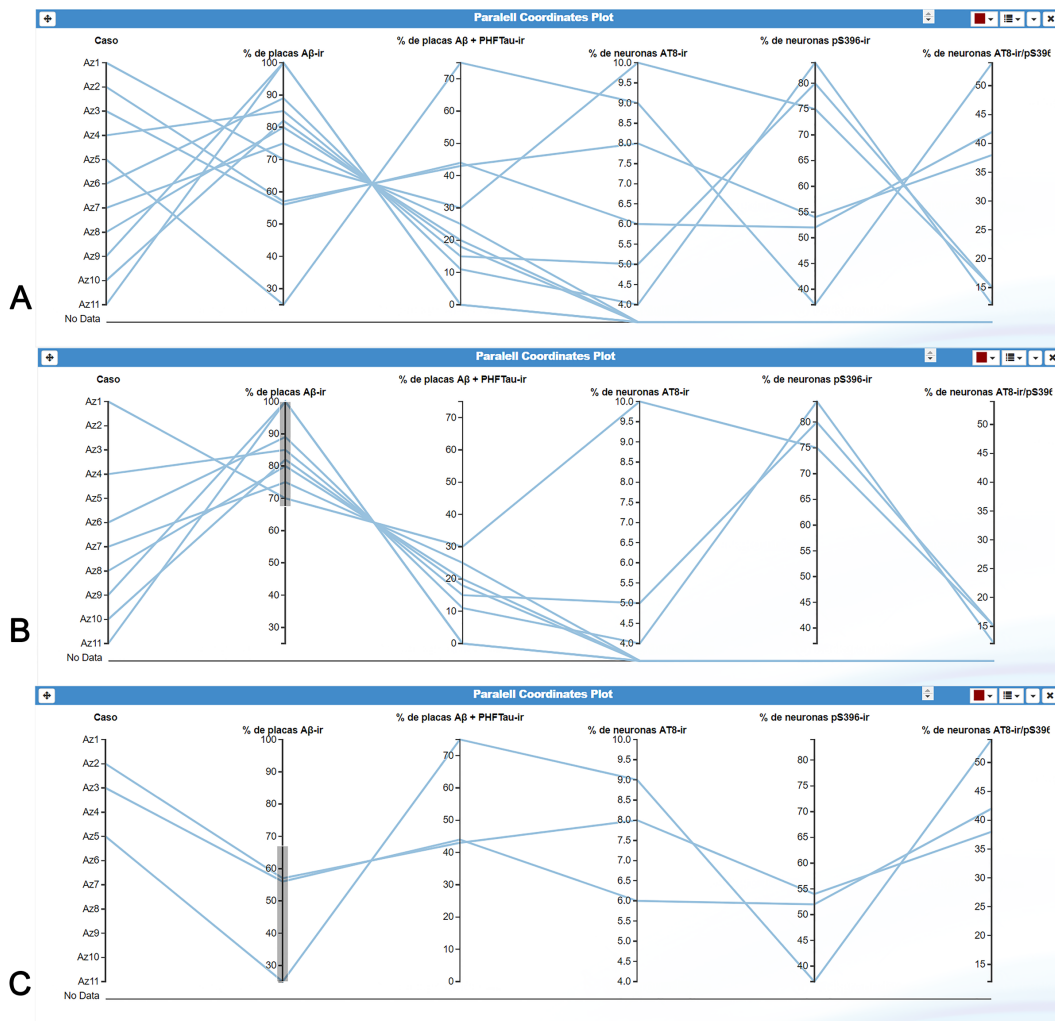


Figura 42. Gráficos de coordenadas paralelas que ilustran los porcentajes de co-expresión de neuronas PHF_{Tau-ir} y de co-localización de placas $A\beta_{-ir}$ en CA1, obtenidos en los análisis de microscopía confocal. **A:** visualización conjunta de los datos; **B:** selección de valores superiores al 70% de placas $A\beta_{-ir}$; **C:** selección de valores inferiores al 70% de placas $A\beta_{-ir}$.

DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

Para facilitar la discusión de los resultados de esta tesis, se resumen a continuación los hallazgos principales:

En primer lugar, el estudio mediante métodos de cuantificación estereológica en diferentes regiones hipocámpales de pacientes con EA mostró que la densidad de neuronas en CA1 de pacientes con EA estaba reducida, y más especialmente en aquellos casos con esclerosis del hipocampo, siendo además la región más afectada por la presencia de numerosos elementos PHF_{Tau-ir} y placas A β _{ir}. El subículo no mostró cambios en la densidad neuronal, pero expresó niveles moderados de neuronas PHF_{Tau-ir} y placas A β _{ir}, mientras que el GD y CA3 estaban menos afectados por la presencia de estos elementos patológicos.

Segundo, el análisis detallado de la patología neurofibrilar y la patología amiloide en la región CA1 mediante técnicas de microscopía confocal puso de manifiesto cuatro hallazgos principales. Primero, a pesar de que la expresión de placas y de neuronas PHF_{Tau-ir} presenta una gran variedad de patrones, la capa piramidal de la región medial de CA1 contiene el mayor número tanto de placas como de neuronas PHF_{Tau-ir}. Segundo, una gran proporción de placas A β _{ir} también presentaban de PHF_{Tau-ir}, mientras que las placas que carecían de inmunorreactividad frente a A β (marcadas únicamente con PHF_{Tau-pS396} o PHF_{Tau-AT8}) fueron escasas. Tercero, todas las placas que contenían alguna de las dos isoformas de PHF_{Tau}, expresaba también la otra, es decir, si una placa contenía PHF_{Tau-pS396}, también contenía PHF_{Tau-AT8}, y viceversa. Cuarto, el estudio de co-localización de ambas isoformas de PHF_{Tau} en las neuronas de CA1 reveló que la mayoría de las neuronas analizadas expresaban solamente PHF_{Tau-pS396}. Asimismo, la mayoría de las neuronas PHF_{Tau-ir} se identificaron como células piramidales.

Por último, el desarrollo y la aplicación de una herramienta interactiva de visualización de datos, InTool Explorer, facilitó la visualización detallada de los datos obtenidos de los pacientes con EA respecto a su información clínica, demográfica y las características histopatológicas. Asimismo, gracias a InTool Explorer se pudo encontrar una posible relación inversa entre la co-expresión de neuronas y la co-localización de placas: aquellos casos con más placas A β _{ir} (Az1, Az4, Az6) presentan un menor porcentaje de placas que muestran co-localización entre A β y PHF_{Tau}, así como un menor porcentaje de neuronas que co-expresan ambas isoformas de la proteína PHF_{Tau}, habiendo un mayor número de neuronas PHF_{Tau-pS396-ir}. Por el contrario, los casos que expresan un menor número de placas A β _{ir} (Az2, Az3, Az5) presentan un mayor porcentaje de placas que muestran co-localización entre A β y PHF_{Tau}, así como un mayor porcentaje de neuronas que co-expresan ambas isoformas de la proteína PHF_{Tau}, disminuyendo el número de neuronas que expresan PHF_{Tau-pS396}.

5.1. Alteraciones histopatológicas en el hipocampo de pacientes con enfermedad de Alzheimer

5.1.1. Densidad neuronal

Las densidades neuronales de pacientes con EA se redujeron severamente en la región CA1, observándose una disminución de alrededor del 32% en la densidad neuronal en pacientes con EA en comparación con los casos control sin demencia, confirmando diversos estudios previos (West y Gundersen, 1990; West et al, 1994; Gomez-Isla et al, 1997; Simic et al, 1997; Kril et al, 2002; Andrade-Moraes et al., 2013). En contraste, no se encontraron cambios en CA3, ni en el subículo. Por lo tanto, nuestros resultados indican que CA1 es la región más vulnerable del hipocampo con respecto a la pérdida de neuronas en la EA.

La vulnerabilidad de CA1 a la neurodegeneración ha sido ampliamente investigada (revisado en Duvernoy et al., 2013), observándose que esta región en particular es muy susceptible a los cambios metabólicos celulares (revisado en Bartsch y Wulff, 2015). En nuestro estudio, la mayor reducción en la densidad neuronal se observó en aquellos casos con EA que también mostraban esclerosis del hipocampo (ver sección **4.1 de Resultados**), una patología que coexiste con la EA (Velez-Pardo et al., 2004) y contribuye a la demencia (Kawas et al., 2015; Ihara et al., 2018). Por el contrario, los pacientes con EA sin esclerosis del hipocampo mostraron densidades neuronales en CA1 cuyos valores fueron similares a los casos control (**Figura 22**). Puesto que la mayoría de las neuronas en CA1 son células piramidales, una pérdida neuronal severa en pacientes con EA con esclerosis hipocampal daría lugar a alteraciones en los lugares de proyección (véase apartado **5.2**). Sin embargo, queda por aclarar cómo y cuándo la pérdida neuronal, relacionada con la progresión de la EA, afecta a la conectividad y función del hipocampo.

5.1.2. Patología neurofibrilar

El estudio cuantitativo reveló que la mayoría de las neuronas con PHF_{Tau} estaban marcadas como PHF_{Tau-pS396-ir}, siendo más abundantes que las marcadas con PHF_{Tau-AT8}. La región que contenía mayores densidades de marcaje era CA1, seguida del subículo, mientras que GD y CA3 mostraron un menor número de neuronas marcadas. El estudio posterior de la región CA1 mediante microscopía confocal confirmó estos hallazgos, es decir, el marcador más frecuente de PHF_{Tau} encontrado en las neuronas piramidales de CA1 de pacientes con EA fue PHF_{Tau-pS396} (más del 90%), lo que coincidía con lo descrito en estadios tardíos de la EA (Kimura et al., 1996), y correspondiendo con el diagnóstico de los casos analizados en el presente trabajo (IV-VI de la Escala de Braak). El análisis de secciones doblemente marcadas mostró un patrón de expresión de PHF_{Tau} heterogéneo donde aproximadamente el

28% de las neuronas de CA1 que contenían PHF_{Tau-pS396-ir} también expresaban PHF_{Tau-AT8}.

Algunos estudios han propuesto que PHF_{Tau-AT8} es un marcador específico de etapas tempranas, mientras que PHF_{Tau-pS396} aparece en etapas tardías (Su et al., 1994, 1996). Sin embargo, otros autores han sugerido que PHF_{Tau-pS396} se visualiza en las primeras etapas de la enfermedad y su expresión se mantiene elevada a lo largo del curso de la enfermedad, mientras que PHF_{Tau-AT8} aparecería en etapas avanzadas (Mondragón-Rodríguez et al., 2014). Sin embargo, dado que la proteína PHF_{Tau} puede estar implicada en la alteración de la expresión de otras proteínas, así como afectar el curso de la enfermedad, aún se desconoce el patrón de hiperfosforilación dependiente de cada etapa de la EA. La proteína tau contiene más de 80 sitios fosforilables que pueden alterar la estructura de la proteína y promover cambios conformacionales que faciliten su posterior agregación (Iqbal et al., 2016). El dominio de unión a microtúbulos (una región en el extremo C-terminal) es crítico para el ensamblaje de ovillos, mientras que, la fosforilación de los residuos T212 / S214 disminuye la interacción con los microtúbulos y evita la formación de ovillos (Schneider et al., 1999). Estos aminoácidos fosforilados (T212 / S214) forman el epítipo del anticuerpo AT100 (Zheng-Fischhöfer et al., 1998) y se ha sugerido que en la EA aparecería en un estadio posterior a AT8 (Luna-Muñoz et al., 2007). Recientemente se ha estudiado los patrones de tinción de los anticuerpos AT100 y pS396 en la región CA1 para examinar la posible relación entre ambos marcadores (Regalado-Reyes et al., 2019). Este estudio reveló que según aumenta la escala de Braak de los pacientes, existe una disminución en el marcaje con el anticuerpo AT100 y un aumento con el anticuerpo pS396. Es decir, los patrones de tinción varían según el avance de la enfermedad por lo que la combinación de estos anticuerpos podrían ser una nueva herramienta para evaluar la progresión de la patología neurofibrilar (Regalado-Reyes et al., 2019).

Por otra parte, se ha propuesto que la proteína PHF_{Tau} – dependiendo de su conformación y de su sitio de fosforilación – puede proporcionar mecanismos de protección para mantener la funcionalidad de las neuronas (Gong 2008, Mondragon-Rodriguez 2014, Polanco 2017). De hecho, la presencia de PHF_{Tau} intracelular ha sido reportada en neuronas de CA1 en cerebros de ancianos sin demencia (revisado en Ferrer, 2012). Es decir, la presencia de proteína PHF_{Tau} intracelular en el compartimento somatodendrítico, no induce necesariamente muerte neuronal o toxicidad (Morsch, 1999; Blazquez-Llorca 2010; Ávila, 2012). Asimismo, se ha descrito una pérdida de espinas dendríticas en neuronas piramidales de la formación del hipocampo y de la corteza parahipocámpica de pacientes con EA en aquellas neuronas que contienen ovillos neurofibrilares bien desarrollados y marcados con anticuerpos frente a PHF_{Tau} (Merino-Serrais et al., 2010). Sin embargo, cuando las neuronas contenían únicamente proteína PHF_{Tau}, pero no desarrollaban ovillos, o contenían sólo pre-

ovillos, no se observaban alteraciones dendríticas o éstas fueron menos severas (Merino-Serrais, 2013). Puesto que las espinas dendríticas de las neuronas piramidales son el principal elemento postsináptico de las sinapsis corticales excitadoras, y que son fundamentales en los procesos de memoria, aprendizaje y cognición, las alteraciones dendríticas pueden constituir un evento crítico en la patogénesis de la EA. Por lo tanto, las características del deterioro cognitivo en la EA podrían depender del número relativo de neuronas que han desarrollado ovillos neurofibrilares, más que de la sola presencia de PHF_{Tau}.

El análisis de las densidades neuronales obtenidas mediante estimaciones estereológicas mostró que, sorprendentemente, en CA1, la densidad de las neuronas PHF_{Tau-pS396-ir} alcanzaba una densidad similar a la del total de neuronas marcadas con NeuN_{ir}, superando incluso las densidades neuronales estimadas en las secciones teñidas con el método de Nissl (**Figura 23**). Es decir, prácticamente todas las neuronas de CA1 de los pacientes con EA fueron marcadas con el anticuerpo PHF_{Tau-pS396}.

Una posible explicación de esta aparente discrepancia es que algunos de los elementos PHF_{Tau-pS396-ir} pueden corresponder a ovillos neurofibrilares pertenecientes a una neurona no funcional, es decir, que ha perdido integridad celular o que no contiene núcleo. De hecho, se ha descrito, en pacientes con EA, una degeneración patológica de las neuronas que contienen PHF_{Tau} que puede desembocar en una pérdida de la integridad neuronal, y que daría lugar a un ovillo neurofibrilar extracelular u "ovillo fantasma" (*ghost tangle*; Braak et al., 1994). Estos ovillos fantasmas se han visto en etapas tardías de la EA y están fosforilados, principalmente, en la Ser396 (Kimura et al., 1996). En las estimaciones estereológicas realizadas en las secciones teñidas con el método de Nissl, una neurona se cuantificó como tal solo si su nucleolo era identificable; y en secciones marcadas con anti-NeuN, una neurona se cuantificó si se visualizaba claramente su núcleo. Así, las neuronas sin nucleolo o núcleo identificable dentro del disector de conteo no fueron contabilizadas.

Por tanto, los cambios que ocurren de forma progresivas en las neuronas PHF_{Tau-pS396-ir} pueden dar lugar a alteraciones morfológicas y funcionales y, finalmente, a una degeneración total de la neurona hacia un ovillo neurofibrilar extracelular (ovillo fantasma).

5.1.3. Patología amiloide

El análisis de las secciones doblemente marcadas reveló que CA1 fue la región con mayor densidad de placas A β _{ir}, localizándose la mayoría de estas placas en el estrato *pyramidale*. En el hipocampo humano, el estrato *pyramidale* contiene los somas de las células piramidales, una gran proporción de las dendritas basales de estas células, y parte de sus dendritas apicales (Duvernoy, 2013; Benavides-Piccione et al., 2019). Las estimaciones es-

tereológicas revelaron que CA1 también mostraba los valores más altos para la densidad de las placas $A\beta_{-ir}$, seguida del subículo. Asimismo, se encontró que CA1, presentaba placas más pequeñas que aquellas regiones con menor densidad de placas de $A\beta$ (DG y CA3).

Puesto que las placas $A\beta_{-ir}$ se encontraron principalmente en el estrato *pyramidale* (seguido de estrato *radiatum*), éstas pueden afectar tanto a las dendritas apicales como a las basales de las células piramidales de CA1. Estudios previos realizados en CA1 en pacientes con EA, demostraron que la presencia de placas $A\beta_{-ir}$ produce alteraciones locales que incluyen cambios en la morfología de las células piramidales y en su inervación perisomática (García-Marín et al., 2009; Blázquez-Llorca et al., 2010; Merino-Serrais et al., 2013). Por ejemplo, se observó que la porción del soma de las neuronas que estaban en contacto con placas $A\beta_{-ir}$ mostraban ausencia de sinapsis, es decir, una pérdida de sinápsis perisomáticas. Asimismo, se ha observado que las dendritas en contacto directo con las placas ven disminuido su número de espinas dendríticas, lo que incide drásticamente en la comunicación neuronal (Merino-Serrais et al., 2013). También se ha descrito una disminución en el número de sinapsis excitadoras e inhibitoras (García-Marín et al., 2009; Llorens-Martín et al., 2014; Spires-Jones et al., 2005; Knafo et al., 2009a, b; Terry et al., 1991; Guo et al., 2014), y un deterioro tanto del sistema glutamatérgico como del sistema GABAérgico (Revet et al., 2013). Por tanto, la presencia de placas $A\beta_{-ir}$ representa un entorno tóxico para las neuronas hipocampales, lo que podría desembocar en una pérdida sináptica y en alteraciones en la transmisión de la información.

Como se ha mencionado anteriormente, CA1 mostraba los valores más altos de densidad de placas $A\beta_{-ir}$, sin embargo, estas placas eran más pequeñas que en el GD o CA3 que, de forma inversa, contenían una menor densidad de placas $A\beta_{-ir}$. Se han observado agrupaciones de microglía en las proximidades de las placas $A\beta_{-ir}$ en el tejido cortical de pacientes con EA (Serrano-Pozo et al., 2013), sugiriendo que la presencia de placas $A\beta_{-ir}$ podría desencadenar la activación glial como parte de la respuesta inflamatoria (D'Andrea et al., 2001; Jung et al., 2015; revisado en Chun y Lee, 2018). Se ha propuesto que la microglía activada internaliza $A\beta$, evitando el aumento del tamaño de la placa (Rajendran et al., 2006, 2014; Serrano-Pozo et al., 2013; Asai et al., 2015), pero la toxicidad de las proteínas patológicas, $A\beta$ y PHF_{Tau} , puede alterar la funcionalidad normal de la microglía. Por tanto, si la microglía falla al eliminar el $A\beta$, este puede volver nuevamente al espacio extracelular vía exocitosis y dar lugar a la formación de más placas de $A\beta$. Según nuestros resultados, puesto que CA1 presenta una mayor densidad de placas, pero menores en tamaño, CA1 podría contener microglía alterada que no fuese efectiva en la eliminación de las placas de $A\beta$, pero que aún pudiera degradar o fagocitar las formas más solubles de $A\beta$. Por tanto, es posible que la microglía de CA1 esté selectivamente afectada por la presencia de elementos tóxicos, como

péptidos de A β , y no pueda desempeñar de eliminación de forma normal.

5.1.4. Relación entre la patología neurofibrilar y la patología amiloide

El análisis de las secciones con doble (anti-A β /anti-PHF_{Tau-pS396}; anti-A β /anti-PHF_{Tau-AT8}) y triple (Methoxy-X04/anti-PHF_{Tau-pS396}/anti-PHF_{Tau-AT8}) marcaje mostró una gran variedad en los patrones de co-expresión (descrita en la sección 4.3.2): placas marcadas solamente con A β , placas marcadas tanto con A β como con PHF_{Tau}, y placas marcadas solamente con anticuerpos frente a PHF_{Tau}. No obstante, se desconoce si las distintas placas con estas variaciones neuroquímicas afectan de distinta manera a los circuitos sinápticos cercanos a dichas placas.

El estudio de las placas A β _{ir} reveló la presencia de dos tipos morfológicos – con núcleo central y sin núcleo central– independientemente de su marcaje. Se ha propuesto que las placas pasan por diferentes estadios (Dickson et al., 1990), desde placas difusas a neuríticas, acumulando PHF_{Tau} a través de varios mecanismos, que podrían generar toxicidad (Ikeda et al., 1990; **Figura 43**).

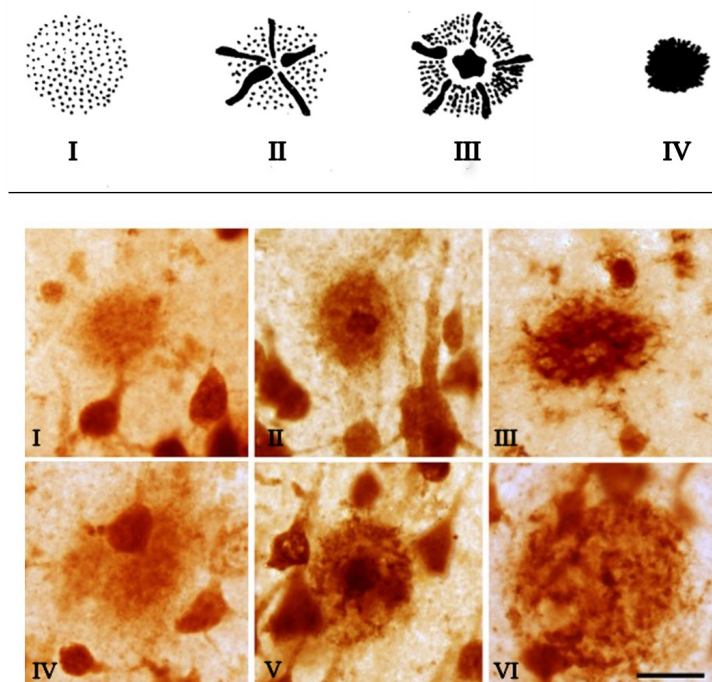


Figura 43. Ilustración de los posibles cambios estructurales que podría sufrir una placa. Los dibujos de la parte superior esquematizan una placa en desarrollo (**I**: placa difusa; **II**: placa primitiva con fibras de A β ; **III**: placa clásica con núcleo A β _{ir} y rodeado de neuritas distróficas; **IV**: placa compacta de A β ; dibujos modificados de Ikeda et al., 1990). Las microfotografías de la parte inferior pertenecen a secciones con doble tinción para anti-A β y anti-NeuN para mostrar placas difusas, neuríticas con núcleo central y neuríticas sin núcleo central (**I**, **II**, **III**, respectivamente), así como placas difusas, neuríticas con núcleo central y neuríticas sin núcleo central, en contacto con neuronas (**IV**, **V**, **VI**, respectivamente). Barra de escala (en **VI**): 20 μ m. Imágenes modificadas de García-Marín et al., 2009.

Como se ha mencionado en el apartado anterior, la microglía se activa frente a una respuesta inflamatoria (D'Andrea et al., 2001; Jung et al., 2015; Chen et al., 2016; Parbo et al., 2017). La activación de esta microglía parece tener dos consecuencias: inicialmente, limpiaría el A β por un mecanismo de captación (Lee and Landreth, 2010) y, posteriormente, podría propagar A β y PHF_{Tau} por exocitosis (Rajendran et al., 2006, 2014; Asai et al., 2015), ya que la microglía no solamente internaliza A β , sino también PHF_{Tau} (Parbo et al., 2017). Por tanto, parece que ambas proteínas se liberarían en el parénquima cerebral, facilitando la agrupación de A β , así como la incorporación de elementos PHF_{Tau}. En un modelo animal donde se reducían los niveles de microglía, los niveles de propagación de PHF_{Tau} se vieron también reducidos (Asai et al., 2015). Otros estudios en un modelo animal de EA con sobre-activación de la microglía, mostraron un incremento en la fosforilación de tau, pero una menor cantidad de A β , lo que se vinculó a la activación microglial (Chen et al., 2016).

Por otro lado, se ha propuesto que las fases iniciales de la formación de placas no implican una respuesta inflamatoria asociada, pero en fases tardías, se observan tanto astrocitos reactivos como microglía activada localizados cerca de las placas (D'Andrea et al., 2001). Por lo tanto, la presencia de placas expresando solamente A β podría indicar un estadio inicial de la placa, mientras que las placas que expresan tanto PHF_{Tau-pS396} como PHF_{Tau-AT8}, podrían representar un estadio intermedio, como parte de un proceso dinámico (Condello et al., 2011) que dependería de la presencia de ovillos neurofibrilares y, quizá, de la respuesta inflamatoria local.

Puesto que hemos observado una variabilidad importante entre los pacientes según sus patrones de expresión de A β y PHF_{Tau}, tanto en neuronas como en placas, una posible explicación es que la depuración mediada por las células microgliales ha funcionado de manera diferente entre los pacientes. Es decir, los casos en los que la microglía ha actuado correctamente presentarían una menor densidad de placas A β _{-ir}/PHF_{Tau-ir}, pocas neuronas PHF_{Tau-pS396-ir}/PHF_{Tau-AT8-ir}, y un mayor número de placas que solamente expresarían A β (véase pacientes Az1, Az4 y Az6; **Tabla 8; Figura 28**). Por el contrario, en aquellos casos en los que la microglía hubiese realizado una depuración *no exitosa*, presentarían una menor proporción de placas que expresarían solamente A β y, por tanto, más placas A β _{-ir}/PHF_{Tau-ir} y neuronas PHF_{Tau-ir} (véase pacientes Az2, Az4 y Az5; **Tabla 8; Figura 28**). Por estos motivos, en un futuro cercano, pretendemos realizar un estudio detallado sobre la microglía en estos pacientes.

Recientemente, se ha propuesto que existe un solapamiento entre la expresión de A β y la de PHF_{Tau} en diferentes regiones corticales (Sepulcre et al., 2017). Es decir, independientemente del estadio de Braak de cada paciente, debe haber mecanismos, bien compensato-

rios o bien inflamatorios, que podrían modificar los niveles de ambas proteínas patológicas en el cerebro, lo que podría explicar la variabilidad observada entre pacientes clínicamente homogéneos. Esto sugiere un patrón dinámico de expresión de ambas proteínas en la EA y nuestros datos apoyarían la hipótesis de que ambas proteínas actúan en conjunto incluso en estadios tardíos de la enfermedad (Ittner & Götz, 2011; Guo et al., 2006; Harris et al., 2012; Sepulcre et al., 2017; Vemuri & Schöll, 2017).

5.2. Alteraciones en la conectividad hipocampal: implicaciones funcionales

Como se ha comentado anteriormente, el análisis del hipocampo de pacientes con EA, en el presente trabajo, mostró que la densidad de neuronas en CA1 de pacientes con EA estaba reducida -especialmente en aquellos con esclerosis del hipocampo-, siendo además la región con mayor número de elementos PHF_{Tau-ir} y placas A β _{ir}. El subículo contenía un menor número de neuronas PHF_{Tau-ir} y placas A β _{ir}, y una densidad neuronal aparentemente normal, mientras que el GD y CA3 estaban menos afectados por la presencia de ambas patologías, siendo las regiones menos alteradas. No obstante, no analizamos la densidad neuronal en el GD y por tanto, desconocemos si existe o no una pérdida neuronal en esta región del hipocampo.

Durante el envejecimiento, se ha reportado un aumento de la excitabilidad de CA3 y una hipoexcitabilidad de CA1, lo que podría alterar la conectividad normal entre CA3 y CA1, atenuando la actividad oscilatoria normal y contribuyendo a los déficits cognitivos (Simkin et al., 2015). De acuerdo con los hallazgos de este trabajo, las neuronas en CA1 podrían verse afectadas por la presencia de proteínas tóxicas que provienen de CA3 a través de la vía trisináptica y monosináptica, como resultado de la transmisión de célula a célula, según la hipótesis que propone el mecanismo de propagación priónica (Guo y Lee, 2014; Wang et al., 2017; Gibbons et al., 2018). Además, la presencia de oligómeros de A β que alteran la transmisión glutamatérgica, y modifican la expresión de receptores NMDA (revisado en Zhang et al., 2016), podría alterar la funcionalidad de las neuronas de CA1.

En condiciones normales, CA1 es una región crítica para el procesamiento de información espacial, así como para el aprendizaje y la memoria (Henriksen et al., 2010; Nakazawa et al., 2016). CA1 proyecta a las capas profundas de la CE y recibe aferencias de la capa II, a través de la vía perforante (o circuito trisináptico) y de la capa III por la vía monosináptica (Cohen y Squire, 1980; revisado en Knierim, 2015), llevando a cabo funciones de memoria (Cohen y Squire, 1980). Se ha descrito que las lesiones en la región proximal de CA1 producen alteraciones en tareas de recuperación de memoria (Nakazawa et al., 2016), apoyando los síntomas clínicos presentes en fases iniciales de la EA donde la memoria episódica está

alterada (Walker et al., 2009). Otros síntomas iniciales, como la desorientación y la pérdida del contexto, podrían relacionarse con la pérdida de inervación a CA1 procedente de la capa II de la CE, cuyas neuronas se dañan severamente en esa fase inicial de la EA (Gomez-Isla et al., 1996).

En el ratón, se ha descrito que las neuronas piramidales de la capa superficial de CA1 se activan durante tareas que requieren relacionar el entorno con información previamente almacenada y con otras características del mismo, mientras que las neuronas de la capa profunda de CA1 proporcionan información acerca del contexto (Overington & Jeffery, 2016). Los resultados del presente trabajo revelaron que tanto las placas $A\beta_{ir}$ como las neuronas PHF_{Tau-ir} se encuentran mayoritariamente en la capa piramidal de CA1. Por consiguiente, tanto la patología amiloide como la fibrilar ocupan regiones críticas en términos de funcionalidad que podrían afectar a la conectividad sináptica que soporta las tareas espaciales. Puesto que los primeros síntomas de los pacientes en estadios tempranos de la EA son pérdida del contexto y desorientación espacial, la capa profunda de CA1 podría ser una de las primeras áreas afectadas del hipocampo al comienzo de la enfermedad, mientras que, en estadios tardíos, tanto la capa superficial como la profunda de las células piramidales de CA1 se verían afectadas, tal y como se muestra en este estudio.

CA1, junto con el subículo, representa la puerta de acceso al intercambio de información entre las regiones corticales y subcorticales (Amaral y Witter, 1989; Amaral, 1993; Naber et al., 2001; O'Mara, 2005), siendo además el subículo una de las principales estructuras del hipocampo en el intercambio de información con la corteza (Finch y Babb, 1981; Witter et al., 1989). El subículo está involucrado en la memoria espacial y en la navegación, así como en las respuestas al estrés y en procesos afectivos, cognitivos y conductuales mediados por el sistema límbico (O'Mara, 2006; O'Mara et al., 2009) y se ha propuesto como una posible interfaz entre el hipocampo y la corteza durante la consolidación de los recuerdos (Craig y Commins, 2006). Asimismo, la atrofia en la región CA1 asociada con la EA, puede dar lugar al deterioro cognitivo, especialmente en funciones de orientación, aprendizaje y memoria (Zola-Morgan et al., 1986; Simic et al., 1997; Kril et al., 2002; Zarow et al., 2005). Por tanto, las alteraciones subiculares encontradas pueden contribuir a las alteraciones de la red relacionadas con el deterioro cognitivo en la EA.

Nuestros resultados mostraron que el subículo también se vio afectado por la presencia de las neuronas $PHF_{Tau-AT8-ir}$ y $PHF_{Tau-pS396-ir}$, así como por numerosas placas de $A\beta_{ir}$, aunque su densidad neuronal no se vio reducida. Sin embargo, la fuerte conectividad entre CA1 y el subículo podría potenciar el desarrollo de la patología por una propagación de tipo priónica (Guo y Lee, 2014; Wang et al., 2017; Gibbons et al., 2018). Curiosamente, el subículo

mostró una densidad de placa de $A\beta_{ir}$ similar a CA1, pero presentó mayor volumen ocupado por las placas de $A\beta_{ir}$. Por lo tanto, esta región podría verse afectada por el impacto de la proximidad de placas $A\beta_{ir}$, viéndose alterada su conectividad, tanto local como distal.

En resumen, el conjunto de alteraciones descritas puede producir cambios profundos en los circuitos del hipocampo, afectando tanto a las conexiones locales como a las distales, lo que en última instancia podría promover el deterioro cognitivo asociado a la EA. Sin embargo, la complejidad de las conexiones hipocampales involucradas en el procesamiento de la información hace que sea difícil determinar las alteraciones específicas debidas a la EA.

Por último, se ha descrito que los síntomas cognitivos difieren entre los pacientes con EA, aunque su neuropatología sea similar (Nelson et al., 2012). La presencia de placas y el deterioro de las funciones cognitivas no están correlacionadas, pero la expresión de PHF_{Tau} sí se ha ligado estrechamente al deterioro cognitivo (Arriagada et al., 1992). Por tanto, puede ser que la demencia esté en primer lugar relacionada con la presencia de PHF_{Tau} (Andrade-Moraes et al., 2013; Merino-Serrais et al., 2011; Merino-Serrais et al., 2013) y, en segundo lugar, con la interacción con la proteína $A\beta$.

5.3. Variabilidad interindividual

Las alteraciones morfológicas observadas en tejido humano patológico son difíciles de interpretar, principalmente por la gran variabilidad entre los historiales clínicos y demográficos (de acuerdo a factores como el sexo, la edad, el tratamiento médico, etc.) que puede alterar la estructura cerebral. Además, el curso de la EA es altamente variable, y los cambios neuropatológicos no son homogéneos. Esto ocurre tanto entre pacientes como entre distintas regiones cerebrales de un mismo paciente (García-Marin et al., 2009; Blazquez-Llorca et al., 2010). Puesto que hemos analizado el hipocampo de un número relativamente pequeños de pacientes con EA ($n=11$), con distintas características clínicas y patológicas (**Tabla 1**), los datos obtenidos en el presente trabajo no pueden ser generalizados a todos los pacientes con EA o a otras áreas corticales. Por tanto, este estudio representa un paso más para avanzar en el estudio de la patología tau y amiloide, pero sería necesario confirmar nuestros hallazgos, tanto en un número mayor de individuos como en otras áreas corticales.

Por último, la variabilidad encontrada en los pacientes no puede ser atribuida a los estadios de la EA, puesto que todos ellos están diagnosticados como Braak IV-VI. Por tanto, nuestros hallazgos soportan la idea de que la EA no es una entidad única, incluso en el mismo estadio de la enfermedad, puesto que los cambios microanatómicos/neuroquímicos que ocurren en el hipocampo varían en gran medida de un paciente a otro.

5.4. Efectos de la fijación

Nuestros datos mostraron una notable variabilidad en la densidad neuronal, particularmente en las muestras con EA. La estimación de las densidades neuronales realizadas en las secciones teñidas con el método de Nissl no mostraron apenas diferencias en las regiones analizadas. Sin embargo, los datos derivados de las secciones anti-NeuN mostraron una mayor variabilidad, tanto entre regiones como entre pacientes. Es importante tener en cuenta que el tiempo que transcurre desde el fallecimiento del paciente hasta la fijación del tejido cerebral (tiempo postmortem) generalmente produce artefactos que son más acusados cuanto mayor es el tiempo postmortem. Estos artefactos incluyen las interrupciones en la continuidad de la membrana y un aumento del espacio extracelular, entre otras distorsiones geométricas (por ejemplo, Tang et al., 2001). Además, se ha mostrado que el tiempo postmortem induce cambios metabólicos significativos a partir de las 2 h, mientras que la integridad de las neuronas y la glía, a nivel anatómico / neuroquímico no se altera significativamente durante las primeras 5h postmortem para la mayoría de los marcadores histológicos. Sin embargo, sí afecta a la visualización de ciertos anticuerpos, como anti-NeuN, específico para neuronas (Gonzalez-Riaño et al., 2017). Además, con tiempos postmortem superiores, los cambios son progresivamente más acusados. Estas características representan una limitación importante cuando se realizan comparaciones entre diversos pacientes y con otros estudios cuyos tiempos postmortem son distintos. Por ejemplo, cuando se realizan estimaciones estereológicas, la preservación del volumen del tejido es fundamental para obtener unas mediciones fiables y si, por otra parte, se utilizan anticuerpos anti-NeuN para la visualización de las neuronas, el conteo es mucho menos fiable.

En resumen, los estudios cuantitativos sobre densidades neuronales realizados en tejido cerebral humano con un elevado tiempo postmortem pueden producir datos diferentes a nuestros resultados (Simic et al., 1997; Andrade-Moraes et al., 2013). Si bien la preservación de tejido cerebral humano con un elevado tiempo postmortem podría ser válido para ciertas observaciones cualitativas (hasta 24h, por ejemplo, Simic et al., 1997; Wittner et al., 2006; Andrade-Moraes et al., 2013), no sería adecuado para estudios comparativos cuantitativos ni para otros muchos estudios neuroquímicos y metabólicos (González-Riano et al., 2017). Además, las técnicas de fijación del tejido cerebral también pueden alterar las estimaciones estereológicas, ya que hay una reducción en la inmunorreactividad al usar formalina como fijador (Lyck et al., 2009).

5.5. Coexistencia de proteinopatías

Cinco de los pacientes con EA del presente estudio expresaban TDP-43 (una condición patológica de una proteína de unión al ADN) y dos pacientes mostraban depósitos de α -sinucleína (una proteína mal plegada que forma agregaciones patológicas en trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson). Además, cuatro de los pacientes con TDP-43 mostraban también esclerosis del hipocampo. Como mencionamos anteriormente, la esclerosis del hipocampo se ha identificado como una entidad neurodegenerativa que coexiste con la EA y contribuye a la progresión de la demencia (Kawas et al., 2015; Ihara et al., 2018). Los pacientes con esclerosis del hipocampo y TDP-43 asociado pueden sufrir una potenciación de la atrofia en CA1, como se propuso recientemente (Josephs et al., 2017). La presencia de estas co-patologías puede contribuir a la degeneración (Uryu et al., 2008; Robinson et al., 2011) o alternativamente, pueden ser parte de un gran conjunto de alteraciones que conducen a la EA, o simplemente servir como potenciador para la neurodegeneración (Robinson et al., 2011; Golde et al., 2013).

Puesto que todos los pacientes analizados en este estudio corresponden a estadios tardíos de la enfermedad (estadios Braak IV-VI, ver **Tabla 1**) y sufren déficits cognitivos severos, la gran variabilidad en los tipos neuroquímicos y la distribución de placas que observamos, indican un alto grado de diferencias interindividuales. La coexistencia de proteinopatías puede también contribuir a la diversidad de distintos tipos de placas encontradas en el estudio. Por ejemplo, uno de los casos (Az9) mostraba marcadores tanto para TDP-43 como para α -sinucleína y, este caso en particular mostraba placas que solamente se identificaban con marcadores frente a A β (Methoxy-X04) y no frente a anticuerpos PHF_{Tau}. Por tanto, puesto que no se sabe si la EA es un proceso patológico independiente o si las proteínas patológicas concurrentes se influyen entre sí (Jucker y Walker, 2013), la coexistencia de proteinopatías también puede contribuir a la diversidad hallada en el presente trabajo.

5.6. Reserva cognitiva

Se ha propuesto que la reserva cognitiva permite al cerebro tolerar elementos patológicos sin síntomas clínicos apreciables, mediante mecanismos compensatorios de protección o por esquemas cognitivos preexistentes, que podrían servir como protección neuronal frente a la degeneración (Tucker y Stern, 2011; Lazarczyk et al., 2012; Steffener y Stern, 2012; Stern, 2012; Avila et al., 2015; Hoenig et al., 2017). Puesto que en nuestro estudio hemos observado diferencias en el patrón de expresión de placas y neuronas PHF_{Tau-ir} entre los distintos pacientes, sería interesante conocer si estas diferencias afectan de forma diferencial a los circuitos sinápticos locales, afectando en menor o mayor medida a la reserva cognitiva de cada individuo.

Finalmente, se han observado placas de $A\beta_{ir}$ en muestras de cerebro de casos sin demencia, y los ensayos clínicos de terapias para la EA centradas en la proteína amiloide han fallado en el tratamiento del deterioro cognitivo asociado a la EA. Por lo tanto, la mera presencia de la patología amiloide parece no ser responsable de la alteración cognitiva observada en la EA (revisado en Anderson et al., 2017; Morris et al., 2018).

Por tanto, podemos sugerir que la EA no es una entidad única, sino que varía de un paciente a otro como resultado de factores como la edad, el sexo, las co-patologías o los tratamientos médicos, entre otros.

5.7. Análisis multidimensional de los datos de pacientes con enfermedad de Alzheimer: InTool Explorer

Dada la complejidad de la organización cerebral y al abordaje interdisciplinar para el estudio del cerebro, cada vez son más necesarias el desarrollo de nuevas herramientas de estudio y análisis, así como actualizar las que ya existen, con el fin de avanzar de manera significativa hacia un mejor conocimiento sobre la estructura y función del cerebro (DeFelipe, 2010; Hagmann et al., 2010; DeFelipe, 2017).

Entre estas herramientas, la visualización de datos se ha propuesto como una potente herramienta de análisis exploratorio (Tukey, 1997). Los métodos de visualización interactiva ayudan a los usuarios a dar con conclusiones inesperadas, más allá de los resultados obtenidos gracias a estudios de estadística. En este sentido, los lenguajes de programación son una metodología flexible para un rápido prototipado, esencial para investigar nuevos enfoques en el contexto del análisis exploratorio. Desafortunadamente, estos entornos requieren habilidades de programación e impiden que el usuario defina su propio flujo de visualización del trabajo.

Actualmente hay herramientas de análisis visual, de alto rendimiento, que permiten a los usuarios customizar sus visualizaciones. *Tableau*, por ejemplo, admite cualquier análisis estadístico con R, sin embargo, estos scripts están más allá de las capacidades de la mayoría de los usuarios. Otra herramienta de análisis exploratorio, *AutoDiscovery*, realiza un conjunto predefinido de pruebas estadísticas para encontrar correlaciones (Butler y Trejo, 2015). No obstante, a pesar de que los resultados se muestran utilizando varias técnicas de visualización, el sistema permite muy poca interacción del usuario con sus propios datos, perdiendo así el control sobre el proceso de su propio análisis.

Desde el punto de vista del software, la arquitectura de InTool Explorer permite integrar nuevas funcionalidades de una manera muy sencilla. Los actuales filtros y tarjetas vinculadas de visualización son solo un ejemplo de lo que puede implementarse en siguientes

versiones. Como se ha mencionado anteriormente, están disponibles todas las posibilidades que ofrece el paquete R, puesto que este módulo está ya integrado en la herramienta. Sin embargo, en lugar de desarrollar cálculos estadísticos más automatizados, los esfuerzos se han centrado en proporcionar una mayor flexibilidad para configurar filtros y visualizaciones vinculadas en la etapa de análisis exploratorio interactivo. Como se ha descrito anteriormente, los usuarios pueden crear nuevas tarjetas vinculadas, como el filtro “Regiones”. De esta manera, los datos espaciales presentes en imágenes sin procesar (por ejemplo, de regiones cerebrales) se pueden vincular a datos tabulares (como el conjunto de datos clínicos), sin demandas adicionales al nivel de experiencia del usuario. Por otro lado, no se necesitan dependencias de software, ni requisitos de hardware específicos para trabajar con InTool Explorer, solamente un navegador web y el usuario puede compartir su trabajo con cualquier laboratorio del mundo a través de una conexión a internet.

Las herramientas comunes que se utilizan para analizar los datos brutos del conjunto de datos que se presenta aquí son las hojas de cálculo básicas de Excel y las herramientas de visualización aisladas, pero no ofrecen el mismo nivel de información. InTool Explorer permite que los datos se comparen rápida y fácilmente. En la práctica clínica, se obtiene una gran cantidad de información de cada paciente (diversas pruebas médicas, evaluaciones cognitivo-conductuales, etc.), lo que produce un gran volumen de datos. La aplicación de herramientas exploratorias, como InTool Explorer, brinda la oportunidad de visualizar toda la información, manipularla, filtrar variables y explorar nuevas hipótesis.

Otra contribución significativa de InTool Explorer es su diseño funcional, que facilita la combinación de variables multidimensionales y la exploración de posibles relaciones mediante múltiples gráficos. Puesto que se genera un gran volumen de datos, los errores a veces aparecen en los estadios finales de la investigación. En este sentido, InTool Explorer permite la visualización rápida de los datos, la detección de errores, así como la reevaluación de los datos, pudiendo además establecer nuevas hipótesis o nuevas líneas de investigación. Por tanto, en el laboratorio, esta herramienta ofrece una oportunidad para estudiar y analizar datos neurocientíficos antes que cualquier análisis estadístico.

InTool Explorer proporciona técnicas de interacción con diferentes representaciones de datos que hacen uso del poder de combinar estas representaciones simultáneas, facilitando así la tarea de análisis. Se ha visto que la herramienta mejora el estudio de datos complejos obtenidos del análisis de condiciones neurológicas multifactoriales, como en la EA. Puesto que los datos que provienen de fuentes multifactoriales se pueden visualizar con InTool Explorer, el análisis se vuelve más detallado, abriendo la posibilidad de una definición más apropiada de la enfermedad.

Nuestro estudio, utilizando InTool Explorer, ha mostrado que es muy útil para el propósito inicial para el cual había sido creada, permitiendo nuevas interpretaciones de los datos en bruto extraídos de una variedad de análisis realizados en casos control y pacientes con EA, y en diferentes regiones de la formación del hipocampo. Desde un punto de vista clínico-patológico,, InTool Explorer ha facilitado la visualización de información específica de cada paciente en relación con sus características histopatológicas y clínicas. Además, mediante el gráfico de coordenadas paralelas, es posible examinar visualmente, de forma sencilla y rápidamente, las regiones más alteradas en cuanto a la presencia de las patologías amiloide y tau, facilitando así el planteamiento de nuevas hipótesis y futuras líneas de investigación. Por ejemplo, las regiones GD y CA3 son claramente las menos afectadas por la presencia de elementos PHF_{Tau-ir} y, por tanto, resultaría interesante explorar si esta observación es una característica general de todos los pacientes con EA o si existen diferencias dependiendo de la presencia de otras patologías o de otros factores clínico-patológicos.

Finalmente, InTool Explorer es una herramienta que actualmente se está utilizando para visualizar e interpretar múltiples datos microanatómicos con el objetivo de investigar posibles correlaciones entre distintas características. Por ejemplo, en el momento actual, estamos aplicando InTool Explorer para estudiar la posible relación entre la complejidad de la microanatomía de las células piramidales en distintas capas corticales y regiones del cerebro con la densidad de sinapsis, así como con otras características de la organización sináptica.

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

I: ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES HISTOPATOLÓGICAS EN LA FORMACIÓN DEL HIPOCAMPO DE PACIENTES CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER:

1. CA1 fue la región más afectada por la presencia de elementos de PHF_{Tau-ir} y placas de A β _{-ir}, seguida del subículo.
2. GD y CA3 fueron las regiones menos afectadas por la presencia de elementos PHF_{Tau-ir} y placas de A β _{-ir}.
3. Existe una posible correlación entre la presencia de elementos PHF_{Tau-ir}, de placas de A β _{-ir} y la pérdida neuronal en CA1, pero no en otras regiones del hipocampo de pacientes con EA.
4. Una gran proporción de placas A β _{-ir} también se caracterizó por la presencia de neuronas PHF_{Tau-ir}.
5. Todas las placas A β _{-ir} que contenían una de las dos isoformas de PHF_{Tau}, también expresaban la otra isoforma, es decir, si una placa contiene PHF_{Tau-AT8}, también contiene PHF_{Tau-pS396}, y viceversa.
6. El estudio de co-expresión de ambas isoformas de PHF_{Tau}, en las neuronas de CA1, reveló que la mayoría de las neuronas marcadas expresaban solamente PHF_{Tau-pS396}.
7. En resumen, existe una gran variedad entre los pacientes, en cuanto a la densidad y distribución de diversos tipos de placas seniles, así como de neuronas alteradas. Los resultados sugieren que el Alzheimer no es una entidad única, ya que las diferencias se observan incluso en pacientes clasificados como similares según criterios neuropatológicos estándar.

II: DESARROLLO DE UNA HERRAMIENTA EXPLORATORIA DE VISUALIZACIÓN DE DATOS:

8. InTool Explorer permite la visualización de los conjuntos de datos de una manera muy dinámica, versátil y rápida, así como la búsqueda de errores y la reevaluación de nuevas hipótesis o nuevas líneas de investigación, ofreciendo una nueva oportunidad para estudiar y analizar datos complejos.
9. El análisis multidimensional pone de manifiesto que la EA no es una entidad única, incluso dentro de los mismos estadios neuropatológicos, ya que la microanatomía y/o neuroquímica de los cambios que ocurren en el hipocampo varían mucho de un paciente a otro.
10. InTool Explorer facilita el planteamiento de nuevas hipótesis y futuras líneas de investigación en el campo de la neurociencia.

BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso-Nanclares, L., Kastanauskaite, A., Rodriguez, J.R., Gonzalez-Soriano, J., & DeFelipe, J. (2011). A stereological study of synapse number in the epileptic human hippocampus. *Frontiers in Neuroanatomy*, 5(8), 1-13
- Alvarez, P. & Squire, L.R. (1994). Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 7041-7045
- Alzheimer's Association (2018). Alzheimer's Disease Facts and Figures. *Alzheimer's & Dementia*, 14(3), 367-429
- Amador-Ortiz, C., Lin, W.-L., Ahmed, Z., Personett, D., Davies, P., Duara, R., ... Dickson, D. W. (2007). Alzheimer's Disease. *Ann Neurol*, 61(5), 435-445
- Amaral, D.G. & Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3), 571-591
- Amaral, D.G. & Insausti, R. (1990) Hippocampal formation. The human nervous system. Paxinos, G. ed. Academic Press. New York. 711-755
- Amaral, D.G. (1993). Emerging principles of intrinsic hippocampal organization. *Current Opinion in Neurobiology*, 3, 225-229
- Amaral, D.G. & Lavenex, P. Hippocampal Neuroanatomy. En: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, editores. The Hippocampus Book. Universidad de Oxford; Nueva York: 2007. p. 872
- Anderson, R. M., Hadjichrysanthou, C., Evans, S., & Wong, M.M. (2017). Why do so many clinical trials of therapies for Alzheimer's disease fail? *The Lancet*, 390, 2327-2329
- Andrade-Moraes, CH, Oliveira-Pinto, A.V., Castro-Fonseca, E., da Silva, C.G., Guimaraes, D.M., Szczupak, D., ... & Lent, R. (2013). Cell number changes in Alzheimer's disease relate to dementia, not to plaques and tangles. *BRAIN*, 136, 3738 - 3752
- Andrioli, A., Alonso-Nanclares, L., Arellano, J. I., & DeFelipe, J. (2007). Quantitative analysis of parvalbumin-immunoreactive cells in the human epileptic hippocampus. *Neuroscience*, 149(1), 131-143
- Arriagada, P.V, Growdon, J. H., Hedleywhyte, E. T., & Hyman, B.T. (1992). Neurofibrillary Tangles But Not Senile Plaques Parallel Duration and Severity of Alzheimers Disease. *Neurology*, 42(3), 631-639

- Asai, H., Ikezu, S., Tsunoda, S., Medalla, M., Luebke, J., Wolozin, B., Butovsky, O., Kügler, S. & Ikezu, T. (2015). Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci*, 18(11), 1584–1593
- Attems, J., & Jellinger, K.A. (2006). Hippocampal sclerosis in Alzheimer disease and other dementias. *Neurology*, 66(5), 775
- Avila, J. (2004). The influence of aging in one tauopathy: Alzheimer's disease. *Arch Immunol Ther Exp*, 52, 410-413
- Avila, Jesús, León-Espinosa, G., García, E., García-Escudero, V., Hernández, F., & DeFelipe, J. (2012). Tau phosphorylation by GSK3 in different conditions. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2012: 578373
- Avila, J., Perry, G., Strange, B. A., & Hernandez, F. (2015). Alternative neural circuitry that might be impaired in the development of Alzheimer disease. *Frontiers in Neuroscience*, 9, 1–5
- Bartsch, T., & Wulff, P. (2015). The hippocampus in aging and disease: From plasticity to vulnerability. *Neuroscience*, 309, 1–16
- Bartus R.T., Dean R. L., Beer B., Lippa A. S. (1982). The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science*, 217, 408–414
- Benavides-Piccione, R., Regalado-Reyes, M., Fernaud-Espinosa, I., Kastanauskaite, A., Tapia-González, S., León-Espinosa, G., Rojo, C., Insausti, R., Segev, I., DeFelipe, J. (2019). Differential Structure of Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons in the Human and Mouse. *Cereb. Cortex*, 3
- Bennett, R.E., DeVos, S.L., Dujardin, S., Corjuc, B., Gor, R., Gonzalez, J., ... & Hyman, B.T. (2017). Enhanced Tau Aggregation in the Presence of Amyloid β . *American Journal of Pathology*, 187(7), 1601–1612
- Blazquez-Llorca, L., García-Marín, V., & DeFelipe, J. (2010). Pericellular innervation of neurons expressing abnormally hyperphosphorylated tau in the hippocampal formation of Alzheimer's disease patients. *Frontiers in Neuroanatomy*, 4, 1–23
- Blazquez-Llorca, L., Valero-Freitag, S., Rodrigues, E.F., Merchán-Pérez, Á., Rodríguez, J.R., Dorostkar, M.M., ... & Herms, J. (2017). High plasticity of axonal pathology in Alzheimer's disease mouse models. *Acta Neuropathologica Communications*, 5(1), 14
- Bloom, G. S. (2014). Amyloid- β and Tau. *JAMA Neurology*, 71(4), E1–E4

- Boehringer, R., Polygalov, D., Huang, A. J.Y., Middleton, S.J., Robert, V., Wintzer, M.E., ... & McHugh, T.J. (2017). Chronic Loss of CA2 Transmission Leads to Hippocampal Hyperexcitability. *Neuron*, 94(3), 642-655.e9
- Braak, F., Braak, H., & Mandelkow, E. M. (1994). A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathologica*, 87(6), 554–567
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, 82, 239–259
- Braak H, Del Tredici K. (2004). Alzheimer's disease: intraneuronal alterations precede in soluble amyloid-beta formation. *Neurobiology of Aging*, 25:713–718
- Buhl, E. & Whittington, M. (2009) Local circuits. In *The Hippocampus Book*, Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, eds. *Oxford University Press*, New York, pp. 297-315.
- Cabeza, R. & St Jacques, P. (2007). Functional neuroimaging of autobiographical memory. *Trends in Cognitive Sciences*, 11(5):219–227
- Carson, J.A. & Turner, A.J. (2002). Beta-amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP) and other metalloproteinases? *J Neurochem*, 81(1), 1-8
- Chen, W., Abud, E.A., Yeung, S.T., Lakatos, A., Nassi, T., Wang, J., ... & Blurton-Jones, M. (2016). Increased tauopathy drives microglia-mediated clearance of beta-amyloid. *Acta Neuropathologica Communications*, 4(1), 63
- Cherubini, E., & Miles, R. (2015). The CA3 region of the hippocampus: how is it? What is it for? How does it do it? *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 9–11
- Chevaleyre, V., & Piskorowski, R.A. (2016). Hippocampal Area CA2: An Overlooked but Promising Therapeutic Target. *Trends in Molecular Medicine*, 22(8), 645–655
- Chun, H. & Lee, C.J. (2018). Reactive astrocytes in Alzheimer's disease: A double-edged sword. *Neuroscience Research*, 126, 44–52
- Cohen, N., & Squire, L. (1980). Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. *Science*, 210(4466), 207–210
- Condello, C., Schain, A., & Grutzendler, J. (2011). Multicolor time-stamp reveals the dynamics and toxicity of amyloid deposition. *Scientific Reports*, 1, 19

- D'Andrea, M.R., Reiser, P., Gumula, N., Hertzog, B.M., & Andrade-Gordon, P. (2001). Application of triple immunohistochemistry to characterize amyloid plaque-associated inflammation in brains with Alzheimer's disease. *Biotechnic & Histochemistry: Official Publication of the Biological Stain Commission*, 76(2), 97–106
- DeFelipe, J., Fernandez-Gil, A., Kastanauskaite, A., Palacios Bote, R., Gañán Presmanes, Y., & Trinidad Ruiz, M. (2007). Macroanatomy and microanatomy of the temporal lobe. *Semin in Ultrasound CT and MRI*, 28(6), 404-15
- DeFelipe, J. (2010). From the connectome to the synaptome: an epic love story. *Science*, 330, 1198–1201
- Duvernois, H.M. (2005). The Human Hippocampus. Functional anatomy, vascularization and serial sections with MRI. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*
- de Flores, R., La Joie, R., & Chételat, G. (2015). Structural imaging of hippocampal subfields in healthy aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 309, 29–50
- de la Torre J.C. & Mussivan T. (1993). Can disturbed brain microcirculation cause Alzheimer's disease? *Neurol. Res.* 15, 146–153
- Dickson, D.W., Davies, P., Bevona, C., Van Hoeven, K.H., Factor, S. M., Grober, E., & Crystal, H.A. (1994). Hippocampal sclerosis: a common pathological feature of dementia in very old (≥ 80 years of age) humans. *Acta Neuropathologica*, 88(3), 212–221
- Dickson, T.C., King, C.E., McCormack, G.H., Vickers, J.C. (1999). Neurochemical diversity of dystrophic neurites in the early and late stages of Alzheimer's disease. *Exp Neurol*, 156, 100-11
- Dickerson, B.C. & Eichenbaum, H. (2010). The episodic memory system: neurocircuitry and disorders. *Neuropsychopharmacology*, 35, 86-104
- Dubois, B., Feldman, H.H., Jacova, C., DeKosky, S.T., Barberger-Gateau, P. & Cummings, J. (2007) Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet*, 6, 734-46
- Dudai, Y., Karni, A., & Born, J. (2015). The Consolidation and Transformation of Memory. *Neuron*, 88(1), 20–32
- Duvernoy, H.M., Cattin, F., & Risold, P.Y. (2013) The Human Hippocampus (4th edn). Berlin; Heidelberg: Springer.
- Duyckaerts, C., Delatour, B. & Potier, M.C. (2009). Classification and basic pathology of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 118(1), 5-36

- Eichenbaum, H., Dudchenko, P., Wood, E., Shapiro, M. & Tanila, H. (1999). The hippocampus, memory, and place cells: is it spatial memory or a memory space? *Neuron*, 23, 209–226
- Eichenbaum, H. (2000). A cortico-hippocampal system for declarative memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 1, 41-50
- Engelhardt, E., & Gomes Mda, M. (2015). Alzheimer's 100th anniversary of death and his contribution to a better understanding of senile dementia. *Arquivos De Neuro-Psiquiatria*, 73(2), 159-162
- Erkinjuntti, T. (1996). Clinicopathological study of vascular dementia. In: Prohovnik I, Wade J, Knezevic S, Tatemichi TK, Erkinjuntii T (eds) Vascular dementia. Current concepts. John Wiley & Sons, Chichester, 73–112
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Björk-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., & Gage, F.H. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, 4, 1313-1317
- Ferrer, I. (2012). Defining Alzheimer as a common age-related neurodegenerative process not inevitably leading to dementia. *Progress in Neurobiology*, 97(1), 38–51
- Finch, D.M., & Babb, T.L. (1981). Demonstration of caudally directed hippocampal efferents in the rat by intracellular injection of horseradish peroxidase. *Brain Research*, 214, 405–410
- Finch, D.M., Nowlin, N.L., & Babb, T.L. (1983). Demonstration of axonal projections of neurons in the rat hippocampus and subiculum by intracellular injection of HRP. *Brain Res*, 271, 201–216
- Fjell, A.M., McEvoy, L., Holland, D., Dale, A.M., Walhovd, K.B. & Alzheimer's Disease Neuroimaging I. (2014). What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus. *Progress in neurobiology*, 117, 20–40
- Furcila, D., DeFelipe, J., & Alonso-Nanclares, L. (2018). A Study of Amyloid- β and Phospho-tau in Plaques and Neurons in the Hippocampus of Alzheimer's Disease Patients. *Journal of Alzheimer's Disease*, 64, 417–435
- Garcia-Marin, V., García-López, P. & Freire, M. (2007). Cajal's contributions to the study of Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis*, 12(2), 161-74

- Garcia-Marin, V., Blazquez-Llorca, L., Rodriguez, J.-R., Boluda, S., Muntane, G., Ferrer, I., & DeFelipe, J. (2009). Diminished perisomatic GABAergic terminals on cortical neurons adjacent to amyloid plaques. *Frontiers in Neuroanatomy*, 3, 28
- Giannakopoulos, P., Herrmann, F. R., Bussiere, T., Bouras, C., Kovari, E., Perl, D. P., ... & Hof, P. R. (2003). Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology*, 60(9), 1495–1500
- Gibbons, G.S., Lee, V.M.Y., & Trojanowski, J.Q. (2018). Mechanisms of Cell-to-Cell Transmission of Pathological Tau: A Review. *JAMA Neurology*, E1–E8
- Gilbert, P.E., & Brushfield, A.M. (2009). The Role of the CA3 Hippocampal Subregion in Spatial Memory: A Process Oriented Behavioral Assessment. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 33(5), 774–781
- Goedert, M., Jakes, R., & Vanmechelen, E. (1995). Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205. *Neuroscience Letters*, 189(3), 167-169
- Golde, T.E., Borchelt, D.R., Giasson, B.I., & Lewis, J. (2013). Thinking laterally about neurodegenerative proteinopathies. *The Journal of Clinical Investigation*, 123(5), 1847–1855
- Goode B.L., Feinstein S.C. (1994). Identification of a novel microtubule binding and assembly domain in the developmentally regulated inter-repeat region of tau. *J. Cell Biol.* 124, 769–782
- Gomez-Isla, T., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, J. H., Petersen, R.C., ... & Hyman, B. T. (1997). Neuronal Loss Correlates with but Exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's Disease. *Annals of Neurology*, 17–24.
- Gomez-Isla, T., Price, J. L., McKeel Jr, D.W., Morris, J.C., Growdon, J.H., & Hyman, B.T. (1996). Profound Loss of Layer II Entorhinal Cortex Neurons Occurs in Very Mild Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience*, 16(14), 4491–4500
- Gong, C.X., & Iqbal, K. (2008). Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for Alzheimer disease. *Current Medicinal Chemistry*, 15(23), 2321–2328
- Gonzalez-Riano, C., Tapia-González, S., García, A., Muñoz, A., DeFelipe, J., & Barbas, C. (2017). Metabolomics and neuroanatomical evaluation of post-mortem changes in the hippocampus. *Brain Structure and Function*, 222(6), 2831–2853

- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Qunlan, M., Wisniewski, H.M. & Binder, L.I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci USA*, 83(13), 4913-7
- Gundersen, H.J.G. (1986). Stereology of arbitrary particles. *Journal of Microscopy*, 143, 3-45
- Guo, J.P., Arai, T., Miklossy, J., & McGeer, P.L. (2006). Aβ and tau form soluble complexes that may promote self-aggregation of both into the insoluble forms observed in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(6), 1953–1958
- Guo, J. L., & Lee, V. M. Y. (2014). Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases. *Nature Medicine*, 20(2), 130–138
- Gustafson, L. (1996). What is dementia? *Acta Neuropathologica*, 168, 22-24
- Hagmann, P., Cammoun, L., Gigandet, X., Gerhard, S., Ellen Grant, P., Wedeen, V., ... & Sporns, O. (2010). MR connectomics: Principles and challenges. *Journal of Neuroscience Methods*, 194(1), 34–45
- Hardy, J.A., & Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054), 184-185
- Harris, J. A., Koyama, A., Maeda, S., Ho, K., Devidze, N., Dubal, D. B., ... & Mucke, L. (2012). Human P301L-Mutant Tau Expression in Mouse Entorhinal-Hippocampal Network Causes Tau Aggregation and Presynaptic Pathology but No Cognitive Deficits. *PLoS ONE*, 7(9)
- Hegglund, I., Storakaas, I. S., Soligard, H.T., Kibro-Flatmoen, A., & Witter, M.P. (2015). Stereological estimation of neuron number and plaque load in the hippocampal region of a transgenic rat model of Alzheimer's disease. *European Journal of Neuroscience*, 41(9), 1245–1262
- Hempel, H. & Lista, S. (2016). The rising global tide of cognitive impairment. *Nature Reviews Neurology*, 12(3), 131-132
- Henriksen, E.J., Colgin, L.L., Barnes, C. A., Witter, M.P., Moser, M.B., & Moser, E. I. (2010). Spatial representation along the proximodistal axis of CA1. *Neuron*, 68(1), 127–137
- Hoenig, M.C., Bischof, G. N., Hammes, J., Faber, J., Fliessbah, K., Eimeren, T. van, & Drzezga, A. (2017). Tau pathology and cognitive reserve in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 57, 1–7

- Hyman, B.T., Phelps, C.H., Beach, T.G., Bigio, E.H., Cairns, N.J., Carrillo, M.C., Dickson, D.W., Duyckaerts, C., Frosch, M.P., Masliah, E., Mirra, S.S., Nelson, P.T., Schneider, J.A., Rudolf Thal, D., Thies, B., Trojanowski, J.Q., Vinters, H.V. & Montine, T. (2012). National Institute of Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.*, 8(1), 1-13
- Ihara, R., Vincent, B.D., Baxter, M.R., Franklin, E.E., Hassenstab, J.J., Xiong, C., ... & Cairns, N.J. (2018). Relative neuron loss in hippocampal sclerosis of aging and Alzheimer disease. *Annals of Neurology*, 84(5), 741–753
- Ikeda, S. I., Yanagisawa, N., Allsop, D., & Glenner, G. G. (1990). Early senile plaques in Alzheimer's disease demonstrated by histochemistry, immunocytochemistry, and electron microscopy. *Human Pathology*, 21(12), 1221–1226
- Ingelsson, M., Fukumoto, H., Newell, K. L., Growdon, J. H., Hedley-Whyte, E. T., Frosch, M. P., ... & Irizarry, M. C. (2004). Early accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology*, 62(6), 925–931
- Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.X. (2016). Tau and neurodegenerative disease: the story so far. *Nat Rev Neurol*, 12(1), 15-27
- Iqbal, K., del C.Alonso, A. & Grundke-Iqbal, I. (2008). Cytosolic Abnormally Hyperphosphorylated Tau But Not Paired Helical Filaments Sequester Normal MAPs and Inhibit Microtubule Assembly. *J Alzheimers Dis*, 14(4), 365-370
- Insausti, R., & Amaral, D.G. (2004). Hippocampal formation. In: Paxinos G, Mai, J.K., editor. *The Human Nervous System*. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 872-915
- Insausti, R., & Amaral, D.G. (2012). Hippocampal Formation. In *The Human Nervous System (Third Edit)*.
- Ittner, L.M., & Götz, J. (2011). Amyloid- β and tau — a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(2), 65–72
- Johnson G.V. (2006). Tau phosphorylation and proteolysis: insights and perspectives. *J Alzheimers Dis*, 9 243–250
- Josephs, K.A., Dickson, D.W., Tosakulwong, N., Weigand, S.D., Murray, M.E., Petrucelli, L., ... & Whitwell, J.L. (2017). Rates of hippocampal atrophy and presence of post-mortem TDP-43 in patients with Alzheimer's disease: a longitudinal retrospective study. *The Lancet Neurology*, 16(11), 917–924

- Jung, C.K.E., Keppler, K., Steinbach, S., Blazquez-Llorca, L., & Herms, J. (2015). Fibrillar amyloid plaque formation precedes microglial activation. *PLoS ONE*, 10(3), 1–10
- Kalmijn, S., Launer, L. J., Stolk, R. P., Jong, F. H. de, Pols, H. A. P., Hofman, A., ... & Lamberts, S.W.J. (1998). A prospective study on cortisol, dehydroepiandrosterone sulfate, and cognitive function in the elderly. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83(10), 3487–3492
- Karantzoulis, S., & Galvin, J. E. (2011). Distinguishing Alzheimer's disease from other major forms of dementia. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 11(11), 1579–1591
- Kastanauskaite, A., Alonso-Nanclares, L., Blazquez-Llorca, L., Pastor, J., Sola, R.G., & De Felipe, J. (2009). Alterations of the microvascular network in sclerotic hippocampi from patients with epilepsy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 68(8), 939–950
- Katcher, H.L. (2015). Towards an Evidence-based Model of Aging. *Current Aging Science*, 8(1), 46–55
- Kawas, C.H., Kim, R.C., Sonnen, J.A., Bullain, S.S., Trieu, T., & Corrada, M.M. (2015). Multiple pathologies are common and related to dementia in the oldest-old: The 90 + Study. *Neurology*, 85(6), 535–542
- Kametani F., Hasegawa M. (2018). Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease. *Front. Neurosci.* 12:25
- Kawas CH, Kim RC, Sonnen JA, Bullain SS, Trieu T, Corrada MM (2015) Multiple pathologies are common and related to dementia in the oldest-old: The 90 + Study. *Neurology* 85:535–42
- Keigo, K., Pignatelli Michelle, J., R. A., Jung, H. Y., Kitamura, T., Junghyo, S., ... & Tonegawa, S. (2014). Cell type-specific genetic and optogenetic tools reveal novel hippocampal CA2 circuits. *Nat Neurosci*, 17(2), 269–279
- Killian, N.J., Jutras, M.J. & Buffalo, E.A. (2012). A map of visual space in the primate entorhinal cortex. *Nature*, 491, 761–764
- Kimura, T., Ono, T., Takamatsu, J., Yamamoto, H., Ikegami, K., Kondo, A., ... & Miyakawa, T. (1996). Sequential Changes of Tau-Site-Specific Phosphorylation during Development of Paired Helical Filaments. *Dementia*, 7, 177–181

- Knafo, S., Venero, C. Merino-Serrais, P., Fernaudo-Espinosa, I., Gonzales-Soriano, J., Ferrer, I., Santpere, G., & DeFelipe, J. (2009). Morphological alterations to neurons of the amygdala and impaired fear conditioning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of Pathology*, 220, 41–51
- Knafo, S., Alonso-Nanclares, L., Gonzalez-Soriano, J., Merino-Serrais, P., Fernaudo-Espinosa, I., Ferrer, I., & DeFelipe, J. (2009). Widespread changes in dendritic spines in a model of Alzheimer's Disease. *Cerebral Cortex*, 19(3), 586–592
- Knierim, J.J. (2015). The hippocampus. *Current Biology Magazine*, 25, R1107–R1125
- Kril, J.J., Patel, S., Harding, A.J., & Halliday, G.M. (2002). Neuron loss from the hippocampus of Alzheimer's disease exceeds extracellular neurofibrillary tangle formation. *Acta Neuropathologica*, 103(4), 370–376
- Kumar A, Foster T.C. (2007) Neurophysiology of Old Neurons and Synapses. In: Riddle DR, editor. Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, Chapter 10.
- Lace, G., Savva, G. M., Forster, G., De Silva, R., Brayne, C., Matthews, F.E., ... & Wharton, S.B. (2009). Hippocampal tau pathology is related to neuroanatomical connections: An ageing population-based study. *Brain*, 132(5), 1324–1334
- Lazarczyk, M.J., Hof, P.R., Bouras, C., & Giannakopoulos, P. (2012). Preclinical Alzheimer disease: identification of cases at risk among cognitively intact older individuals. *BMC Medicine*, 10(1), 127
- Lee, C.Y.D., & Landreth, G.E. (2010). The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *Journal of Neural Transmission*, 117(8), 949–960
- Libertini, G. (2015). Non-programmed Versus Programmed Aging Paradigm. *Current Aging Science*, 8(1), 56–68
- Liu, H., Yang, Y., Xia, Y., Zhu, W., Leak, R.K., Wei, Z., ... & Hu, X. (2017). Aging of cerebral white matter. *Ageing research reviews*, 34, 64–76
- Llorens-Martín, M., Blazquez-Llorca, L., Benavides-Piccione, R., Rabano, A., Hernandez, F., Avila, J., & DeFelipe, J. (2014). Selective alterations of neurons and circuits related to early memory loss in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8, 38
- Luna-Muñoz, J., Chávez-Macías, L., García-Sierra, F., & Mena, R. (2007). Earliest stages of tau conformational changes are related to the appearance of a sequence of specific phospho-dependent tau epitopes in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 12(4), 365–75

- Lyck, L., Santamaria, I.D., Pakkenberg, B., Chemnitz, J., Schröder, H.D., Finsen, B., & Gundersen, H.J.G. (2009). An empirical analysis of the precision of estimating the numbers of neurons and glia in human neocortex using a fractionator-design with sub-sampling. *Journal of Neuroscience Methods*, 182(2), 143–156
- Mathias Jucker, L.C.W. (2013). Self-propagation of pathogenic aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature*, 501(7465), 45–51
- Matthew, W., Dennis, C., & Maria, T. (2009). Hippocampus and Human Disease. *The Hippocampus Book*, 769–803
- Mattson, M.P. & Magnus, T. (2006). Ageing and neuronal vulnerability. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(4), 278–294
- Meng, X. & D’Arcy, C. (2012). Education and dementia in the context of the cognitive reserve hypothesis: A systematic review with meta-analyses and qualitative analyses. *PLoS ONE*, 7(6)
- Merino-Serrais, P., Knafo, S., Alonso-Nanclares, L., Fernaud-Espinosa, I., & DeFelipe, J. (2011). Layer-specific alterations to CA1 dendritic spines in a mouse model of Alzheimer’s disease. *Hippocampus*, 21(10), 1037–1044
- Merino-Serrais, Paula, Benavides-Piccione, R., Blazquez-Llorca, L., Kastanauskaite, A., Rábano, A., Avila, J., & DeFelipe, J. (2013). The influence of phospho-tau on dendritic spines of cortical pyramidal neurons in patients with Alzheimer’s disease. *Brain*, 136(6), 1913–1928
- Milner B., Squire L. R., Kandel E. R. (1998). Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron*. 20(3), 445–468
- Mirra, S.S., Heyman, A., McKeel, D., Sumi, S.M., Crain, B.J., Brownlee, L.M., Vogel, F.S., Hughes, J.P., van Belle, G., Berg, L. & participating CERAD neuropathologists. (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
- Mohamed, N.V., Herrou, T., Plouffe, V., Piperno, N., & Leclerc, N. (2013). Spreading of tau pathology in Alzheimer’s disease by cell-to-cell transmission. *European Journal of Neuroscience*, 37(12), 1939–1948

- Mondragón-Rodríguez, S., Perry, G., Luna-Muñoz, J., Acevedo-Aquino, M.C., & Williams, S. (2014). Phosphorylation of tau protein at sites Ser396-404 is one of the earliest events in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 40, 121–135
- Morris, R.G.M., Moser, E.I., Riedel, G., Martin, S.J., Sandin, J., Day, M., & O'Carroll, C. (2003). Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: The role of activity-dependent synaptic plasticity in memory. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Biological Sciences*, 358 (1432)
- Morris, G.P., Clark, I.A., & Vissel, B. (2018). Questions concerning the role of amyloid- β in the definition, aetiology and diagnosis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 136(5), 663–689
- Morsch, R., & Simon, W.C.P. (1999). Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 58, 188–197
- Naber, P. A., Lopes Da Silva, F. H., & Witter, M. P. (2001). Reciprocal connections between the entorhinal cortex and hippocampal fields CA1 and the subiculum are in register with the projections from CA1 to the subiculum. *Hippocampus*, 11(2), 99–104
- Nakazawa, Y., Pevzner, A., Kazumasa, T. Z., & Wiltgen, B. J. (2016). Memory retrieval along the proximodistal axis of CA1. *Hippocampus*, 26(2), 367–402
- Neher, T., Cheng, S., & Wiskott, L. (2015). Memory storage fidelity in the hippocampal circuit: the role of subregions and input statistics. *PLoS Computational Biology*, 11(5), e1004250
- Nelson, P.T., Alafuzoff, I., Bigio, E.H., Bouras, C., Braak, H., Cairns, N. J., ... & Beach, T.G. (2012). Correlation of Alzheimer Disease Neuropathologic Changes With Cognitive Status: A Review of the Literature. *J Neuropathol Exp Neurol*, 71(5), 362–381
- Niccoli T. & Partridge L. (2012). Ageing as a risk factor for disease. *Current Biology*, 22 (17), R741–R752
- Nyberg L., Lövdén M., Riklund K., Lindenberger U., Bäckman L. (2012). Memory aging and brain maintenance. *Trends Cogn Sci*, 16, 292–305
- Olton, D., Walker, J. & Gage, F. (1978). Hippocampal connections and spatial discrimination. *Brain Research*, 139, 295-308
- O'Keefe, J. & Nadel, L. (1978). The hippocampus as a cognitive map. *Clarendon Press, Oxford*

- O'Mara, S. (2005). The subiculum: What it does, what it might do, and what neuroanatomy has yet to tell us. *Journal of Anatomy*, 207(3), 271–282
- O'Mara, S.M., Sanchez-Vives, M.V., Brotons-Mas, J.R., & O'Hare, E. (2009). Roles for the subiculum in spatial information processing, memory, motivation and the temporal control of behaviour. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(5), 782–790
- O'Mara, S. (2006). The mammalian subiculum: Contrasting and complementary in vivo and in vitro approaches to subicular function. *Behavioural Brain Research*, 174(2), 197
- Overington, D.W.U., & Jeffery, K. J. (2016). Hidden Depths in the Hippocampal Circuitry. *Neuron*, 91(3), 499–501
- Parbo, P., Ismail, R., Hansen, K. V., Amidi, A., Mårup, F.H., Gottrup, H., ... & Brooks, D. J. (2017). Brain inflammation accompanies amyloid in the majority of mild cognitive impairment cases due to Alzheimer's disease. *Brain*, 140(7), 2002–2011
- Park, D.C. & Reuter-Lorenz, P. (2009) The adaptive brain: aging and neurocognitive scaffolding. *Annu Rev Psychol*, 60, 173–196
- Petersen, R.C., Knopman, D.S., Boeve, B.F., Geda, Y.E., Ivnik, R.J., Smith, G.E., Roberts, R.O. & Jack, C.R. (2009) Mild cognitive impairment: ten years later. *Arch Neurol*, 66 (12), 1447-1455
- Polanco, J.C., Li, C., Bodea, L.G., Martinez-Marmol, R., Meunier, F.A., & Götz, J. (2017). Amyloid- β and tau complexity — towards improved biomarkers and targeted therapies. *Nature Reviews Neurology*, 14(1), 22–39
- Preston, A.R. & Eichenbaum, H. (2013). Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. *Current biology*, 23(17), R764–73
- Price, J.L. & Morris, J.C. (1999). Tangles and plaques in nondemented aging and “preclinical” Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 45, 358-368
- Price, J.L., & Morris, J.C. (2004). So what if tangles precede plaques? *Neurobiology of Aging*, 25(6), 721–723
- Rajendran, L., Bali, J., Barr, M. M., Court, F.A., Kramer-Albers, E.M., Picou, F., ... & Breakefield, X. O. (2014). Emerging Roles of Extracellular Vesicles in the Nervous System. *Journal of Neuroscience*, 34(46), 15482–15489

- Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T.R., Keller, P., Geiger, K.D., Verkade, P., & Simons, K. (2006). Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(30), 11172–11177
- Ramón y Cajal S. (1984). *Recuerdos de mi vida: Historia de mi labor científica*. Madrid: Alianza Editorial S.A.
- Reisberg, B., Ferris S.H., & Crook, T. (1982). The Global Deterioration Scale for assessment of primary degenerative dementia. *Am J Psychiatry*, 139(9), 1136-9
- Rami, L, Solé-Padullés, C., Fortea, J., Bosch, B., Lladó, A., Antonell, A., Olives, J., Castellví, M., Bartres-Faz, D., Sánchez-Valle, & R, Molinuevo, J.L. (2012). Applying the new research diagnostic criteria: MRI findings and neuropsychological correlations of prodromal AD. *Int J Geriatr Psychiatry*, 27(2), 127-34
- Revett, T.J., Baker, G.B., Jhamandas, J., & Kar, S. (2013). Glutamate system, amyloid β peptides and tau protein: Functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 38(1), 6–23
- Robert, V., Cassim, S., Chevalyere, V., & Piskorowski, R.A. (2018). Hippocampal area CA2: properties and contribution to hippocampal function. *Cell and Tissue Research*, 373, 525–540
- Robinson, J.L., Geser, F., Corrada, M.M., Berlau, D.J., Arnold, S.E., Lee, V.M.Y., ... & Trojanowski, J. Q. (2011). Neocortical and hippocampal amyloid- β and tau measures associate with dementia in the oldest-old. *Brain*, 134(12), 3705–3712
- Robinson, J.L., Lee, E.B., Xie, S.X., Rennert, L., Suh, E., Bredenberg, C., ... & Trojanowski, J.Q. (2018). Neurodegenerative disease concomitant proteinopathies are prevalent, age-related and APOE4-associated. *Brain*, 141(7), 2181–2193
- Rocchi, A., Pellegrini, S., Siciliano, G., & Murri, L. (2003) Causative and susceptibility genes for Alzheimer's disease: A review. *Brain Res Bull* 61, 1–24
- Rosenberg R.N. (2005). Translational research on the way to effective therapy for Alzheimer disease. *Archives of general psychiatry*, 62(11), 1186–1192
- Salthouse, T.A. (2009). When does age-related cognitive decline begin? *Neurobiology of Aging*, 30(4), 507–514
- Schultz, H., Sommer, T., & Peters, J. (2015). The Role of the Human Entorhinal Cortex in a Representational Account of Memory. *Frontiers in human neuroscience*, 9, 628

- Schneider, A., Biernat, J., von Bergen, M., Mandelkow, E., Mandelkow, E.M. (1999). Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry*, 38(12), 3549-58
- Scoville, W.V. & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiat*, 20, 11
- Sepulcre, J., Grothe, M.J., Sabuncu, M., Chhatwal, J., Schultz, A.P., Hanseeuw, B., ... & Johnson, K.A. (2017). Hierarchical Organization of Tau and Amyloid Deposits in the Cerebral Cortex. *JAMA Neurology*, 74(7), 813
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E. & Hyman, B.T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 1(1), a006189
- Serrano-Pozo, A., Muzikansky, A., Gómez-Isla, T., Growdon, J. H., Betensky, R.A., Frosch, M.P., & Hyman, B.T. (2013). Differential Relationships of Reactive Astrocytes and Microglia to Fibrillar Amyloid Deposits in Alzheimer Disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 72(6), 462–471
- Shoji, M., Golde, T.E., Ghiso, J., Cheung, T.T., Estus, S., Shaffer, L.M., Cai, X.D., McKay, D.M., Tintner, R., & Frangione, B. (1992). Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science*, 258(5079), 126-129
- Shrager, Y., Levy, D. A., Hopkins, R.O., & Squire, L.R. (2008). Working memory and the organization of brain systems. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(18), 4818–4822
- Skulachev, V.P. & Longo, V.D. (2005). Aging as a mitochondria-mediated atavistic program: can aging be switched off? *Ann N Y Acad Scie*, 1057, 145-64
- Simic, G.Š., Kostovic, I., Winblad, B., & Bogdanovic, N. (1997). Volume and Number of Neurons of the Human Hippocampal Formation in Normal Aging and Alzheimer's Disease. *J Comp Neurol*, 379, 482–494
- Small, S.A., Nava, A.S., Perera, G.M., DeLaPaz, R., Mayeux, R. & Stern, Y. (2001). Circuit mechanisms underlying memory encoding and retrieval in the long axis of the hippocampal formation. *Nat Neurosci*, 4(4), 442–449
- Spencer, D.D. & Engel, J.Jr. (1993). Technical controversies. In: J. Engel Jr. Surgical Treatment of Epilepsies. *New York: Raven Press*, p. 583–586

- Sperling, R.A., Aisen, P.S., Beckett, L.A., Bennett, D.A., Craft, S., Fagan, A.M. & Phelps, C.H. (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*, 7(3), 280-92
- Spires-Jones, T.L. & Hyman, B.T. (2014). The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron*, 82, 756-771
- Spires-Jones, T.L., Attems, J., & Thal, D. R. (2017). Interactions of pathological proteins in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathologica*, 134(2), 187–205
- Spires, T.L., Meyer-luehmann, M., Stern, E. A., Mclean, P. J., Nguyen, P. T., Bacskai, B. J., & Hyman, B. T. (2005). Dendritic spine abnormalities in APP transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravital multiphoton microscopy. *J Neurosci*, 25(31), 7278–7287
- Stark, S.M., Frithsen, A. & Stark, C.E.L. (2019). Age-related alterations in functional connectivity along the longitudinal axis of the hippocampus and its subfields. *BioRxiv* 577361
- Steffener, J. & Stern, Y. (2012). Exploring the Neural Basis of Cognitive Reserve in Aging. *Biochim Biophys Acta*, 1822(3), 467–473
- Stern, Y. (2006). Cognitive reserve and Alzheimer's disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 20, 69-74
- Stern, Y. (2012). Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease. *Lancet Neurology*, 11, 1006–1012
- Stopford, C.L., Snowden, J.S., Thompson, J.C. & Neary, D. (2008). Variability in cognitive presentation of Alzheimer's disease. *Cortex*, 44:185–195
- Strange, B.A., Witter, M.P., Lein, E.S. & Moser, E.I. (2014). Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat Rev Neurosci*, 15(10), 655-69
- Streit, W.J., Braak, H., Xue, Q.S., & Bechmann, I. (2009). Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 118, 475–485
- Su, J.H, Cummings, B.J., & Cotman, C.W. (1994). Early phosphorylation of tau in Alzheimer's disease occurs at Ser-202 and is preferentially located within neurites. *Neuroreport*, 5(17), 2358–2362

- Su, J.H., Cummings, B.J., & Cotman, C.W. (1996). Plaque biogenesis in brain aging and alzheimer's disease. I. progressive changes in phosphorylation states of paired helical filaments and neurofilaments. *Brain Research*, 739(1-2), 79-87
- Suwabe, K., Byun, K., Hyodo, K., Reagh, Z. M., Roberts, J. M., Matsushita, A., ... & Soya, H. (2018). Rapid stimulation of human dentate gyrus function with acute mild exercise. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(41), 10487–10492
- Terry, R.D., Masliah, E., Salmon, D.P., Butters, N., Deteresa, R., Hill, R., ... & Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Annals of Neurology*, (30), 572–580
- Thal, D.R., Capetillo-Zarate, E., Del Tredici, K., & Braak, H. (2006). The Development of Amyloid beta Protein Deposits in the Aged Brain. *Science of Aging Knowledge Environment*, 6
- Thal, D.R., Rüb, U., Orantes, M., & Braak, H. (2002). Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*, 58(12), 1791–1800
- Thompson, C.L., Pathak, S.D., Jeromin, A., Ng, L.L., MacPherson, C.R., Mortrud, M.T., Cusick, A., Riley, Z.L., ... & Lein, E.S. (2008). Genomic anatomy of the hippocampus. *Neuron*, 60, 1010–1021
- Toussaint, O., Medrano, E.E., & Von Zglinicki, T. (2000). Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Experimental Gerontology*, 35(8), 927–945
- Tucker, A.M. & Stern, Y. (2011). Cognitive reserve in aging. *Current Alzheimer Research*, 8(4), 354–360
- Tulving, E. & Markowitsch, H. J. (1998). Episodic and declarative memory: Role of the hippocampus. *Hippocampus*, 8(3), 198–204
- Uryu, K., Nakashima-Yasuda, H., Forman, M. S., Kwong, L.K., Clark, C.M., Grossman, M., ... & Neumann, M. (2008). Concomitant TAR-DNA-Binding Protein 43 Pathology is Present in Alzheimer Disease and Corticobasal Degeneration but Not in Other Tauopathies. *J Neuropathol Exp Neurol*, 67(6), 555–564
- Valls-Pedret, C., Molinuevo, J.L., Rami, L. (2010) Diagnóstico precoz de la enfermedad de Alzheimer: fase prodrómica y preclínica. *Rev Neurol*, 51: 471-80

- Velez-Pardo, C., Arellano, J.I., Cardona-Gomez, P., Jimenez del Rio, M., Lopera, F., DeFelipe, J. (2004). CA1 hippocampal neuronal loss in familial Alzheimer's disease presenilin-1 E280A mutation is related to epilepsy. *Epilepsia*, 45(7), 751-6
- Vemuri, P. & Schöll, M. (2017). Linking Amyloid- β and Tau Deposition in Alzheimer Disease. *JAMA Neurology*, 74(7), 766
- Wajman, J.R., Oliveira, F.F., Marin, S.M.C., Schultz, R.R. & Bertolucci, P.H.F. (2014). Is there correlation between cognition and functionality in severe dementia? The value of a performance-based ecological assessment for Alzheimer's disease. *Arq Neuropsiquiatr*, 72(11), 845-850
- Wang, J., Gu, B.J., Masters, C.L., & Wang, Y. J. (2017). A systemic view of Alzheimer disease - Insights from amyloid- β metabolism beyond the brain. *Nature Reviews Neurology*, 13, 612–623. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.111>
- Weinert, B.T. & Timiras, P.S. (2003). Invited review: theories of aging. *J Appl Physiol*, 95 (4), 1706-16
- West, M.J., Coleman, P.D., Flood, D.G., & Troncoso, J.C. (1994). Differences in the Pattern of Hippocampal Neuronal Loss in Normal Aging and Alzheimers-Disease. *Lancet*, 344, 769–772
- West, M.J. & Gundersen, H.J.G. (1990). Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *The Journal of Comparative Neurology*, 296, 1-22
- Witter, M.P., Groenewegen, H.J., Silva, F.H.L. Da, & Lohman, A.H.M. (1989). Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Progress in Neurobiology*, 33, 161–253
- Witter, M.P., Amaral, D.G. (1991) Entorhinal cortex of the monkey: V. Projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex. *J Comp Neurol*, 307(3), 437-59
- Witter, M.P. (1993) Organization of the entorhinal-hippocampal system: a review of current anatomical data. *Hippocampus*, vol. 3, 33-44
- Wittner, L., Henze, D.A., Záborszky, L., & Buzsáki, G. (2006). Hippocampal CA3 pyramidal cells selectively innervate aspiny interneurons. *European Journal of Neuroscience*, 24(5), 1286–1298

- Zarow, C., Vinters, H.V., Ellis, W.G., Weiner, M.W., Mungas, D., White, L., & Chui, H.C. (2005). Correlates of Hippocampal Neuron Number in Alzheimer's Disease and Ischemic Vascular Dementia. *Ann Neurol*, 57(6), 896–903
- Zeidman, P. & Maguire, E.A. (2016). Anterior hippocampus: the anatomy of perception, imagination and episodic memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(3), 173–182
- Zheng-Fischhöfer, Q., Biernat, J., Mandelkow, E.M., Illenberger, S., Godemann, R., Mandelkow, E. (1998). Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3beta and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation. *Eur J Biochem*, 252(3), 542-52
- Zhang, Y., Li, P., Feng, J., & Wu, M. (2016). Dysfunction of NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Neurological Sciences*, 37, 1039–1047
- Zola-Morgan, S., Squire, L.R., Amaral, D.G. (1986). Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 6(10), 2950–2967

**ANEXO: PUBLICACIONES
CIENTÍFICAS DE LOS RESULTADOS**

VIII: ANEXO: PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

DE LOS RESULTADOS

I. Pág. 143

Furcila, D., DeFelipe, J., & Alonso-Nanclares, L. (2018). A Study of Amyloid- β and Phosphotau in Plaques and Neurons in the Hippocampus of Alzheimer's Disease Patients. *Journal of Alzheimer's Disease*, 64 (2), 417- 435

II. Pág. 163

Furcila, D., Garcia, M., Toader, C., Morales, J., LaTorre, A., Rodríguez, A., Pastor, L., DeFelipe, J., & Alonso-Nanclares, L. InTool Explorer: an interactive exploratory analysis tool for versatile visualizations of neuroscientific data. *Frontiers in Neuroanatomy*, 13, 28

III. Pág. 181

Regalado-Reyes, M., Furcila, D., Hernández, F., Ávila, J., DeFelipe, J., & León-Espinosa, G. Phospho-Tau Changes in the Human CA1 During Alzheimer's Disease Progression. *Journal of Alzheimer's Disease*, 1-12

IV. (en revisión)

Furcila, D., DeFelipe, J., & Alonso-Nanclares, L. Selective distribution of neurofibrillary tangles and amyloid plaques in the hippocampus of patients with Alzheimer's Disease: a stereological approach. *Frontiers in Neuroanatomy*

A Study of Amyloid- β and Phosphotau in Plaques and Neurons in the Hippocampus of Alzheimer's Disease Patients

Diana Furcila^{a,b,c}, Javier DeFelipe^{a,b,d} and Lidia Alonso-Nanclares^{a,b,d,*}

^aLaboratorio Cajal de Circuitos Corticales (CTB), Universidad Politécnica de Madrid, Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain

^bCentro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain

^cFacultad de Psicología, Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), Madrid, Spain

^dDepartamento de Neurobiología Funcional y de Sistemas, Instituto Cajal (CSIC), Madrid, Spain

Accepted 23 April 2018

Abstract. The main pathological hallmarks in Alzheimer's disease (AD) are the presence of extracellular amyloid plaques, primarily consisting of amyloid- β (A β) peptide, and the accumulation of paired helical filaments of hyperphosphorylated tau protein (PHF-Tau) within neurons. Since CA1 is one of the most affected regions in AD, mainly at early stages, we have performed a detailed analysis of the CA1 region from 11 AD patients (demented and clinically similar; Braak stages IV–VI) to better understand the possible relationship between the presence and distribution of different neurochemical types of A β plaques and PHF-Tau immunoreactive (_{ir}) neurons. Hence, we have examined hippocampal sections in confocal microscopy images from double and triple-immunostained sections, to study labeled plaques and PHF-Tau-_{ir} neurons using specific software tools. There are four main findings in the present study. First, the pyramidal layer of proximal CA1 (close to CA2) contains the smallest number of both plaques and PHF-Tau-_{ir} neurons. Second, a large proportion of A β -_{ir} plaques were also characterized by the presence of PHF-Tau-_{ir}. Third, all plaques containing one of the two PHF-Tau isoforms also express the other isoform, that is, if a plaque contains PHF_{pS396}, it also contains PHF_{AT8}, and vice versa. Fourth, the coexpression study of both PHF-Tau isoforms in CA1 neurons revealed that most of the labeled neurons express only PHF_{pS396}. Our findings further support the idea that AD is not a unique entity even within the same neuropathological stage, since the microanatomical/neurochemical changes that occur in the hippocampus greatly vary from one patient to another.

Keywords: Confocal microscopy, hippocampal CA1 field, immunofluorescence, methoxy-X04, neurofibrillary tangles, senile plaques, tau protein

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is a progressive brain disease and the most common cause of dementia [1]. The main pathological hallmarks in AD are the presence of extracellular amyloid plaques, primar-

ily consisting of amyloid- β (A β) peptide, and the accumulation within neurons of paired helical filaments of hyperphosphorylated tau protein (PHF-Tau), which are known as neurofibrillary tangles (NFTs) [2–4].

Symptoms in early stages of AD are impairment of declarative memory, disorientation, and loss of context [5, 6]. The main brain structures that support these functions include the medial temporal lobe, especially the hippocampal formation and adjacent cortex [7, 8]. In particular, the CA1 hippocampal region is critical in spatial orientation, learning and in different memory functions, such as the retrieval

*Correspondence to: Lidia Alonso-Nanclares, Laboratorio Cajal de Circuitos Corticales (CTB), Universidad Politécnica de Madrid, Campus de Montegancedo s/n, 28223 Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain; Departamento de Neurobiología Funcional y de Sistemas, Instituto Cajal (CSIC), Avda. Doctor Arce 37, 28002 Madrid, Spain. Tel.: +34 913364637; E-mail: aidil@cajal.csic.es.

of remote episodic memory and the strength of established memories [8–14]. Moreover, it has been shown that CA1 is one of the most affected regions in AD, mainly at early stages [14–18]. A variety of alterations have been widely reported in CA1 from AD patients, such as a decrease in the number of neurons [19–21] and neuronal alterations, including dendritic changes in pyramidal cells [14, 22, 23].

It is becoming apparent that the accumulation of A β plaques does not correlate with cognitive impairments in AD patients. Indeed, a large number of individuals without any cognitive impairment accumulate A β plaques in their brains [24–26]. However, the presence of PHF-Tau has been related to cognitive impairment in AD [22, 27] and there is evidence that it produces changes in the microanatomy of pyramidal neurons [22] and neurodegeneration [28]. Moreover, PHF-Tau has been reported to affect, among other functions, mitochondrial activity and axonal transport, and it has been proposed to make neurons vulnerable to A β [29]. Nevertheless, it is still unclear how pathological forms of tau and A β interact during the progression of AD, and understanding the underlying mechanism responsible for their possible potentiation is critical [28, 30–32].

In the present study, we performed a detailed analysis of different layers of the CA1 region from AD patients (demented and clinically similar; Braak stages V–VI) to try to better understand the possible relationship between the presence and distribution of different neurochemical types of A β plaques and PHF-Tau-ir neurons. For this purpose, we examined hippocampal sections and generated maps of labeled elements using specific software tools in confocal microscopy images from double- and triple-immunostained sections from these patients. The aim was to generate maps of plaque location and protein co-expression patterns (A β and PHF-Tau) to examine possible differences in the laminar and spatial distribution of labeled elements.

We also examined location and expression pattern of neurons containing NFTs labeled with different PHF-Tau isoforms (PHF_{PS396} and PHF_{AT8}). We found that although labeled plaques and PHF-Tau-ir neurons revealed highly variable expression patterns between patients, the pyramidal layer of the proximal portion of CA1 region (close to CA2) contained both the lowest number of plaques and PHF-Tau-ir neurons. Furthermore, we found that a large proportion of A β -ir plaques were also characterized by the presence of PHF-Tau, whereas plaques lacking A β (i.e., plaques

stained only with PHF_{PS396} or PHF_{AT8}) were unusual. Finally, the study of the expression of PHF-Tau isoforms in neurons revealed that the majority of the CA1 labeled neurons in these patients expressed only PHF_{PS396}.

MATERIALS AND METHODS

Tissue preparation

Human brain tissue was obtained from 11 patients (postmortem delay between 2 and 5.75 h; between 76 and 95 years old at time of death) diagnosed as having AD according to neuropathological examination as stated by Braak and Braak (1991) [33] and CERAD criteria [34]. These samples were obtained from two different sources: Banc de Teixits Neurologics from Hospital Universitari Clinic de Barcelona (Dr. I. Ferrer, Servicio de Anatomía Patológica, IBIDELL-Hospital Universitario de Bellvitge, Barcelona, Spain) and the Banco de Tejidos Fundación CIEN (Dr. A. Rábano, Área de Neuropatología, Centro Alzheimer, Fundación Reina Sofía, Madrid, Spain), following the guidelines of the Helsinki Declaration and with the approval of the local Ethical Committees. Clinical data and other variables from patients were obtained from the neurologist of each patient (Table 1).

Tissue blocks were fixed (4% paraformaldehyde for 24 h at 4°C), cryoprotected (30% sucrose solution for at least 24 h) and deep-frozen (–80°C) for preservation. The blocks containing the hippocampus were cut with a sliding microtome (Thermo Fischer Scientific, MICROM, HM450; freeze unit, KS34, Massachusetts, USA), at –40°C, in serial coronal sections (50 μ m thick) and collected in 0.1 M PB for further processing.

Immunohistochemistry

Sections were first rinsed in 0.1 M PB, pretreated in 2% H₂O₂ for 30 min to remove endogenous peroxidase activity, and then incubated for 1 h at room temperature in a solution of 3% normal goat or horse serum (for polyclonal antisera and monoclonal antibodies, respectively; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) and 0.25% Triton-X (Merck, Darmstadt, Germany). The sections were then incubated for 48 h at 4°C with mouse anti-NeuN antibody (1:2000; Chemicon; MAB377, Temecula, CA, USA). Afterwards, sections were processed with a sec-

Table 1
Summary of clinical and pathological data

Patient	Gender	Age at diagnosis (y)	Disease progression (y)	Braak Stage	CERAD Stage	Co-pathology	Family history of dementia	Postmortem delay (h:m)
Az1 ^B	Male	80	10	VI	C	Microinfarctions	AD	4:30
Az2 ^B	Female	70	12	V	C	α Syn (amygdala)	No	2:00
Az3 ^B	Female	79	2	V	C	TDP43	No	5:30
Az4 ^B	Female	78	9	IV	B	TDP43	AD	5:30
Az5 ^B	Female	69	14	V/VI	C	Cortical infarctions	Dementia	4:00
Az6 ^B	Female	69	7	V	C	TDP43 (limbic)	Dementia	5:00
Az7 ^B	Female	89	NA	VI	C	TDP43 (amygdala)	AD	4:15
Az8 ^B	Female	77	8	VI	C	NA	No	5:45
Az9 ^B	Female	76	8	VI	C	TDP43 (limbic); α Syn (orbitofrontal)	AD	5:00
Az10 ^B	Female	71	9	V	C	Meningioma	MCI	5:00
Az11 ^M	Female	82	13	V	NA	NA	No	4:00

Braak Stages [33]: I–II (NFTs in entorhinal cortex and closely related areas); III–IV (NFTs abundant in amygdala and hippocampus and extending slightly into the association cortex); V–VI (NFTs widely distributed throughout the neocortex and ultimately involving primary motor and sensory areas). CERAD Stages [34]: A, low density of neuritic plaques; B, intermediate density of neuritic plaques; C, high density of neuritic plaques. α Syn, alpha synuclein protein; AD, Alzheimer's disease; MCI, mild cognitive impairment. TDP43: TAR DNA-binding protein 43; ^BBanc de Teixits Neurologics (Hospital Universitari Clinic de Barcelona); ^MBanco de Tejidos Fundación CIEN (Madrid); NA, data not available.

ondary biotinylated horse anti-mouse IgG antibody (1:200, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), then incubated for 1 h in an avidin-biotin peroxidase complex (Vectastain ABC Elite PK6100, Vector) and, then, with the chromogen 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Finally, sections were dehydrated, cleared with xylene and cover-slipped. NeuN-immunostained sections were used to identify the hippocampal areas, especially CA1 boundaries.

Double and triple immunofluorescence

To ascertain the possible relation between A β and PHF-Tau, some sections were double stained combining anti-A β and different anti-PHF-Tau antibodies. Selected sections were first treated with 88% formic acid (Sigma-Aldrich, No. 251364, St. Louis, MO, USA) to prepare them for plaque immunostaining, and then they were incubated in a solution containing mouse antibody anti-A β (clone 6F/3D; 1:50, Dako M0872, Glostrup, Denmark). These sections were also treated with anti-PHF-Tau antibodies to study tau pathology [35–37], using the following antibodies: anti-human PHF-Tau clone PHF1 pS396 (1:2000, Invitrogen Corp., 44752G Carlsbad, CA, USA) and anti-human PHF-Tau antibody clone AT8 pSer202+Thr205 (1:2000, MN1020, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). For the sake of clarity, we refer to these antibodies as: anti-PHF_{pS396} and anti-PHF_{AT8}, respectively. The sections were incubated in a solution containing the following combinations

of primary antibodies: anti-A β /anti-PHF_{pS396}, anti-A β /anti-PHF_{AT8} and anti-PHF_{pS396}/anti-PHF_{AT8}. After rinsing in 0.1 M PB, sections were incubated for 2 h at room temperature in different solutions containing a goat anti-rabbit antibody coupled to Alexa Fluor 594 and a goat anti-mouse coupled to Alexa Fluor 488 (1:1000; Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Finally, sections were treated with Autofluorescence Eliminator Reagent (Chemicon) to reduce or eliminate lipofuscin like-autofluorescence. The sections were then washed and mounted with ProLong Gold Antifade Reagent (Invitrogen Corp.). In addition, triple-labeled sections were used to examine the relationships between PHF_{pS396}, PHF_{AT8} and plaques in the same sections. To perform this study, immunolabeled sections for both PHF_{pS396} and PHF_{AT8} were also stained with Methoxy-X04 reagent (10 mg/mL). Methoxy-X04 is a fluorescent histological marker (Xcess Biosciences Inc., San Diego, CA, USA) derivative of Congo Red which stains plaques in postmortem sections of AD brain tissue samples [38].

Image acquisition and analysis

Sections were examined with a Zeiss LSM 710 confocal laser scanning system (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany). Fluorescence emission was recorded through separated channels. To analyze all plaques present in the double-stained sections containing the CA1 region, we obtained tiled image stacks recorded at 3 μ m z-interval through

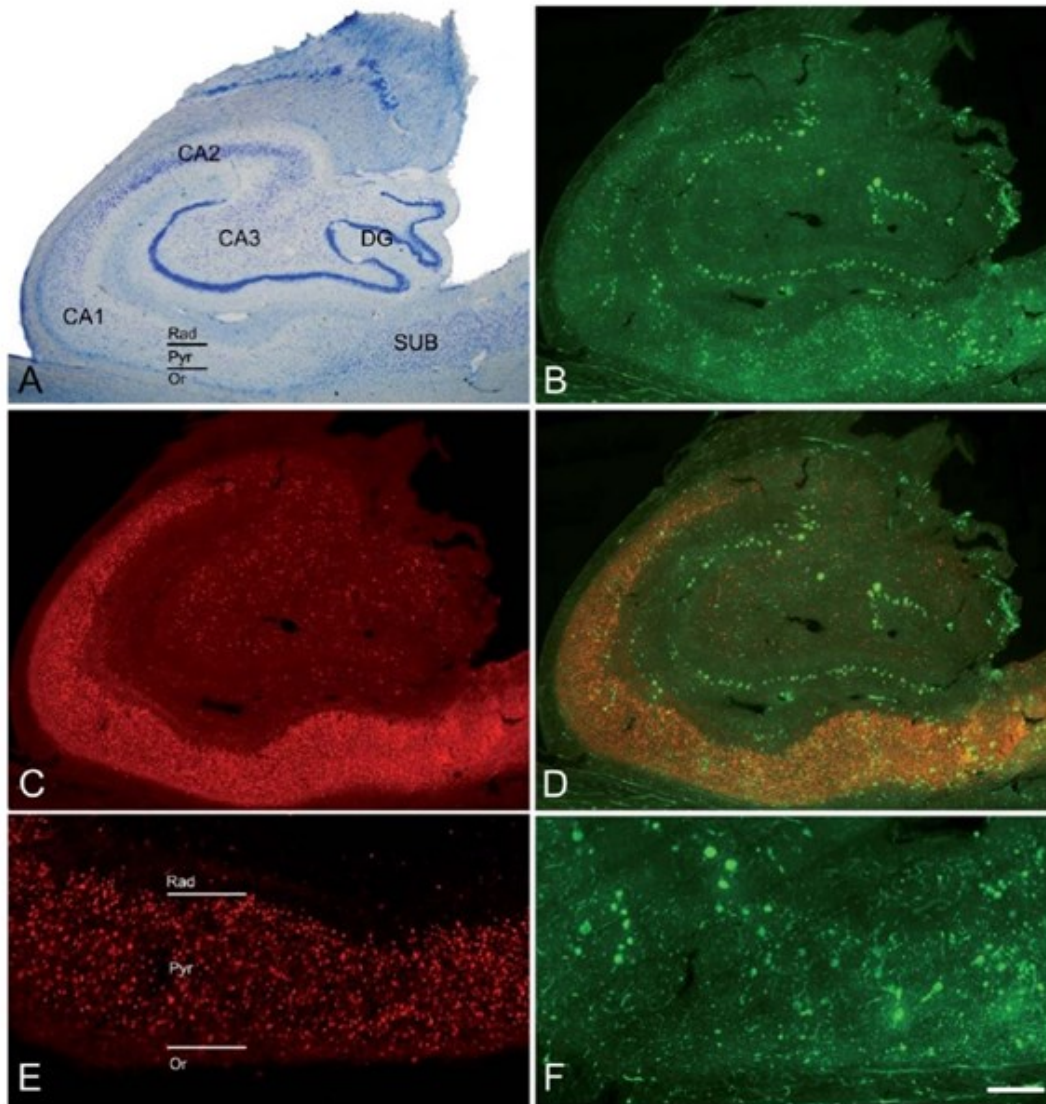


Fig. 1. The hippocampal formation from an AD patient. A) Nissl-stained section from an AD patient (Az6) to illustrate the hippocampal fields. Note the neuronal loss in CA1. B) Confocal images showing immunostaining for anti-A β and C) anti-PHF_{pS396}, taken from a double-immunostained section to illustrate the distribution pattern of A β -ir plaques and PHF_{pS396-ir} neurons, respectively. D) Merge of both channels showing both anti-A β and anti-PHF_{pS396} antibody labeling. E, F) Higher magnification of the CA1 region to show the immunostaining pattern of PHF_{pS396-ir} neurons (E) and A β -ir plaques (F). DG, dentate gyrus; CA1–CA3, *cornu ammonis* fields; SUB, subiculum; Rad, stratum radiatum; Pyr, stratum pyramidale; Or, stratum oriens. Scale bar (in F): 20 μ m in A; 25 μ m in B, C, D; 50 μ m in E, F.

separate channels with a 40x oil-immersion lens (Objective Plan-Apochromat 40x NA, 1.3 Oil). The number of optical planes in the confocal stacks ranged from 12 to 20 planes. In addition, individual examination of every single plaque in triple-labeled sections was performed by acquisition of image stacks at 0.5–1 μ m z-interval through separate channels with the same lens described. The number of optical planes in the confocal stacks ranged from 34 to 69 planes.

Composite images to visualize the entire CA1 region analyzed were constructed combining the confocal image stacks recorded through the different channels using Zen software (ZEN 2012, Carl Zeiss Microscopy GmbH; Fig. 1). The same software was used to obtain Z projection images (image resolution: 1024 \times 1024 pixels). In addition, every single plaque was individually evaluated to assess its specific staining (PHF_{pS396}, PHF_{AT8}, A β , or Methoxy-X04) using

the same software package. The software used to compose figures was Adobe Photoshop (CS4, v11.0, Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA).

Sections treated with antibodies against both isoforms of PHF-Tau were analyzed with Imaris software (7.1.5 Bitplane AG, Zurich, Switzerland) to estimate the number of neurons expressing PHF_{pS396} and/or PHF_{AT8}. Briefly, this analysis consisted of the semi-automatic segmentation of neurons by the placement of spots of 20 μ m diameter (average size of a neuronal soma) in each immunolabeled neuron. Spots of different colors were used to mark PHF_{pS396}, PHF_{AT8} neurons and those expressing both markers.

RESULTS

For the sake of clarity, in the present study we shall use the terms “co-localization” and “co-expression” to refer to the co-labeling of staining in plaques and neurons, respectively. In the case of plaques, their staining using two or more markers were considered to be co-localized when the different labeled elements of the plaques showed a full or partial spatial overlap. In the case of neurons, co-expression of two markers refers to when the two markers were located in the same neuron.

We have mapped the expression patterns of A β -ir and PHF-Tau-ir in plaques of six AD patients (Az1–Az6) using Zen software (ZEN 2012, Carl Zeiss Microscopy GmbH), which provides the three-dimensional location of the labeled plaques in all acquired channels. The whole CA1 field was studied, and the examined area ranged from 1.14 to 8.8 mm² per case. Moreover, the study of neurons containing PHF_{pS396}-ir and PHF_{AT8}-ir was also performed in the whole CA1 in these same AD patients using the Imaris package.

In addition, plaques were studied in sections simultaneously labeled with both anti-PHF-Tau antibodies and Methoxy-X04 staining. These triple-immunostained sections (Methoxy-X04/PHF_{pS396}/PHF_{AT8}) were used to study the co-localization patterns of A β and PHF-Tau in CA1 plaques, in eleven AD patients (Az1–Az11) to provide information of their co-localization within plaques.

Plaque distribution in CA1

Immunostaining with anti-A β antibody revealed the presence of numerous plaques in all examined AD patients.

First, we analyzed the distribution of A β -labeled plaques in double-immunostained sections using three different combinations: A β /PHF_{pS396}, A β /PHF_{AT8}, and PHF_{pS396}/PHF_{AT8} (Fig. 1). CA1 was arbitrarily subdivided into three equal portions: proximal (closer to CA2), medial and distal (closer to the subiculum), as previously described [39]. In addition, plaques were categorized according to their position in different CA1 strata (Figs. 1A, E, 2): oriens, pyramidale, radiatum, and lacunosum-moleculare. However, the stratum lacunosum-moleculare was not further considered since we did not observe the presence of plaques in this stratum (Fig. 3). The precise location of each analyzed plaque in CA1 was determined (Fig. 2). Briefly, most plaques (41%) were located in the medial portion of the CA1 pyramidal layer, followed by the distal CA1 portion (37%) and proximal portion (22%; Table 2). In addition, the pyramidal layer contained most of the plaques (84%), in agreement with previous reports [40], while in the stratum oriens, plaques were very scarce (1%).

Co-localization of A β and PHF-Tau in CA1 plaques

We characterized CA1 plaques according to their labeling with A β markers and PHF-Tau antibodies using double and triple staining.

Co-localization of A β and PHF-Tau proteins in double-stained sections

First, we examined the co-expression of A β with PHF_{pS396} and A β with PHF_{AT8}. A total of 251 plaques were examined in double-stained sections for A β /PHF_{pS396} (Fig. 4). Most of them (93%) were identified with anti-A β , with this percentage breaking down into 44% displaying only A β -ir, and 49% showing both A β -ir/PHF_{pS396}-ir (Fig. 5A). Thus, only 7% of plaques did not display anti-A β , and they were identified only with anti-PHF_{pS396} (Figs. 4B, 5A). In the case of double-stained sections for A β /PHF_{AT8}, we analyzed a total of 183 plaques, of which 84% were identified with anti-A β (comprising 57% displaying only A β -ir and 27% showing both A β -ir/PHF_{AT8}-ir), whereas 16% of the plaques were identified only with anti-PHF_{AT8} (Figs. 4D, 5B).

Since we observed plaques that did not show A β -ir (Figs. 4B, 4D, 5) the next step was to analyze double-immunostained sections for both isoforms of PHF-Tau: combining PHF_{pS396} and PHF_{AT8} antibodies. We identified a total of 189 plaques, all of which

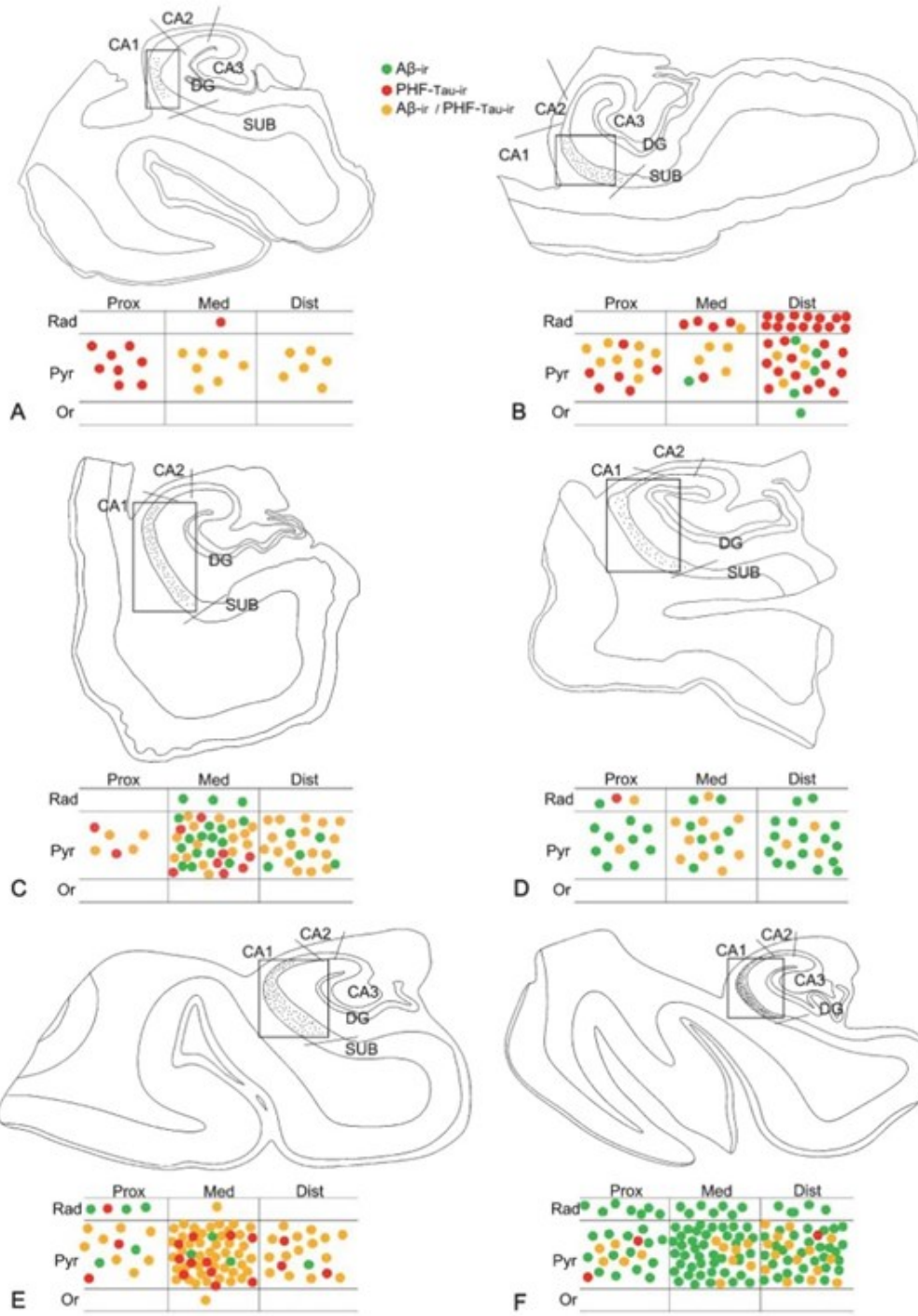


Fig. 2. Maps of the hippocampal formation from AD patients to illustrate plaque distribution and staining patterns in CA1. Plots are based on the analysis of double-immunostained sections for anti-A β and anti-PHF-Tau antibodies. Borders between hippocampal fields are indicated by lines. CA1 is marked with a rectangle. Below each section profile, CA1 is shown schematically with its corresponding subregions and layers. Green dots correspond to A β -ir plaques, red dots to PHF-Tau-ir plaques (either PHF_{PS396} or PHF_{AT8}), and yellow dots indicate plaques expressing both A β and PHF-Tau proteins. A–F) Representative drawings from patients Az1, Az2, Az3, Az4, Az5 and Az6, respectively. DG, dentate gyrus; CA1–CA3, *cornu ammonis* fields; SUB, subiculum; Prox, proximal; Med, medial; Dist, distal; Or, stratum oriens; Pyr, stratum pyramidale; Rad, stratum radiatum. Scale bar (in F): 2000 μ m.

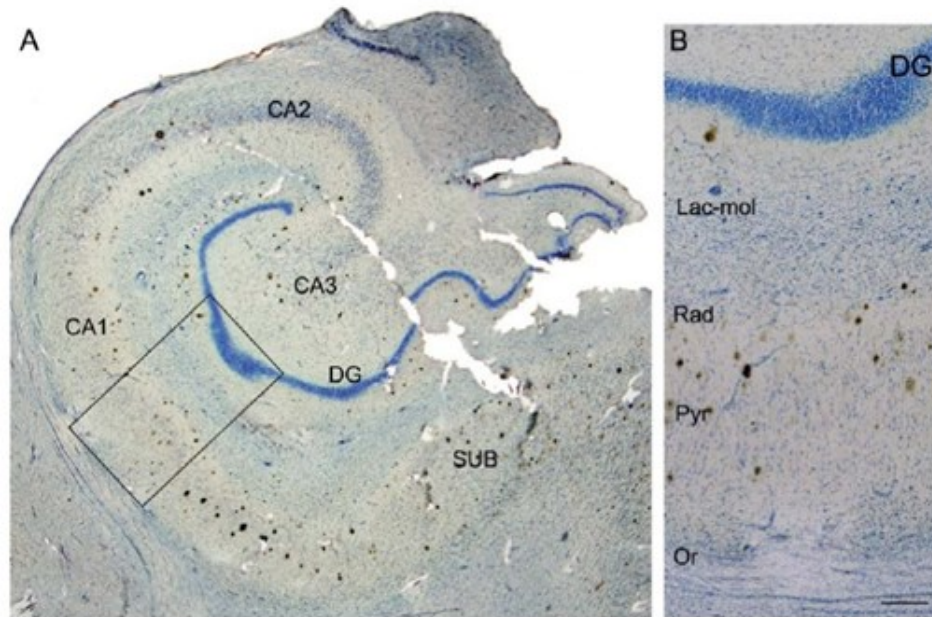


Fig. 3. Photomicrograph of the hippocampal formation from an AD patient in a double-stained section (Nissl and anti-A β). A) Low-power microphotograph to illustrate the hippocampal fields. B) Higher magnification of the boxed area in A, showing the distribution of plaques by layer in CA1 (Lac-mol, stratum lacunosum-moleculare; Rad, stratum radiatum; Pyr, stratum pyramidale; Or, stratum oriens). Note that no plaques are visualized in stratum lacunosum-moleculare or in oriens. DG, dentate gyrus; CA1–CA3, *cornus ammonis* fields; SUB, subiculum. Scale bar: 1000 μ m (in B); 860 μ m (in A).

Table 2

Summary of identified plaques in the CA1 region according to location per subregion and stratum

	S. Oriens	S. Pyramidal	S. Radiatum	Total
Proximal	0	113	25	138 (22%)
Medial	1	215	38	254 (41%)
Distal	6	194	31	231 (37%)
Total	7 (1%)	522 (84%)	94 (15%)	623 (100%)

Data represent the number of plaques labeled with A β /PHF_{pS396}, A β /PHF_{AT8} or PHF_{pS396}/PHF_{AT8}; see Table 3 for more details. Numbers in brackets indicate their relative percentages.

(100%) were labeled for both PHF-Tau antibodies (Table 3).

In summary, double staining analysis indicated that most of the CA1 plaques were A β -ir (89%), and a low percentage of plaques did not contain A β , while anti-PHF_{pS396} and anti-PHF_{AT8} antibodies were expressed in 7% and 16% of the plaques, respectively. Since sections marked with PHF_{pS396}/PHF_{AT8} revealed 100% co-localization, it would appear that plaques visualized with either of the two PHF-Tau isoforms would co-localize with the other.

Co-localization of A β and PHF-Tau in triple-labeled sections

In order to confirm our results obtained with double-stained sections, triple-stained sections for

Methoxy-X04/anti-PHF_{pS396}/anti-PHF_{AT8} were analyzed (Fig. 6). As mentioned above, Methoxy-X04 staining is a good tool to visualize plaques in brain sections from AD patients [38].

Out of a total of 113 Methoxy-X04 stained plaques (Fig. 6; Table 4), 75% did not express any PHF-Tau isoform. Yet, 25% of Methoxy-X04-labeled plaques showed triple labeling (Methoxy-X04/anti-PHF_{pS396}/anti-PHF_{AT8}), that is, they were labeled for both PHF-Tau isoforms and A β . These results are in line with the double labeling experiments described above.

Plaque morphology

To determine the morphological features of the stained plaques, a total of 500 plaques were examined in confocal images from double-stained (387 plaques) and triple-stained (113 plaques) sections in all cases. All of them showed labeled A β deposits, which could be classified into two basic types according to our previous study [41]: plaques with a round, dense, darkly stained nucleus or central region that was surrounded by a slightly stained halo were classified as “cored neuritic plaques”. Those plaques without a differentiated center were considered as “non-cored neuritic plaques”. In the present study,

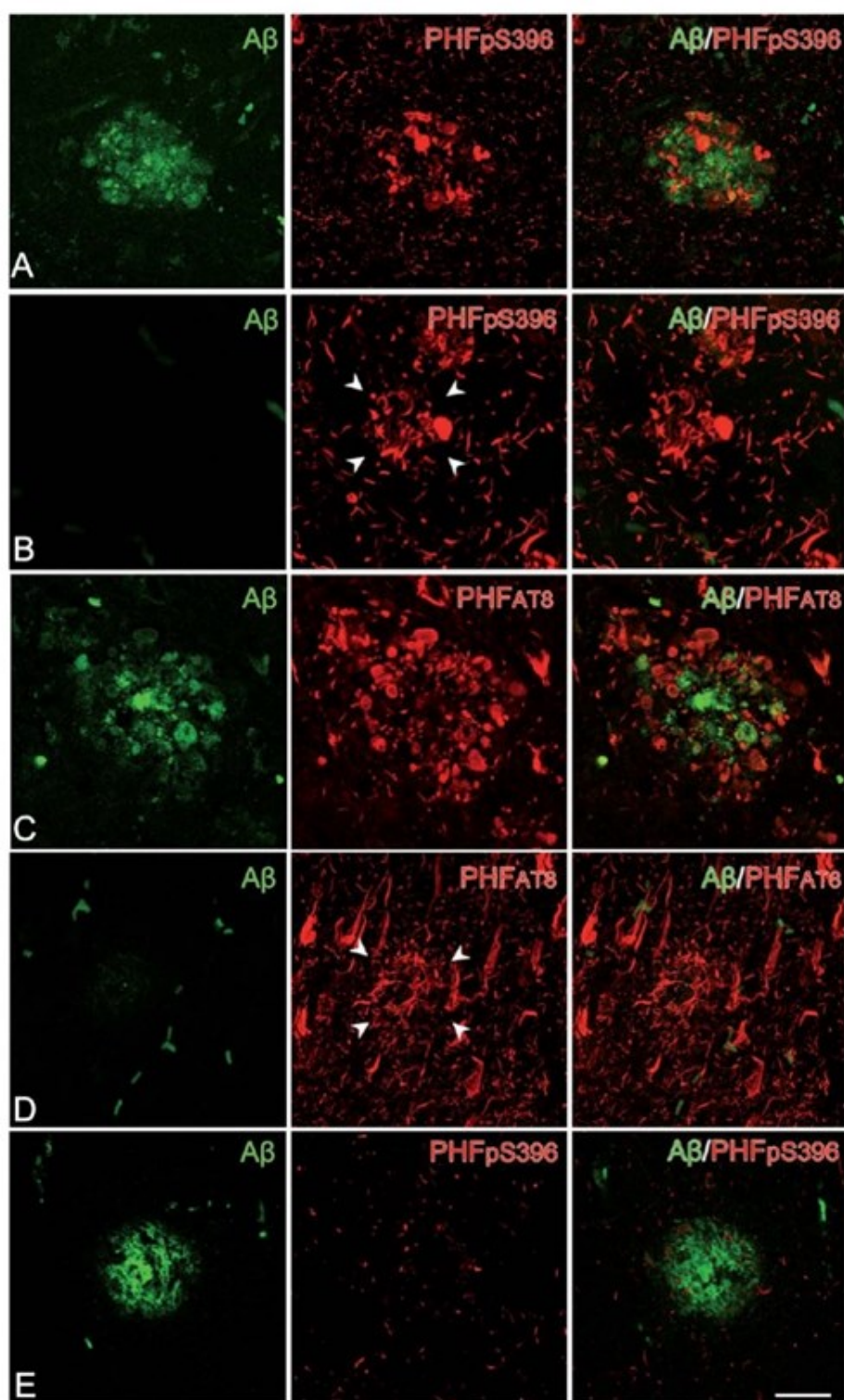


Fig. 4. Plaque expression patterns in double-stained hippocampal sections. Trios of confocal stack projection images taken from A β /PHF_{pS396} double-immunostained sections (A, B, E) and from A β /PHF_{AT8} double-immunostained sections (C, D). Plaques expressing both A β and PHF_{pS396}, as well as A β and PHF_{AT8} are shown in A and C, respectively. Images illustrate plaques expressing only PHF_{pS396} (B) and PHF_{AT8} (D). A plaque which only displays anti-A β is shown in E. Scale bar (in E): 50 μ m.

13% were identified as cored plaques, and 87% as non-cored plaques. These proportions were similar in plaques labeled only with A β or with both A β and PHF-Tau markers (χ^2 test, $p > 0.5$; Table 5).

Distribution and co-expression of PHF_{pS396}/PHF_{AT8} in CA1 neurons

The distribution of CA1 neurons that co-expressed PHF_{pS396} and PHF_{AT8} was examined in double-immunostained sections. A total of 5678 PHF-Tau-ir neurons were analyzed and the vast majority of them were identified as pyramidal neurons. A detailed study of every labeled neuron was performed to determine its location within the pyramidal layer of CA1 (Fig. 7). Most neurons (41%) were located in medial portions of CA1 pyramidal layer, followed by the distal (33%), and proximal portions (26%; Table 6).

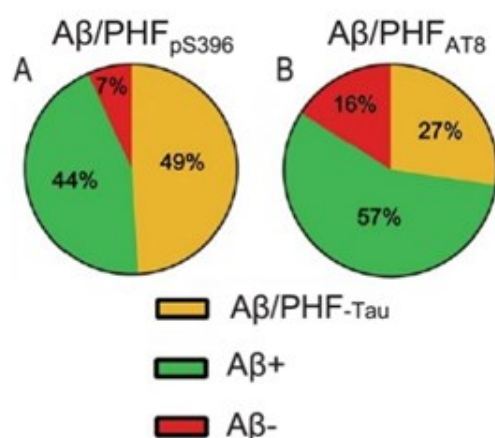


Fig. 5. Pie charts showing the percentages of labeled plaques in double immunostaining studies: A β /PHF_{pS396} (A) and A β /PHF_{AT8} (B) combinations are shown. Both analyses displayed a higher proportion of plaques showing A β -ir and a much-reduced portion of negative A β plaques.

This distribution was similar to the plaque distribution described above. The labeled neurons appeared to be equally distributed in the superficial and deep aspects of the pyramidal cell layer.

The study of co-expression of these two markers revealed that most (64%) of the labeled neurons expressed only PHF_{pS396}, whereas 28% displayed both markers and 8% showed only PHF_{AT8}-ir (Table 6; Fig. 8). However, there was a large variability between patients (Table 7; Fig. 9).

DISCUSSION

There are four main findings in the present study. First, despite the large variety of expression patterns of plaques and PHF-Tau-ir neurons, the pyramidal layer of proximal CA1 (close to CA2) contains the smallest number of both plaques and PHF-Tau-ir neurons. Second, a large proportion of A β -ir plaques were also characterized by the presence of PHF-Tau-ir, whereas plaques lacking A β -ir (i.e., plaques stained only for PHF_{pS396} or PHF_{AT8}) were unusual. Third, all plaques containing one of the two PHF-Tau isoforms also express the other isoform, that is, if a plaque contains PHF_{pS396}, it also contains PHF_{AT8}, and vice versa. Fourth, the colocalization study of both PHF-Tau isoforms in CA1 neurons revealed that the majority of the labeled neurons express only PHF_{pS396}. Moreover, the vast majority of PHF-Tau-ir neurons were identified as pyramidal cells.

Distribution and expression patterns of CA1 plaques

The analysis of plaques in CA1 showed that, independently of their labeling with A β , PHF_{pS396} or PHF_{AT8} antibodies, there were fewer plaques in the proximal portion, that is, closer to CA2. Furthermore,

Table 3
Number of CA1 labeled plaques, per case, analyzed in double-immunostained sections

Patient	A β /PHF _{pS396}			A β /PHF _{AT8}			PHF _{pS396} /PHF _{AT8}	Total plaques
	A β -ir/ PHF _{pS396} -ir	A β -ir	PHF _{pS396} -ir	A β -ir/ PHF _{AT8} -ir	A β -ir	PHF _{AT8} -ir	PHF _{pS396} -ir/ PHF _{AT8} -ir	
Az1	NA	NA	NA	6	7	8	NA	21
Az2	13	19	2	5	21	5	24	89
Az3	38	23	11	NA	NA	NA	68	140
Az4	6	24	0	4	13	1	15	63
Az5	42	5	3	30	1	13	59	153
Az6	24	40	1	5	62	2	23	157
Total	123	111	17	50	104	29	189	623

Three different combinations of antibodies were used: A β /PHF_{pS396}, A β /PHF_{AT8} and PHF_{pS396}/PHF_{AT8}. In the combination of anti-PHF_{pS396} and anti-PHF_{AT8}, all analyzed plaques expressed both isoforms (PHF_{pS396} and PHF_{AT8}). NA, data not available.

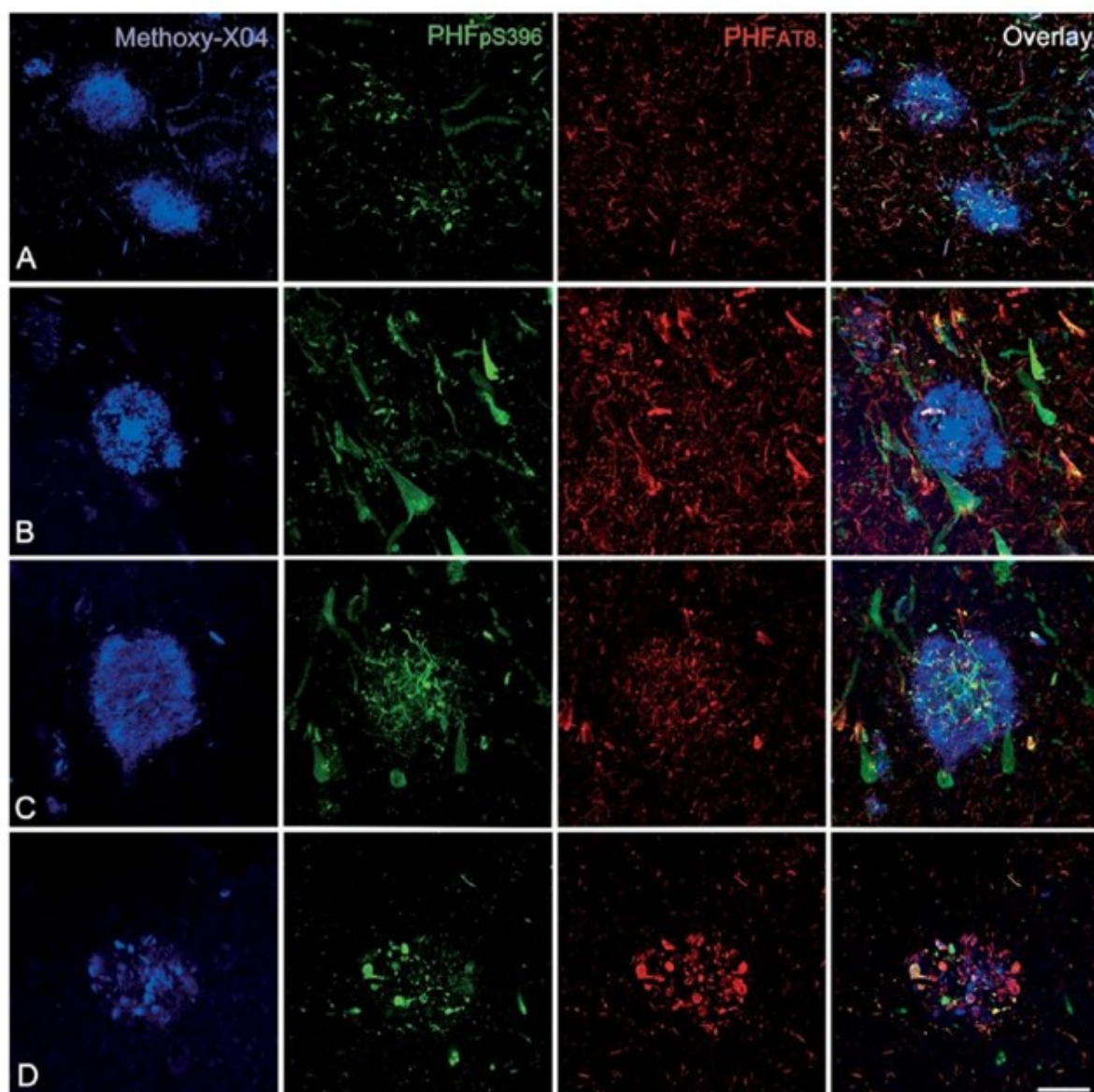


Fig. 6. Confocal stack projection images from triple-stained (Methoxy-X04/anti-PHF_{pS396}/anti-PHF_{AT8}) hippocampal sections. In A and B, plaques do not express any anti-PHF_{Tau} isoform but they show staining for Methoxy-X04, which indicates the presence of A β . C and D: examples of labeled plaques showing the three markers — Methoxy-X04 / anti-PHF_{pS396} / anti-PHF_{AT8}. Scale bar (in D): 50 μ m.

most plaques were localized in the stratum pyramidale, followed by the stratum radiatum, while they were sparse in the stratum oriens and absent in the stratum lacunosum-moleculare.

In both mouse models of AD and in AD patients, dendrites in contact with A β _{-ir} plaques have been found to suffer alterations in dendritic spine number and morphology [22, 23, 42–44], indicating specific alterations related to A β [45]. Moreover, it has also been reported that A β _{-ir} plaque presence alters synap-

tic transmission [14, 42–44, 46, 47], and impairs both the glutamatergic and the GABAergic systems [41, 48].

Since in the human CA1 the basal and apical dendritic arbors of pyramidal cells are mostly localized in the stratum pyramidale and A β _{-ir} plaques are found mainly in the stratum pyramidale (followed by the stratum radiatum), synaptic alterations may affect both the apical and basal dendritic arbors of the CA1 pyramidal cells.

Table 4
Number of CA1 labeled plaques, per case, analyzed in triple-stained sections for Methoxy-X04, anti-PHF_{pS396}, and anti-PHF_{AT8}. Numbers in brackets represent the relative percentages of labeled plaques

Patient	Methoxy-X04/ PHF _{pS396-ir} / PHF _{AT8-ir}	Methoxy-X04/ PHF _{pS396-ir}	Methoxy-X04/ PHF _{AT8-ir}	PHF _{pS396-ir} / PHF _{AT8-ir}	Methoxy X-04	Total plaques
Az1	3	0	0	0	7	10
Az2	3	0	0	0	4	7
Az3	4	0	0	0	5	9
Az4	2	0	0	0	11	13
Az5	9	0	0	0	3	12
Az6	1	0	0	0	8	9
Az7	2	0	0	0	6	8
Az8	2	0	0	0	8	10
Az9	0	0	0	0	17	17
Az10	2	0	0	0	9	11
Az11	0	0	0	0	7	7
Total	28 (25%)	0	0	0	85 (75%)	113

Table 5
Number of CA1 examined plaques according to labelling (in double- and triple-stained sections) and morphology as cored and non-cored neuritic plaques. Numbers in brackets represent the relative percentages of plaques

Staining	Labeling	Cored	Non-cored
A β /PHF _{pS396}	A β -ir/PHF _{pS396-ir}	15 (12.2%)	108 (87.8%)
	A β -ir	11 (10%)	100 (90%)
A β /PHF _{AT8}	A β -ir/PHF _{AT8-ir}	6 (12.2%)	43 (87.8%)
	A β -ir	14 (13.5%)	90 (86.5%)
Methoxy-X04/ PHF _{AT8}	Methoxy-X04/ PHF _{pS396-ir} / PHF _{AT8-ir}	4 (14.3%)	24 (85.7%)
	Methoxy-X04	11 (12.9%)	74 (87.1%)
		61 (12.2%)	439 (87.8%)

Double-immunostaining (anti-A β /anti-PHF_{pS396} and anti-A β /anti-PHF_{AT8}) and triple-immunostaining (Methoxy-X04/anti-PHF_{pS396}/anti-PHF_{AT8}) showed a variety of co-expression patterns: we observed plaques labeled only with A β , with both A β and PHF_{Tau} or only with PHF_{Tau} antibodies. Whether these different types of plaques differentially affect the alterations of synaptic circuits is currently not known.

It has been proposed that plaques pass through different stages [49], from diffuse plaques to neuritic plaques, accumulating fibrillary processes, which would generate toxicity [50]. During this process, A β plaques may incorporate PHF_{Tau} elements through a variety of mechanisms. However, the two morphological types of plaques found in the present study—cored and non-cored plaques (see [41])—were found either labeled only with A β , or with both A β and PHF_{Tau} markers.

In AD patients, it has been reported that microglia are activated as a result of the inflammatory response

where it is the presence of A β that triggers their activation [51–54]. Activated microglia seem to have two functional consequences: initially, A β clearance by uptake [55], and later, propagation of A β and PHF_{Tau} via exosomal mechanisms [56–58]. Therefore, microglia internalize not only A β , but also PHF_{Tau} [58]. Moreover, in a model of microglial depletion, the level of PHF_{Tau} was reduced [58], indicating that the over-activation of microglia may promote tau phosphorylation [53]. It follows that both proteins would be released to the brain parenchyma, facilitating A β grouping as well as the incorporation of PHF_{Tau} elements.

The initial stages of plaque formation have been proposed to involve the appearance of plaques without an associated inflammatory response, since in late phases activated microglia and reactive astrocytes are located close to plaques [51]. Hence, the presence of plaques expressing only A β may indicate an initial plaque stage, while plaques expressing also either PHF_{pS396} or PHF_{AT8} may be representative of an intermediate stage integrated in a dynamic process [59], which would depend on the presence of NFTs and, perhaps, on the local inflammatory response.

PHF_{Tau-ir} neurons: expression patterns and relationship with plaques

The most frequent PHF_{Tau} marker found in the CA1 pyramidal neurons from AD patients was PHF_{pS396} (over 90%), as previously reported in late stages of AD [45, 60, 61], which matches with the diagnoses of the cases analyzed (IV–VI on the Braak scale). It should be noted that it is still unclear if the specific phosphorylation site of PHF_{Tau} could

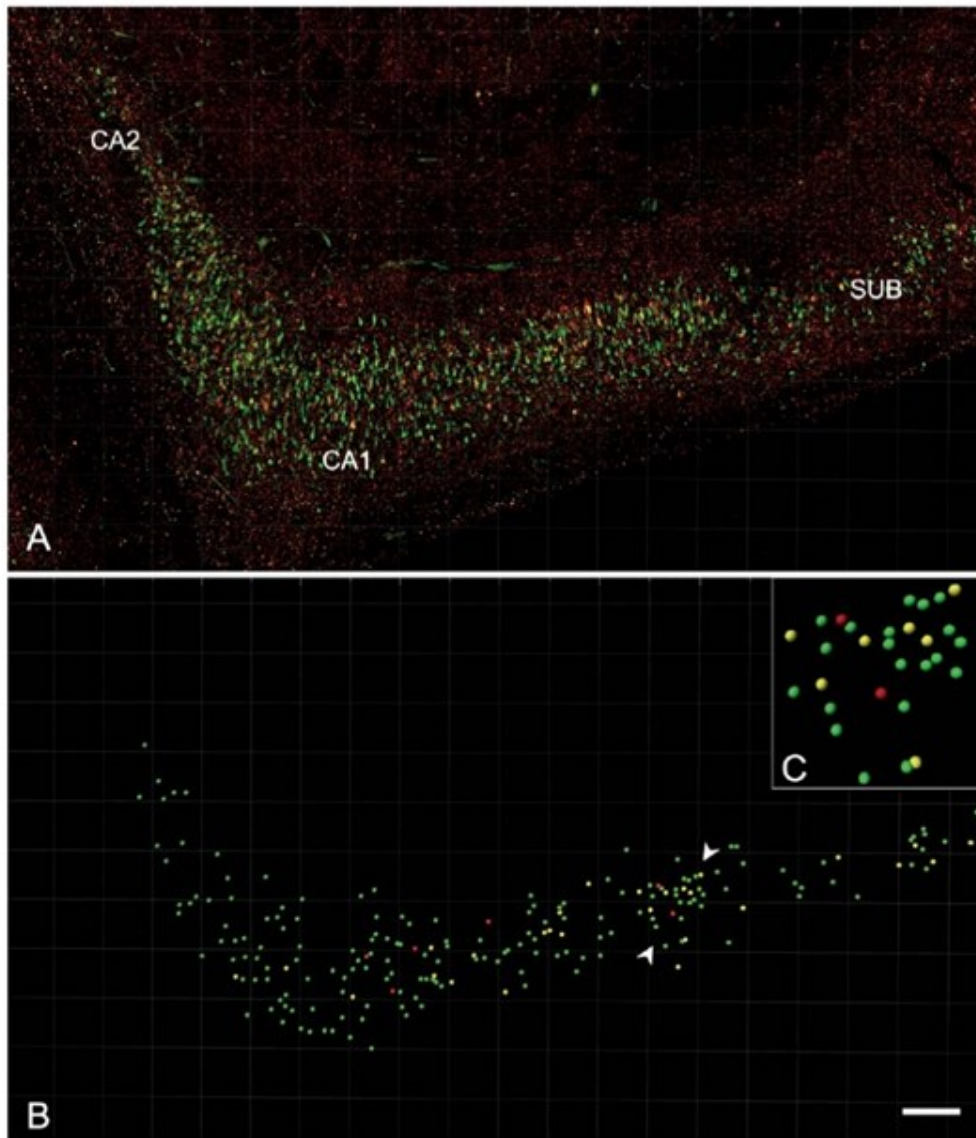


Fig. 7. Analysis of the distribution and expression of PHF-Tau-ir neurons using Imaris software. A) Confocal microscopy image showing a double-immunostained section for PHF_{pS396} (green) and PHF_{AT8} (red) antibodies, in CA1 region from patient Az4. The entire CA1 region can be visualized. B) Spots are assigned to each neuron, easily visualized when confocal channels are turned off. C) The rectangle is a higher magnification of the region marked by the arrowheads in B. The different spot colors correspond to PHF_{pS396-ir} neurons (green), PHF_{AT8-ir} neurons (red), and coexpressing neurons (yellow). Scale bar: 200 μ m (in B); 50 μ m in (C).

Table 6

Number of PHF-Tau-ir neurons in the pyramidal layer of the CA1 region, according to neuron location per subregion and type of staining (PHF_{pS396}, PHF_{AT8} or PHF_{pS396}/PHF_{AT8}). Numbers in brackets indicate the relative percentages

	PHF _{pS396-ir}	PHF _{AT8-ir}	PHF _{pS396-ir} / PHF _{AT8-ir}	Total
Proximal	843	134	521	1498 (26%)
Medial	1416	189	715	2320 (41%)
Distal	1357	108	395	1860 (33%)
	3616 (64%)	431 (8%)	1631 (28%)	5678 (100%)

indicate a sign of early or late stages of the disease. Expression of PHF_{AT8} has been proposed to occur in the early stages, while PHF_{pS396-ir} corresponds to later stages (e.g., [60, 61]). Nevertheless, other authors have proposed that expression of PHF_{pS396} occurs in the early stages and has a dynamic pattern of expression over the course of the disease, while PHF_{AT8} appears in advanced stages [62].

Moreover, the role of PHF-Tau proteins in dendritic pathology is also open to debate. For example, it has

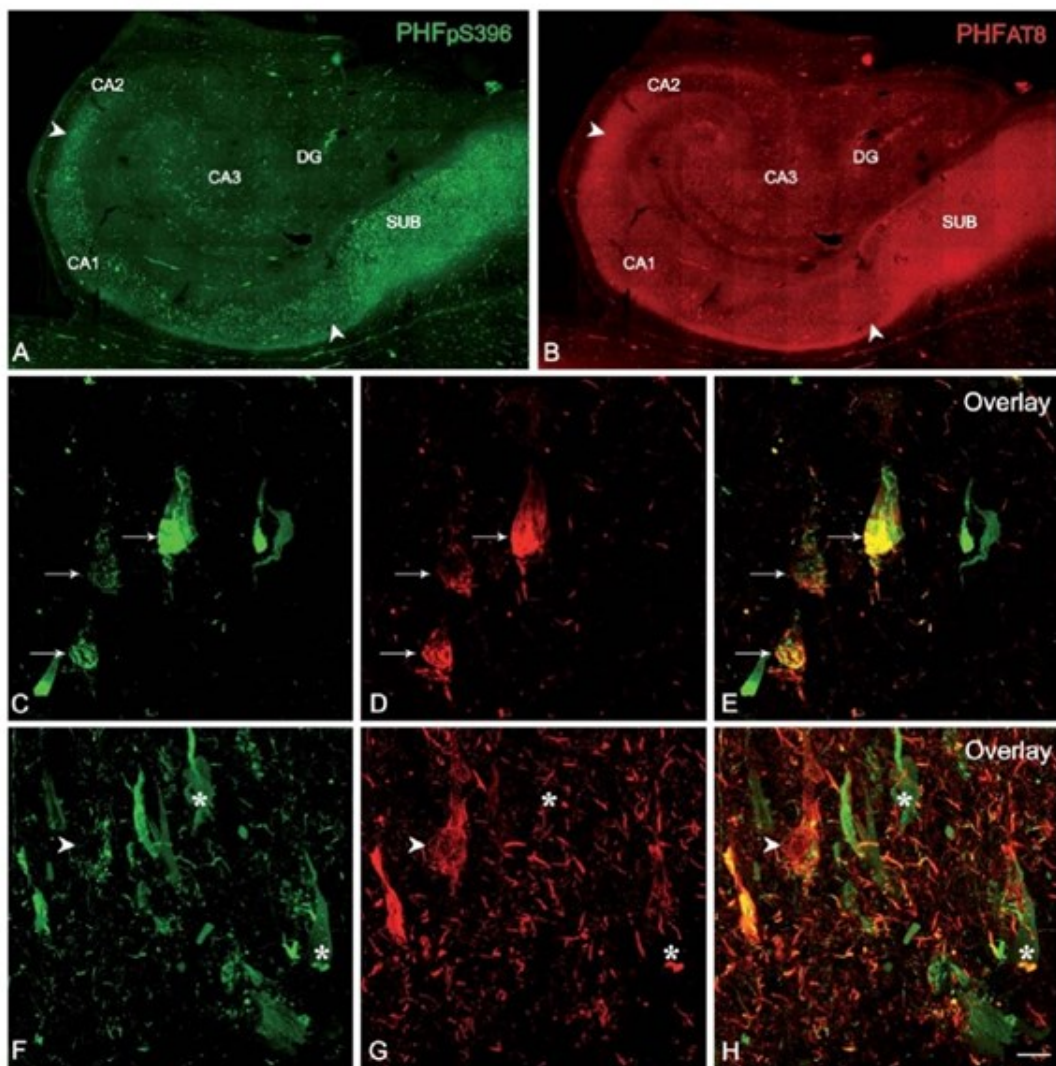


Fig. 8. Confocal stack projection images to illustrate labeling patterns of neurons in double-immunostained sections for PHF_{pS396} and PHF_{AT8}. Low-power confocal images of the hippocampal formation showing immunostaining for PHF_{pS396} (A, in green) and PHF_{AT8} (B, in red). Arrowheads indicate CA1 boundaries. C–H) Trios of confocal stack projection images taken from PHF_{pS396}/PHF_{AT8} double-immunostained sections. Arrows designate neurons expressing both anti-PHF_{pS396} and anti-PHF_{AT8} (C–E). Arrowheads indicate a neuron expressing anti-PHF_{AT8}, and asterisks indicate two neurons expressing only PHF_{pS396}. DG, dentate gyrus; CA1–CA3, *cornu ammonis* fields; SUB, subiculum. Scale bar (in H): 922 μ m (in A, B) and 50 μ m (in C–H).

been proposed that PHF-Tau protein—depending on its conformation and its phosphorylation site—may provide neuronal protection mechanisms to maintain the functionality of the neurons [32, 63, 64]. Thus, the presence of PHF-Tau within the somatodendritic compartment of pyramidal neurons does not necessarily induce cell death or even toxicity [45, 64, 65]. In a previous study on the possible alterations of dendritic spines in pyramidal cells from AD patients [23], a remarkable loss of dendritic spines from pyramidal cells containing NFTs was found. Since pyramidal

neurons represent the principal building blocks of the cerebral cortex, and dendritic spines are the main postsynaptic elements of cortical excitatory synapses and are fundamental structures in memory, learning, and cognition, these alterations may constitute an important early event in the pathogenesis of AD. Pyramidal cells in the so-called putative ‘pre-tangle’ stage, had unchanged dendritic trees, whereas in the presence of well-developed NFTs, dendritic spine loss was obvious [23]. In cases with an intermediate state of neurofibrillary pathology, the loss of

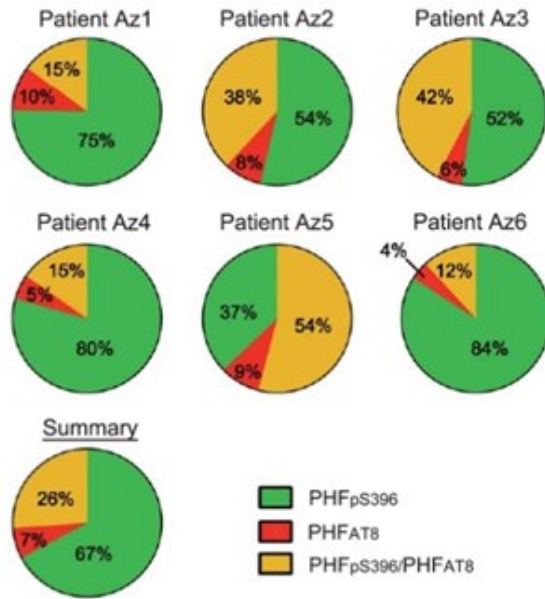


Fig. 9. Pie charts showing the percentages of labeled neurons in double immunostaining studies for PHF_{pS396} and PHF_{AT8}. Note the high variability of patterns. Average percentages of expression patterns are shown in the "Summary" chart, in which it is clear that there is a higher proportion of PHF_{pS396-ir} neurons.

Table 7

Number of CA1 labeled neurons, per case, in double-immunostained sections for anti-PHF_{pS396} and anti-PHF_{AT8}. Numbers in brackets represent the relative percentages

Patient	PHF _{pS396-ir}	PHF _{AT8-ir}	PHF _{pS396-ir} / PHF _{AT8-ir}	Total neurons
Az1	668	119	196	983
Az2	424	83	322	829
Az3	646	66	462	1174
Az4	492	23	84	599
Az5	496	101	424	1021
Az6	890	39	143	1072
Total	3616 (64%)	431 (8%)	1631 (28%)	5678

dendritic spines was more variable. Thus, the presence of PHF-Tau in neurons does not necessarily mean that they suffer severe and irreversible effects, but rather the characteristic cognitive impairment in AD is likely to depend on the relative number of neurons that have well-developed tangles. The presence of NFTs has been reported in CA1 hippocampal region (and entorhinal cortex) of non-demented old people, but amyloid- β plaques display a very heterogeneous pattern (reviewed in [66]).

Since we observed substantial variability between patients with regard to their expression patterns of A β -ir and PHF-Tau-ir, in plaques and neurons, a pos-

sible explanation is that the clearance mediated by microglial cells succeeded in some patients but not in others. If this were the case, patients with successful clearance would present a lower density of plaque A β -ir/PHF-Tau-ir, fewer PHF_{pS396-ir}/PHF_{AT8-ir} neurons and a higher number of plaques expressing only A β , which could indicate the formation of new plaques (see patients Az1, Az4 and Az6; Table 4; Fig. 9). By contrast, microglial clearance may have failed in those cases with a lower proportion of A β -ir plaques (negative for PHF-Tau-ir) and, hence, there would be more abundant PHF-Tau-ir neurons and A β -ir/PHF-Tau-ir plaques (see patients Az2, Az3 and Az5; Table 4; Fig. 9).

Recently it has been reported that there is an overlap between expression of A β and PHF-Tau proteins in different cortical regions [67]. That is, regardless of the Braak stage of each patient, there must be mechanisms, either compensatory or inflammatory that could modify the levels of pathological proteins in the brain, which would explain the observed variability (in patients which, initially, were clinically similar), suggesting a dynamic expression pattern of both proteins in AD. Therefore, our data is in line with the hypothesis that both proteins act together, as previously proposed [29, 67–70], even in late stages of the disease.

Possible functional implications of CA1 alterations

It is well established that normal CA1 function is critical for the processing of spatial information, new environment activity, learning and memory [8, 10, 13, 14, 71, 72].

The CA1 region is highly connected to other hippocampal regions, as well as to numerous cortical and subcortical areas. In particular, CA1 is strongly connected with the entorhinal cortex (EC), which is related to memory functions [11, 13, 14, 73]. CA1 projects to deep EC layers [74] and it receives afferents from layer II through the perforant pathway (or trisynaptic circuit) and from layer III of the EC by a direct monosynaptic pathway.

Proximal and distal CA1 regions have been related to spatial and context representation [75] and they establish multiple connections, both with cortico-subcortical regions and specific hippocampal regions, as well as within CA1 itself [76]. Lesions in proximal CA1 produce impairment in

memory recovery tasks [77], which would be in line with clinical symptoms of early stages of AD where episodic memory is affected [78]. We found that the pyramidal layer of proximal CA1 (close to CA2) contains the smallest number of both plaques and PHF-Tau-ir neurons, but the whole CA1 of these patients and other hippocampal fields and brain regions showed numerous plaques and NFTs.

In the cerebral cortex of AD patients, it has been found that there is a reduction in the number of perisomatic GABAergic terminals in neurons in contact with A β plaques [41], as well as a decrease in the number of synapses (both excitatory and inhibitory) within plaques (see [79] and references contained therein). Thus, it seems clear that the presence of plaques leads to a local loss of synapses. In addition, the phosphotau labelling dystrophic neurites around plaques is normally formed in axons [80]. These plaques are present mainly in the pyramidal cell layer of CA1, which receives axons from multiple regions, as well as from classical CA3 pyramidal cells (via Shaffer collaterals), including entorhinal cortex, submammillary body, nucleus reuniens of the thalamus, and septum among others (reviewed in [81]). It is therefore likely that these phosphotau labeled axons were originated from these regions. However, whether axons of different anatomical origin are more affected than others is not known. Therefore, multiple neuronal circuits are affected and, due to the variability of the pathological features of each patient (see below), it is not possible to draw up a general pattern of functional alterations.

Finally, superficial CA1 pyramidal neurons are activated during tasks where the environment needs to be related to stored information and other features of the surroundings, while deep CA1 pyramidal neurons provide information about the environment in terms of mapping [72]. Our data show that most plaques are located in the CA1 pyramidal layer, as well as the PHF-Tau-ir neurons are found in both the superficial and deep CA1 pyramidal cell layer. Thus, both plaques and NFTs occupy critical regions in terms of functionality, affecting the synaptic connectivity which supports spatial skills. Since the first symptoms of patients in the early stages of AD are loss of context and spatial orientation, deep CA1 could be one of the first affected areas of the hippocampus during the onset of the disease, whereas—in the late stages—both superficial and deep CA1 pyramidal cells are affected as shown in the present study.

Inter-individual variability

Our results indicate a huge variability in AD patients regarding the content and chemical characteristics of plaques and NFTs. Since all the AD patients analyzed in the present study correspond to late stages of the disease (Braak stages IV–VI; see Table 1) and they suffer from severe cognitive deficits, the high variability in the neurochemical types and distribution of plaques that we observed indicates a high degree of inter-individual differences. Thus, our findings further support the idea that AD is not a unique entity even within the same neuropathological stage, since the microanatomical/neurochemical changes that occur in the hippocampus greatly vary from one patient to another (see also [45]).

It has been reported that symptoms may differ between AD patients despite their neuropathological findings being similar [27]. Given that plaque load and cognitive functions are poorly correlated, together with the fact that the expression of PHF-Tau has been strongly linked to cognitive impairment [82], it may be that dementia is primarily related to the presence of PHF-Tau [21, 23], and secondly to its interaction with A β protein. Thus, it seems that when these proteins act together, the symptoms become apparent due to severe neuronal damage. Variability found between patients cannot be attributed to their AD stages, since all of them were diagnosed as Braak stages IV–VI.

We would like to point out that the morphological alterations observed in human pathological brain tissue are difficult to interpret, due to the high interindividual variability (regarding factors such as sex, age, medical treatment, etc.) that can affect brain structure. In addition, the disease course of AD is highly variable, and neuropathological changes are not homogenous. This is the case both among patients and in different brain regions of the same patient [41, 45]. Since we have analyzed the hippocampus of few patients with different pathological and clinical characteristics, the data obtained in the present study cannot be generalized to all AD patients or other cortical areas. Thus, the present study represents a further step towards addressing the topic of heterogeneity in tau and A β pathology, but it would be necessary to confirm our observations, both in a larger number of individuals and in additional cortical areas. The observed differences could be linked to structural variances associated with cognitive reserve [83–85] or related to the number of years since disease diagno-

sis. It has been proposed that cognitive reserve allows the brain to tolerate pathological elements without visible clinical symptoms, by using compensatory mechanisms of protection or via pre-existing cognitive approaches (so called 'cognitive scheme'; [86, 87]), which could serve as protection against neuronal degeneration [85]. Hence, this could be related to the observed differences in the expression pattern of plaques and PHF-Tau-ir neurons between patients. Five of the analyzed cases showed TDP-43 (a pathological condition of a DNA binding protein), which has been shown to be a comorbidity factor that may also contribute to dementia in AD [88, 89]. Moreover, α -synuclein (a misfolded protein which forms pathological aggregations in neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease) was found in two cases. Since different proteinopathies coexist in some patients, it is uncertain whether AD is an independent pathological process or the concurrent pathological proteins influence each other [90]. This coexistence of proteinopathies can therefore also contribute to the diversity of plaque types found in the present study. For example, one of the cases (Az9) displayed markers for both TDP-43 and α -synuclein, and in this particular case, plaques were identified by A β markers (Methoxy-X04 staining) but not by anti-PHF-Tau markers.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Isabel Fernaud, Lorena Valdes, Carmen Alvarez and Miriam Marin for their helpful technical assistance, and Gonzalo León-Espinosa for critically reading the manuscript. This work was supported by a grant from the Alzheimer's Association (ZEN-15-321663) and by grants from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (SAF 2015-66603-P), the Cajal Blue Brain Project (Spanish partner of the Blue Brain Project initiative from EPFL) and Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED, Spain, CB06/05/0066).

Authors' disclosures available online (<https://www.j-alz.com/manuscript-disclosures/18-0173r1>).

REFERENCES

- [1] Alzheimer's Association (2017) Alzheimer's disease: Facts and figures. *Alzheimers Dement* **13**, 325-373.
- [2] Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Tung YC, Quinlan M, Wisniewski HM, Binder LI (1986) Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4913-4917.
- [3] Goedert M, Wischik CM, Crowther RA, Walker JE, Klug A (1988) Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: Identification as the microtubule-associated protein tau. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 4051-4055.
- [4] Avila J (2004) The influence of aging in one tauopathy: Alzheimer's disease. *Arch Immunol Ther Exp* **52**, 410-413.
- [5] Wilson RS, Arnold SE, Schneider JA, Kelly JF, Tang Y, Bennett DA (2006) Chronic psychological distress and risk of Alzheimer's disease in old age. *Neuroepidemiology* **27**, 143-153.
- [6] Dickerson BC, Eichenbaum H (2010) The episodic memory system: Neurocircuitry and disorders. *Neuropsychopharmacology* **35**, 86-104.
- [7] Hyman BT, Van Hoesen GW, Kromer LJ, Damasio AR (1986) Perforant pathway changes and the memory impairment of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* **20**, 427-481.
- [8] Amaral D, Lavenex P (2007) Hippocampal neuroanatomy. In *The Hippocampus Book*, Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, eds. Oxford University Press, New York, pp. 37-114.
- [9] Cohen N, Squire L (1980) Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: Dissociation of knowing how and knowing that. *Science* **210**, 207-210.
- [10] Zola-Morgan S, Squire Larry R, Amaral DG (1986) Human amnesia and the medial temporal region: Enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *Neurocase* **2**, 259-298.
- [11] Amaral DG, Dolorfo C, Alvarez-Royo P (1991) Organization of CA1 projections to the subiculum: A PHA-L analysis in the rat. *Hippocampus* **1**, 415-435.
- [12] Bartsch T, Dohring J, Rohr A, Jansen O, Deuschl G (2011) CA1 neurons in the human hippocampus are critical for autobiographical memory, mental time travel, and auto-noetic consciousness. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 17562-17567.
- [13] Fouquet M, Desgranges B, La Joie R, Rivière D, Mangin JF, Landeau B, Mézenge F, Pélerin A, de La Sayette V, Viader F, Baron JC, Eustache F, Chételat G (2012) Role of hippocampal CA1 atrophy in memory encoding deficits in amnesic Mild Cognitive Impairment. *Neuroimage* **59**, 3309-3315.
- [14] Llorens-Martín M, Blazquez-Llorca L, Benavides-Piccione R, Rabano A, Hernandez F, Avila J, DeFelipe J (2014) Selective alterations of neurons and circuits related to early memory loss in Alzheimer's disease. *Front Neuroanat* **8**, 1-12.
- [15] Gomez-Isla T, Hollister R, West H, Mui S, Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE, Hyman BT (1997) Neuron loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's Disease. *Ann Neurol* **41**, 17-24.
- [16] Simic GŠ, Kostovic I, Winblad B, Bogdanovic N (1997) Volume and number of neurons of the human hippocampal formation in normal aging and Alzheimer's disease. *J Comp Neurol* **379**, 482-494.
- [17] West MJ, Gundersen HJG (1990) Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J Comp Neurol* **296**, 1-22.
- [18] Yang X, Yao C, Tian T, Li X, Yan H, Wu J, Li H, Pei L, Liu D, Tian Q, Zhu L-Q, Lu Y (2018) A novel mechanism of memory loss in Alzheimer's disease mice via the degeneration of entorhinal-CA1 synapses. *Mol Psychiatry* **23**, 199-210.

- [19] Hyman BT, Vanhoesen GW, Damasio AR (1990) Memory-related neural systems in Alzheimer's disease - an anatomic study. *Neurology* **40**, 1721-1730.
- [20] West MJ, Kawas CH, Stewart WF, Rudow GL, Troncoso JC (2004) Hippocampal neurons in pre-clinical Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **25**, 1205-1212.
- [21] Andrade-Moraes CH, Oliveira-Pinto AV, Castro-Fonseca E, da Silva CG, Guimaraes DM, Szczupak D, Parente-Bruno DR, Carvalho LRB, Polichiso L, Gomes BV, Oliveira LM, Rodriguez RD, Leite REP, Ferretti-Rebustini REL, Jacob-Filho W, Pasqualucci CA, Grinberg LT, Lent R (2013) Cell number changes in Alzheimer's disease relate to dementia, not to plaques and tangles. *Brain* **136**, 3738-3752.
- [22] Merino-Serrais P, Knafo S, Alonso-Nanclares L, Fernaud-Espinosa I, DeFelipe J (2011) Layer-specific alterations to CA1 dendritic spines in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hippocampus* **21**, 1037-1044.
- [23] Merino-Serrais P, Benavides-Piccione R, Blazquez-Llorca L, Kastanauskaitė A, Rábano A, Avila J, DeFelipe J (2013) The influence of phospho-tau on dendritic spines of cortical pyramidal neurons in patients with Alzheimer's disease. *Brain* **136**, 1913-1928.
- [24] Giannakopoulos P, Herrmann FR, Bussiere T, Bouras C, Kovari E, Perl DP, Morrison JH, Gold G, Hof PR (2003) Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology* **60**, 1495-1500.
- [25] Ingelsson M, Fukumoto H, Newell KL, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Frosch MP, Albert MS, Hyman BT, Irizarry MC (2004) Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology* **62**, 925-931.
- [26] Perez-Nievas BG, Stein TD, Tai HC, Dols-Icardo O, Scotton TC, Barroeta-Espar I, Fernandez-Carballo L, De Munain EL, Perez J, Marquie M, Serrano-Pozo A, Frosch MP, Lowe V, Parisi JE, Petersen RC, Ikonomic MD, López OL, Klunk W, Hyman BT, Gómez-Isla T (2013) Dissecting phenotypic traits linked to human resilience to Alzheimer's pathology. *Brain* **136**, 2510-2526.
- [27] Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, Castellani RJ, Crain BJ, Davies P, Del Tredici K, Duyckaerts C, Frosch MP, Haroutunian V, Hof PR, Hulette CM, Hyman BT, Iwatsubo T, Jellinger KA, Mackenzie G, Mann DM, Masliah E, McKee AC, Montine TJ, Morris JC, Schneider JA, Sonnen JA, Thal DR, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Wisniewski T, Woltjer RL, Beach TG (2012) Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: A review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol* **71**, 362-381.
- [28] Spires-Jones TL, Hyman BT (2014) The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron* **82**, 756-771.
- [29] Ittner LM, Götz J (2011) Amyloid- β and tau — a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* **12**, 65-72.
- [30] Bloom GS (2014) Amyloid- β and tau: The trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol* **71**, 505-508.
- [31] Price JL, Morris JC (2004) So what if tangles precede plaques? *Neurobiol Aging* **25**, 721-723.
- [32] Polanco JC, Li C, Bodea L-G, Martinez-Marmol R, Meunier FA, Götz J (2017) Amyloid- β and tau complexity—towards improved biomarkers and targeted therapies. *Nat Rev Neuro* **14**, 22-39.
- [33] Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* **82**, 239-259.
- [34] Fillenbaum GG, Belle G Van, Morris JC, Richard C, Mirra SS, Davis PC, Tariot PN, Silverman M, Clark CM, Welsh-Bohmer KA, Heyman A (2008) CERAD (Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease): The first 20 years. *Alzheimers Dement* **4**, 96-109.
- [35] Goedert M, Jakes R, Vanmechelen E (1995) Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205. *Neurosci Lett* **189**, 167-170.
- [36] Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC (2009) Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* **118**, 5-36.
- [37] Blazquez-Llorca L, Garcia-Marin V, Merino-Serrais P, Ávila J, DeFelipe J (2011) Abnormal tau phosphorylation in the thorny excrescences of CA3 hippocampal neurons in patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **26**, 683-698.
- [38] Klunk WE, Bacskai BJ, Mathis CA, Kajdasz ST, McLellan ME, Frosch MP, Debnath ML, Holt DP, Wang Y, Hyman BT (2002) Imaging Abeta plaques in living transgenic mice with multiphoton microscopy and methoxy-X04, a systemically administered Congo red derivative. *J Neuropathol Exp Neurol* **61**, 797-805.
- [39] Andrioli A, Alonso-Nanclares L, Arellano JI, DeFelipe J (2007) Quantitative analysis of parvalbumin-immunoreactive cells in the human epileptic hippocampus. *Neuroscience* **149**, 131-143.
- [40] Heggland I, Storkeas IS, Soligard HT, Kibro-Flatmoen A, Witter MP (2015) Stereological estimation of neuron number and plaque load in the hippocampal region of a transgenic rat model of Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* **41**, 1245-1262.
- [41] Garcia-Marin V, Blazquez-Llorca L, Rodriguez J-R, Boluda S, Muntane G, Ferrer I, DeFelipe J (2009) Diminished perisomatic GABAergic terminals on cortical neurons adjacent to amyloid plaques. *Front Neuroanat* **3**, 1-18.
- [42] Spires TL, Meyer-luehmann M, Stern EA, Mclean PJ, Nguyen PT, Bacskai BJ, Hyman BT (2005) Dendritic spine abnormalities in APP transgenic mice demonstrated by gene transfer and intravitral multiphoton microscopy. *J Neurosci* **25**, 7278-7287.
- [43] Knafo S, Venero C, Merino-Serrais P, Fernaud-Espinosa I, Gonzales-Soriano J, Ferrer I, Santpere G, DeFelipe J (2009) Morphological alterations to neurons of the amygdala and impaired fear conditioning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Pathol* **220**, 41-51.
- [44] Knafo S, Alonso-Nanclares L, Gonzalez-Soriano J, Merino-Serrais P, Fernaud-Espinosa I, Ferrer I, DeFelipe J (2009) Widespread changes in dendritic spines in a model of Alzheimer's disease. *Cereb Cortex* **19**, 586-592.
- [45] Blazquez-Llorca L, Garcia-Marin V, DeFelipe J (2010) Pericellular innervation of neurons expressing abnormally hyperphosphorylated tau in the hippocampal formation of Alzheimer's disease patients. *Front Neuroanat* **4**, 1-23.
- [46] Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, Deteresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* **30**, 572-580.
- [47] Guo JL, Lee VMY (2014) Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases. *Nat Med* **20**, 130-138.

- [48] Revett TJ, Baker GB, Jhamandas J, Kar S (2013) Glutamate system, amyloid β peptides and tau protein: Functional interrelationships and relevance to Alzheimer disease pathology. *J Psychiatry Neurosci* **38**, 6-23.
- [49] Dickson TC, King CE, McCormack GH, Vickers JC (1999) Neurochemical diversity of dystrophic neurites in the early and late stages of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* **156**, 100-110.
- [50] Ikeda SI, Yanagisawa N, Allsop D, Glenner GG (1990) Early senile plaques in Alzheimer's disease demonstrated by histochemistry, immunocytochemistry, and electron microscopy. *Hum Pathol* **21**, 1221-1226.
- [51] D'Andrea MR, Reiser PA, Gumula NA, Hertzog BM, Andrade-Gordon P (2001) Application of triple immunohistochemistry to characterize amyloid plaque-associated inflammation in brains with Alzheimer's disease. *Biotech Histochem* **76**, 97-106.
- [52] Jung CKE, Keppler K, Steinbach S, Blazquez-Llorca L, Herms J (2015) Fibrillar amyloid plaque formation precedes microglial activation. *PLoS One* **10**, 1-10.
- [53] Chen W, Abud EA, Yeung ST, Lakatos A, Nassi T, Wang J, Blum D, Buée L, Poon WW, Blurton-Jones M (2016) Increased tauopathy drives microglia-mediated clearance of beta-amyloid. *Acta Neuropathol Commun* **4**, 1-15.
- [54] Parbo P, Ismail R, Hansen KV, Amidi A, Mårup FH, Gottrup H, Brendgaard H, Eriksson BO, Eskildsen SF, Lund TE, Tietze A, Edison P, Pavese N, Stokholm MG, Borghammer P, Hinz R, Aanerud J, Brooks DJ (2017) Brain inflammation accompanies amyloid in the majority of mild cognitive impairment cases due to Alzheimer's disease. *Brain* **140**, 2002-2011.
- [55] Lee CYD, Landreth GE (2010) The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J Neural Transm* **117**, 949-960.
- [56] Rajendran L, Honscho M, Zahn TR, Keller P, Geiger KD, Verkade P, Simons K (2006) Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11172-11177.
- [57] Rajendran L, Bali J, Barr MM, Court FA, Kramer-Albers E-M, Picou F, Raposo G, van der Vos KE, van Niel G, Wang J, Brakefield XO (2014) Emerging roles of extracellular vesicles in the nervous system. *J Neurosci* **34**, 15482-15489.
- [58] Asai H, Ikezu S, Tsunoda S, Medalla M, Luebke J, Wolozin B, Butovsky O, Ikezu T, Therapeutics E (2015) Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci* **18**, 1584-1593.
- [59] Condello C, Schain A, Grutzendler J (2011) Multicolor time-stamp reveals the dynamics and toxicity of amyloid deposition. *Sci Rep* **1**, 1-12.
- [60] Su JH, Cummings BJ, Cotman CW (1994) Early phosphorylation of tau in Alzheimer's disease occurs at Ser-202 and is preferentially located within neurites. *Neuroreport* **5**, 2358-2362.
- [61] Su JH, Cummings BJ, Cotman CW (1996) Plaque biogenesis in brain aging and Alzheimer's disease. I. Progressive changes in phosphorylation states of paired helical filaments and neurofilaments. *Brain Res* **739**, 79-87.
- [62] Mondragón-Rodríguez S, Perry G, Luna-Muñoz J, Acevedo-Aquino MC, Williams S (2014) Phosphorylation of tau protein at sites Ser396-404 is one of the earliest events in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neuropathol Appl Neurobiol* **40**, 121-135.
- [63] Gong C-X, Iqbal K (2008) Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: A promising therapeutic target for Alzheimer disease. *Curr Med Chem* **15**, 2321-2328.
- [64] Avila J, León-Espinosa G, García E, García-Escudero V, Hernández F, DeFelipe J (2012) Tau phosphorylation by GSK3 in different conditions. *Int J Alzheimers Dis* **2012**, 578373.
- [65] Morsch R, Simon WCP (1999) Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**, 188-197.
- [66] Ferrer I (2012) Defining Alzheimer as a common age-related neurodegenerative process not inevitably leading to dementia. *Prog Neurobiol* **97**, 38-51.
- [67] Sepulcre J, Grothe MJ, Sabuncu M, Chhatwal J, Schultz AP, Hanseeuw B, El Fakhri G, Sperling R, Johnson KA (2017) Hierarchical organization of tau and amyloid deposits in the cerebral cortex. *JAMA Neurol* **74**, 813-820.
- [68] Guo J-P, Arai T, Miklossy J, McGeer PL (2006) Abeta and tau form soluble complexes that may promote self aggregation of both into the insoluble forms observed in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1953-1958.
- [69] Harris JA, Koyama A, Maeda S, Ho K, Devidze N, Dubal DB, Yu GQ, Masliah E, Mucke L (2012) Human P301L-mutant tau expression in mouse entorhinal-hippocampal network causes tau aggregation and presynaptic pathology but no cognitive deficits. *PLoS One* **7**, e45881.
- [70] Vemuri P, Schöll M (2017) Linking amyloid- β and tau deposition in Alzheimer disease. *JAMA Neurol* **74**, 766-768.
- [71] O'Keefe J, Dostrovsky J (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* **34**, 171-175.
- [72] Overington DW, Jeffery KJ (2016) Hidden depths in the hippocampal circuitry. *Neuron* **91**, 499-501.
- [73] Van Strien N, Cappaert N, Witter M (2009) The anatomy of memory: An interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci* **10**, 272-282.
- [74] Naber PA, Lopes Da Silva FH, Witter MP (2001) Reciprocal connections between the entorhinal cortex and hippocampal fields CA1 and the subiculum are in register with the projections from CA1 to the subiculum. *Hippocampus* **11**, 99-104.
- [75] Henriksen EJ, Colgin LL, Barnes CA, Witter MP, Moser MB, Moser EI (2010) Spatial representation along the proximodistal axis of CA1. *Neuron* **68**, 127-137.
- [76] Fanselow M, Dong H-W (2010) Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures. *Neuron* **65**, 1-25.
- [77] Nakazawa Y, Pevzner A, Kazumasa TZ, Wiltgen BJ (2016) Memory retrieval along the proximodistal axis of CA1. *Hippocampus* **26**, 367-402.
- [78] Walker M, Kublin JG, Zunt JR (2009) Soluble pathological tau in the entorhinal cortex leads to presynaptic deficits in an early Alzheimer's disease model. *Acta Neuropathol* **42**, 115-125.
- [79] Dorostkar MM, Zou C, Blazquez-Llorca L, Herms J (2015) Analyzing dendritic spine pathology in Alzheimer's disease: Problems and opportunities. *Acta Neuropathol* **130**, 1-19.
- [80] Blazquez-Llorca L, Valero-Freitag S, Rodrigues EF, Merchán-Pérez Á, Rodríguez JR, Dorostkar MM, DeFelipe J, Herms J (2017) High plasticity of axonal pathology in Alzheimer's disease mouse models. *Acta Neuropathol Commun* **5**, 14.
- [81] Buhl E, Whittington M (2009) Local circuits. In *The Hippocampus Book*, Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, eds. Oxford University Press, New York, pp. 297-315.

- [82] Arriagada PV, Growdon JH, Hedleywhyte ET, Hyman BT (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* **42**, 631-639.
- [83] Tucker AM, Stern Y (2011) Cognitive reserve in aging. *Curr Alzheimer Res* **8**, 354-360.
- [84] Meng X, D'Arcy C (2012) Education and dementia in the context of the cognitive reserve hypothesis: A systematic review with meta-analyses and qualitative analyses. *PLoS One* **7**, e38268.
- [85] Steffener J, Stern Y (2012) Exploring the neural basis of cognitive reserve in aging. *Biochim Biophys Acta* **1822**, 467-473.
- [86] Lazarczyk MJ, Hof PR, Bouras C, Giannakopoulos P (2012) Preclinical Alzheimer disease: Identification of cases at risk among cognitively intact older individuals. *BMC Med* **10**, 127.
- [87] Stern Y (2012) Cognitive reserve in ageing and Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* **11**, 1006-1012.
- [88] Robinson JL, Geser F, Corrada MM, Berlau DJ, Arnold SE, Lee VMY, Kawas CH, Trojanowski JQ (2011) Neocortical and hippocampal amyloid- β and tau measures associate with dementia in the oldest-old. *Brain* **134**, 3705-3712.
- [89] Uryu K, Nakashima-Yasuda H, Forman MS, Kwong LK, Clark CM, Grossman M, L. Miller B, Kretschmar HA, Lee VMY, Trojanowski JW, Neumann M (2008) Concomitant TAR-DNA-binding protein 43 pathology is present in Alzheimer disease and corticobasal degeneration but not in other tauopathies. *J Neuropathol Exp Neurol* **67**, 555-564.
- [90] Jucker M, Walker L (2013) Self-propagation of pathogenic aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* **501**, 45-51.



InTool Explorer: An Interactive Exploratory Analysis Tool for Versatile Visualizations of Neuroscientific Data

Diana Furcila^{1,2,3}, Marcos García^{4,5}, Cosmin Toader⁴, Juan Morales⁶, Antonio LaTorre^{5,7}, Ángel Rodríguez^{5,7}, Luis Pastor^{4,5}, Javier DeFelipe^{1,2,8} and Lidia Alonso-Nanclares^{1,2,8*}

¹Laboratorio Cajal de Circuitos Corticales (CTB), Universidad Politécnica de Madrid (UPM), Madrid, Spain, ²Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Madrid, Spain, ³Facultad de Psicología, Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), Madrid, Spain, ⁴Escuela Técnica Superior de Ingeniería Informática, Universidad Rey Juan Carlos, Madrid, Spain, ⁵Center for Computational Simulation (CCS), Universidad Politécnica de Madrid (UPM), Madrid, Spain, ⁶Graphext, Madrid, Spain, ⁷Escuela Técnica Superior de Ingenieros Informáticos, Universidad Politécnica de Madrid (UPM), Madrid, Spain, ⁸Department of Functional and Systems Neurobiology, Instituto Cajal (CSIC), Madrid, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Jackson Cioni Bittencourt,
University of São Paulo, Brazil

Reviewed by:

Carmen Cavada,
Autonomous University of Madrid,
Spain
Miguel Ángel García-Cabezas,
Boston University, United States

*Correspondence:

Lidia Alonso-Nanclares
aidl@cajal.csic.es

Received: 09 October 2018

Accepted: 18 February 2019

Published: 11 March 2019

Citation:

Furcila D, García M, Toader C, Morales J, LaTorre A, Rodríguez Á, Pastor L, DeFelipe J and Alonso-Nanclares L (2019) InTool Explorer: An Interactive Exploratory Analysis Tool for Versatile Visualizations of Neuroscientific Data. *Front. Neuroanat.* 13:28. doi: 10.3389/fnana.2019.00028

The bottleneck for progress in many research areas within neuroscience has shifted from the data acquisition to the data analysis stages. In the present article, we propose a method named InTool Explorer that we have developed to perform interactive exploratory data analysis, focusing on neuroanatomy as an example of its utility. This tool is freely-available software that has been designed to facilitate the study of complex neuroscience data. InTool Explorer requires no more than an internet connection and a web browser. The main contribution of this tool is to provide a user-designed canvas for data visualization and interaction, to perform specific exploratory tasks according to the user needs. Moreover, InTool Explorer permits visualization of the datasets in a very dynamic and versatile way using a linked-card approach. For this purpose, the tool allows the user to select among different predefined card types. Each card type offers an abstract data representation, a filtering tool or a set of statistical analysis methods. Additionally, InTool Explorer makes it possible linking raw images to the data. These images can be used by InTool Explorer to define new customized filtering cards. Another significant contribution of this tool is that it allows fast visualization of the data, error finding, and re-evaluation to establish new hypotheses or new lines of research. Thus, regarding its practical application in the laboratory, InTool Explorer provides a new opportunity to study and analyze neuroscience data prior to any statistical analysis being carried out.

Keywords: data visualization, dynamic analysis, interactive tool, multiscale, software

INTRODUCTION

The bottleneck for progress in many research areas within neuroscience has shifted from the data acquisition to the data analysis stages. The availability of more powerful microscopes and techniques to explore the brain has provided neuroscientists with a wealth of data that is difficult to fully analyze, due to both its volume and complexity (Kandel et al., 2013; DeFelipe, 2017).

Exploratory Data Analysis refers to a set of techniques originally developed to display data in such a way that those features that might be considered particularly relevant for a given analysis will become apparent. This utility provides the user with a different viewpoint, which could help either to decide the type of analysis to be performed, or to propose new hypotheses.

The traditional methods require the hypothesis to be proposed before acquiring the data. However, Exploratory Data Analysis displays the data in a dynamic way which may give rise to new questions to be answered. Thus, the main goal of exploratory analysis techniques is helping users to better understand their data by identifying patterns, trends and outliers, in order to generate new hypotheses, formulate models and extract new data (Tukey, 1977). Widely used analysis tools such as R (Ihaka and Gentleman, 1996), SPSS (Arkkelin, 2014) and STATISTICA (TIBCO Software Inc., 2018) provide a low-level interface that hinders the use of such tools by non-expert users and prevents rapid specification of interactive data analysis. Data visualization and interaction are key components in Vega-Lite (Satyanarayan et al., 2016), D3 (Bostock et al., 2011) and Protovis (Bostock and Heer, 2009) declarative languages. In this context, declarative languages and visualization grammars provide powerful environments for engineers to design interactive visualization systems. However, these environments require programming skills, and are not meant to be used by final users, preventing their use in dynamic exploratory analysis workflow. Other applications, such as Tableau (based on Polaris Stolte et al., 2002) and Visflow (Yu and Silva, 2017) offer a much simpler interface, but they are closed platforms which are not specifically adapted to the needs of neuroscience. Besides, most of these tools do not support statistical analysis, which limits their range of applications. Therefore, it is becoming necessary to advance in the development of new methods and interactive exploratory analysis tools for neuroscientists to improve their data analysis results. In this work, we propose a tool to close the gap between flexibility and user-friendliness. A recent, detailed and exhaustive survey on visualization tools can be found in Mei et al. (2018).

Different fields of neuroscience require different approaches for visualization and data analysis. Here, we shall focus on neuroanatomy as a proof of concept. Within this discipline of neuroscience, numerous factors must be taken into account for data analysis. Such factors that contribute to making this task extremely challenging include:

- Age, species/cases, and conditions of the sample (healthy vs. ill, type and extent of disease, post-mortem interval, type of fixation, etc.).
- Brain region analyzed (neocortex, hippocampus, thalamus, cerebellum, etc.).
- Number and variety of structures/components to be studied in a particular experiment.
- Level of detail of the features analyzed: neuronal circuits, neurons, dendritic arbors, synaptic microcircuits, synapses, molecules, etc.
- Nature of the imaging technique (SPECT, PET, EEG/MEG, fMRI, optical microscopy, electron microscopy).
- Spatial scale or temporal resolution of the sampled data.

In general, the possible relationship between these different data sets is difficult to realize or could go unnoticed unless a particular hypothesis is proposed and then tested with the appropriate tools. For example, the effects of age, post-mortem intervals, and type of fixation may have an influence on the

quantitative determination of the number of neurons in a particular region of the brain labeled with different techniques, such as Nissl staining or immunocytochemistry using antibodies against the neuronal nuclear antigen NeuN (e.g., Werner et al., 2000; Montero, 2003; Gonzalez-Riano et al., 2017). This article describes “InTool Explorer” (Interactive Tool Explorer), a Web-based exploratory analysis tool that is freely available software and has been designed to deal with the problems that neuroscientists commonly face when analyzing complex data. This tool was tailored to perform interactive exploratory analysis on generic tabular data. In order to tackle this issue, InTool Explorer was designed to allow a versatile configuration of interaction, visualization and exploration, also making it possible to make use of filters and different views of easily configurable cards. The following list sums up the main contributions of the tool presented here:

- **Versatile, dynamic and user guided configuration of the visualizations and interactions.** One of the major contributions of this work is to propose a new computational solution for improving the workflow in neuroscience that offers end users the possibility to dynamically adapt visualization, analysis and filtering operations to their data and current task.
- **Coordinated views.** In order to display data and interact with them, the linked-card approach gives users the opportunity to easily select among visual widgets (“cards”), which work in a coordinated manner (cards are co-dependent).
- **Extensibility.** InTool Explorer was designed in such a way that new features can be easily included. Considering the fast development of the acquisition techniques, it is very difficult to predict the future needs of the field. In this sense, the technologies and the software architecture used were carefully designed to allow the integration of new cards, which will work in synchronization with the previously defined cards.
- **Visual interaction.** InTool Explorer allows the inclusion of raw images—such as MRI, SPECT and/or histological microphotographs—in the interactive exploratory analysis task. Commonly, data can be extracted from images or, the tabular data may have images attached. Thus, InTool Explorer gives the user the opportunity to add these images to the data analysis process and to use them for interaction with the data.
- **Collaborative and portable.** Standalone software tools are currently the ones most commonly installed in neuroscience laboratories. InTool Explorer has been designed to satisfy standalone users, as well as local storage of their data. Moreover, software architecture is flexible enough and fully portable to allow a web-based multiuser installation where data can be stored in remote servers, which are accessible from any system, requiring no more than a web-browser and an internet connection.

MATERIALS AND METHODS

The input data for testing the usefulness of InTool Explorer consist of the data analysis of clinical-pathological information obtained from Alzheimer’s disease (AD) patients.

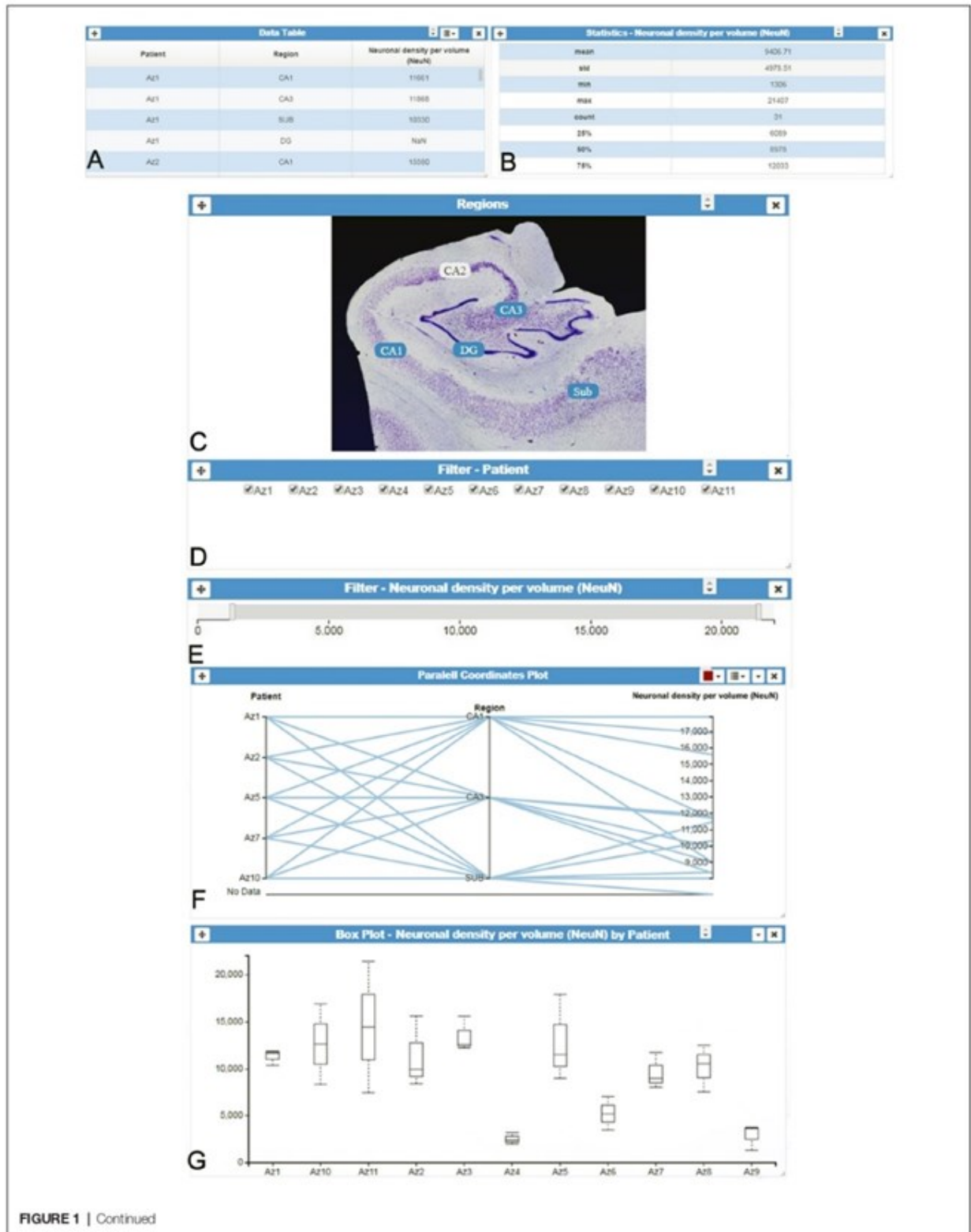


FIGURE 1 | Continued

FIGURE 1 | InTool Explorer interface. **(A)** Tabular data and **(B)** Column statistics card of the variable "Neuronal density per volume (NeuN)." **(C–E)** Different filter cards for spatial, categorical and quantitative variables: "Regions," "Patients" and "Neuronal density per volume (NeuN)," respectively. **(F)** Interactive parallel coordinates plot card showing some selected variables ["Patients," "Region" and "Neuronal density per volume (NeuN)"]. **(G)** Box plot card of selected data ["Neuronal density per volume (NeuN)" per "Patient"]. All visualized spatial objects are dynamically selected by users and updated according to user's interaction with filters (linked-cards). "DG, dentate gyrus; CA1–CA3, hippocampal fields; SUB, subiculum."

Histological data from AD patients were obtained *via* the detailed histological analysis of labeled neurons (normal and pathological) and amyloid- β ($A\beta$) plaques, in different areas of the hippocampal formation, from a cohort of AD patients previously examined (Furcila et al., 2018). Clinical data were collected from the same hospitals and medical centers that provided the AD patient brain tissue. These samples were obtained from two sources: Banc de Teixits Neurològics from Hospital Universitari Clinic de Barcelona (Spain) and Banco de Tejidos Fundación CIEN (Madrid, Spain), following the guidelines of the Helsinki Declaration and with the approval of the local Ethical Committees.

DESCRIPTION OF InTool EXPLORER

Overall Design

The tool was drafted with the aim of providing users with tools that facilitate the understanding of their data. In this regard, the paradigm of visual data exploration (Shneiderman, 1996) proved useful: "overview first, zoom and filter, then details on demand." Nevertheless, facilitating the visualization data does not mean putting aside traditional procedures that could improve the analysis. InTool Explorer has been created using a User-Centered Design (UCD) methodology, since it is the approach that best suits the problem of applying visualization methods to a set of users from a specific domain which has not been exposed to this kind of technique. The implementation was performed using an agile development method similar to *scrum* because the principles proposed in this method (Rising and Janoff, 2000) are in line with the UCD philosophy. The final proposed design was based on incremental prototyping. This approach reinforces the user role in the design, implementation and testing of the system usability in each iteration.

The proximity and accessibility to final users fitted very well with the methodology; getting them more involved in the design process was an additional advantage. Moreover, the characterization and problem abstraction stages were performed using a mixture of methods including interviews and observations, although contextual inquiries proved to be the most effective approach.

Software Distribution Details

Currently, two versions of InTool Explorer are available at: http://cajalbbp.es/intoolexplorer_web. Page links to the online web-based version and to the Windows standalone version can be found on this website.

The online version does not require a download or local installation to start working with the tool. The system has been fully tested with the most popular browsers, namely, Google Chrome, Microsoft Edge and Mozilla Firefox. InTool Explorer requires a very simple registration procedure where users provide a login identifier and email. This registration process allows neuroscientists to have access to their datasets from any PC *via* an internet connection and makes sharing their data possible. In addition, it allows ciphering of the data and the communications to guarantee data protection and comply with privacy laws.

Briefly, the application is designed to work with generic tabular data (csv and xls) and standard 2D image formats (png, jpeg, tif, bmp, etc.). Tabular data have to be arranged in one data sheet. The elements of the dataset must be sorted into rows and ideally each column must contain all the values of a given variable, but the system is robust enough to deal with incomplete data.

After the login process, the first step is to load data using the File menu. If users have already uploaded data, they can open them from the server directly ("Open from server"), or upload local data to the server using the order: "Import local files to server." The user can also append a new set to the current one ("Add to current"), and save the current dataset in the server ("Save on server"). In addition, variables of the dataset are automatically categorized, which is a very helpful utility to save time in operations that are necessary for the correct analysis of the data, but that are generally beyond the scope of the study. Moreover, the user can manually modify this categorization and remove, shuffle and rename variables editing the dataset schema (option Edit Schema). This also makes it possible to merge the dataset coming from different sources during a working session.

Finally, the Analysis widget allows users to locally save the state of the current exploratory analysis or load a previous saved state (active cards, filters, etc.). This allows the user to start a working session and finish it later working either on the same computer or on a different one.

Linked-Card Views

One of InTool Explorer's main contributions is to customize visualizations, interactions and statistical analysis, and to adapt them to the particularities of the data. In order to achieve this goal, the tool employs a coordinated view system based on linked-card views. The linked-card views are the main functional units of the system, allowing interaction, visualization and analysis operations. Users can select from different predefined cards and arrange them freely in the main window (or interface) of the application. Cards can be rearranged on the canvas and resized at any time as required by users. All the selected cards work in a coordinated manner; operations performed in a given card propagate automatically along the other cards shown in the main window layout. **Figure 1** shows an example of the user interface with several linked-cards. The linked cards can be classified into four different groups:

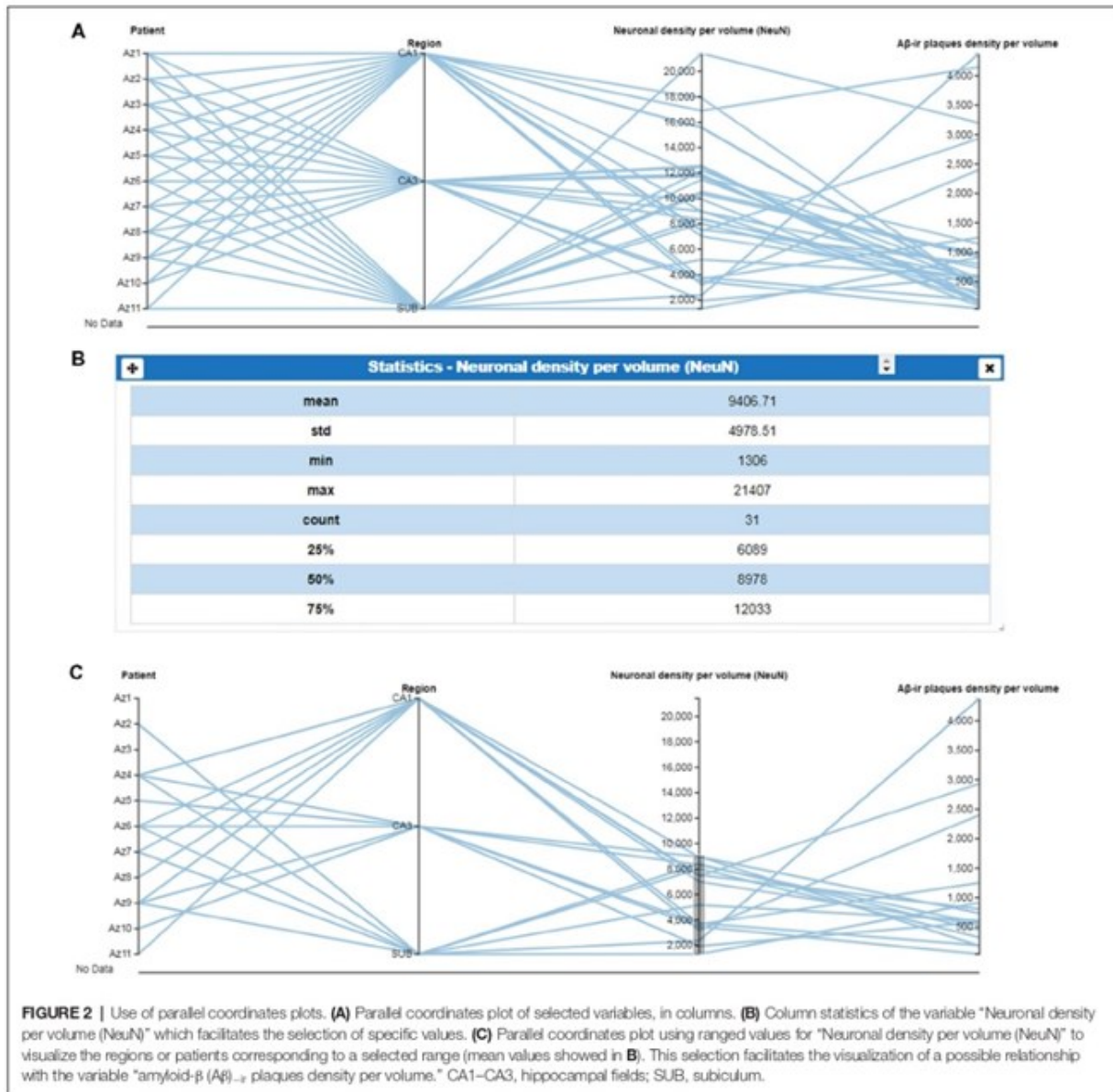
1. **Filtering cards:** InTool Explorer classifies the tabular dataset variables into three groups: categorical, ordinal and

quantitative. The users can select any of these variables to perform searching and filtering operations. Each new filter is presented in a new card with interactive controls adapted to the nature of the variable. Categorical values are selected with checked-boxes, and quantitative and ordinal values with dual knob range sliders.

2. **Visualization cards:** users can select a suitable view based both on the task to perform, and on the data to manage. Interaction with card filters is linked to all visualization cards, and figures are updated when users change filter parameters. In addition, some of the visualization tools provide selection and/or filtering capabilities that are linked to the active cards

shown in the main window. Six popular views have been selected to cover common tasks: parallel coordinates plot (Inselberg and Dimsdale, 1990), parallel set (Kosara et al., 2006), radar chart (also known as radial bar chart, spider chart, polar chart, web chart, or star plot; Chambers et al., 1983), scatter plot (Friendly and Denis, 2005), box plot (Tukey, 1977) and raw tabular data.

3. **Domain-specific data cards:** accessing original raw data is often required by users (original domain; e.g., **Figures 1A,C**) while exploring the processed data (transformed domain; e.g., **Figures 1E-G**). For example, in some situations, sample preparation and the analysis process introduce errors or noise



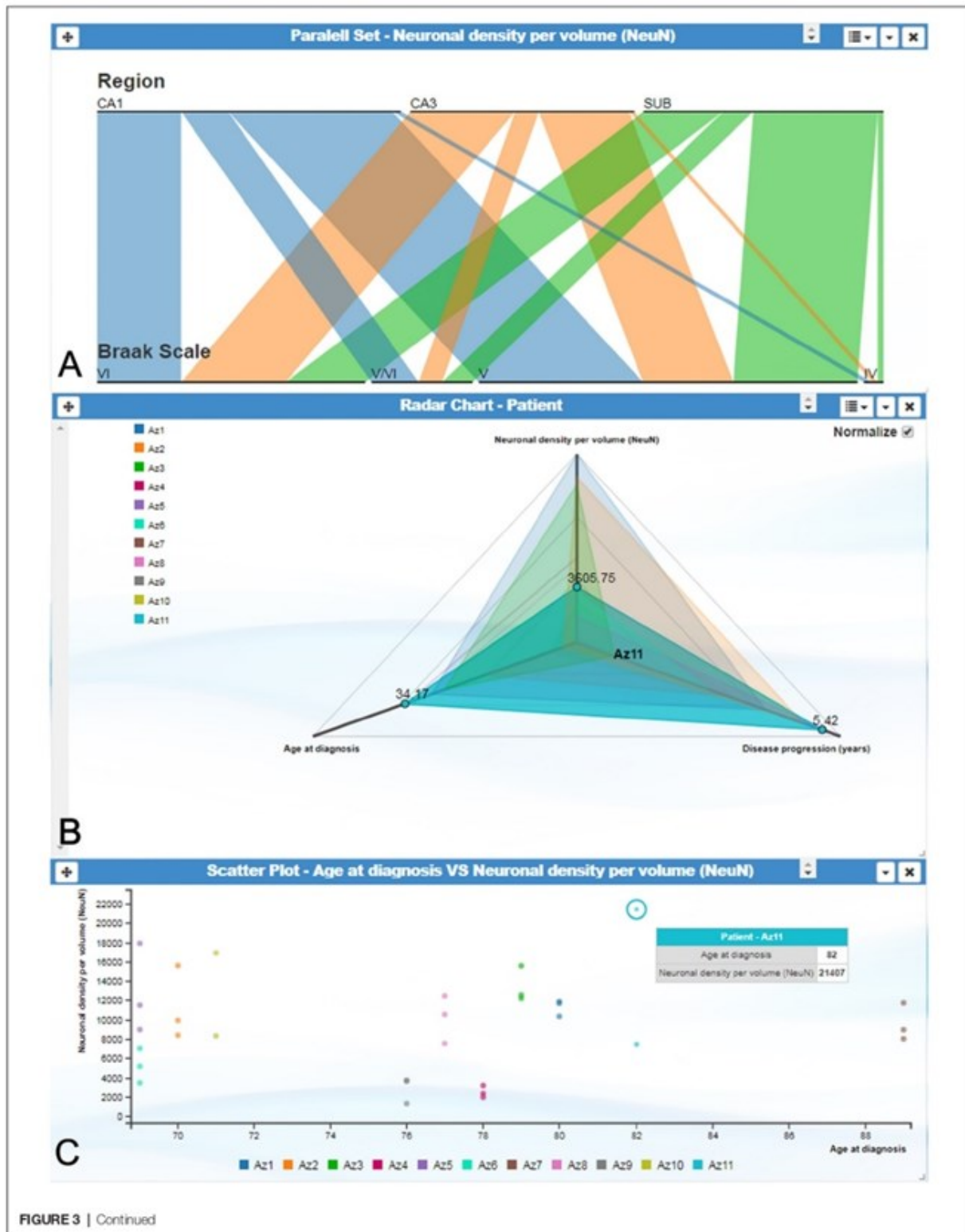


FIGURE 3 | Continued

FIGURE 3 | InTool Explorer interface showing several visualization cards. **(A)** Parallel set plot showing the variables “Region,” “Braak Scale” and “Neuronal density per volume (NeuN).” Each horizontal bar represents possible categories associated to each variable, and bar width indicates the proportional fraction of the total category. **(B)** Radar chart illustrating the relation between three variables: “Age at diagnosis,” “Neuronal density per volume (NeuN)” and “Disease progression (years).” All patients are visualized on the left side of the plot. This visualization card allows multiple comparisons in order to visualize similar or extreme values. Note patient Az11 (highlighted in blue), expressing distinctive values. **(C)** Scatter plot showing the relationship between the variables “Age at diagnosis” and “Neuronal density per volume (NeuN)” per patient. Note the extreme value highlighted with tooltip balloon (blue). This identification offers additional information about the selected value. Braak Stages (Braak and Braak, 1991): I-II (neurofibrillary tangles in entorhinal cortex and closely related areas); III-IV (neurofibrillary tangles abundant in amygdala and hippocampus and extending slightly into the association cortex); V-VI (neurofibrillary tangles widely distributed throughout the neocortex and ultimately involving primary motor and sensory areas). CA1–CA3, hippocampal fields; SUB, subiculum.

in the transformed domain. These problems may be translated into different patterns in the visualization cards. The original data cards allow the user to check the original data at any point during the analysis. InTool Explorer provides a mechanism to associate this data to the tabular data. In addition, these cards can be used to create new spatial interaction cards (see Section “Visualization Cards” for further detail).

- 4. Statistics cards:** as mentioned above, InTool Explorer was mainly designed to perform exploratory visual analysis in order to generate new hypotheses and models, as well as to drive the extraction of new data. In this regard, InTool Explorer is focused on providing an extensible set of visualizations. With the aim of enhancing the visualization capabilities with statistical analysis functionalities, we have integrated our system with R. Our server runs scripts in R in order to support statistical cards, such as Correlation test and Comparison of means.

It should be noted that the system architecture was designed to include additional visualization cards relatively easy (see section “Analysis of Quantitative Variables”).

Visualization Cards

As previously mentioned, most visualization cards allow interactive operations with the data shown. Users may modify the current view using interactive controls. For example, the parallel coordinates plot is ideal for representing and comparing multidimensional data. Users can define, on each parallel axis, a filter implemented with dual knob range sliders. By defining simultaneous filters over several parallel axes, users can combine several selection criteria, using the parallel coordinates card. This functionality replaces the need to add new filter cards for each variable and partly alleviates the issue of parallel coordinates not scaling as well as other visual representations (Nguyen and Rosen, 2017). In the same way, the performance of the parallel coordinates plot, while studying the correlation between variables, has been improved by allowing the user to reorder (shuffle) the parallel axis’ coordinates. Currently, users can also include new axes or remove them using a tab that can be

displayed listing all the variables from the study. Moreover, when including a new variable in the plot, the variables already shown are highlighted in a different color. Finally, this card highlights data elements or groups at the request of the user. **Figure 2** shows a parallel coordinates plot card, for which data below the mean (given by Statistics card in **Figure 2B**) were selected, and a range filter was defined over the quantitative variable “Neuronal density per volume (NeuN)” (**Figure 2C**).

Other representations also allow user interaction. For example, parallel set plots can automatically rearrange the data shown when users shuffle each category according to their criteria (**Figure 3**). Similarly, data tables, radar charts and parallel sets can add and remove axes interactively at the request of the user. Scatter plots allow particular data elements to be selected and highlighted. When these interactions involve shared variables among different cards, the local changes performed on one card are propagated through the other cards. Additionally, scatter plots, radar charts and parallel sets display tooltip balloons with additional information on the selected variable.

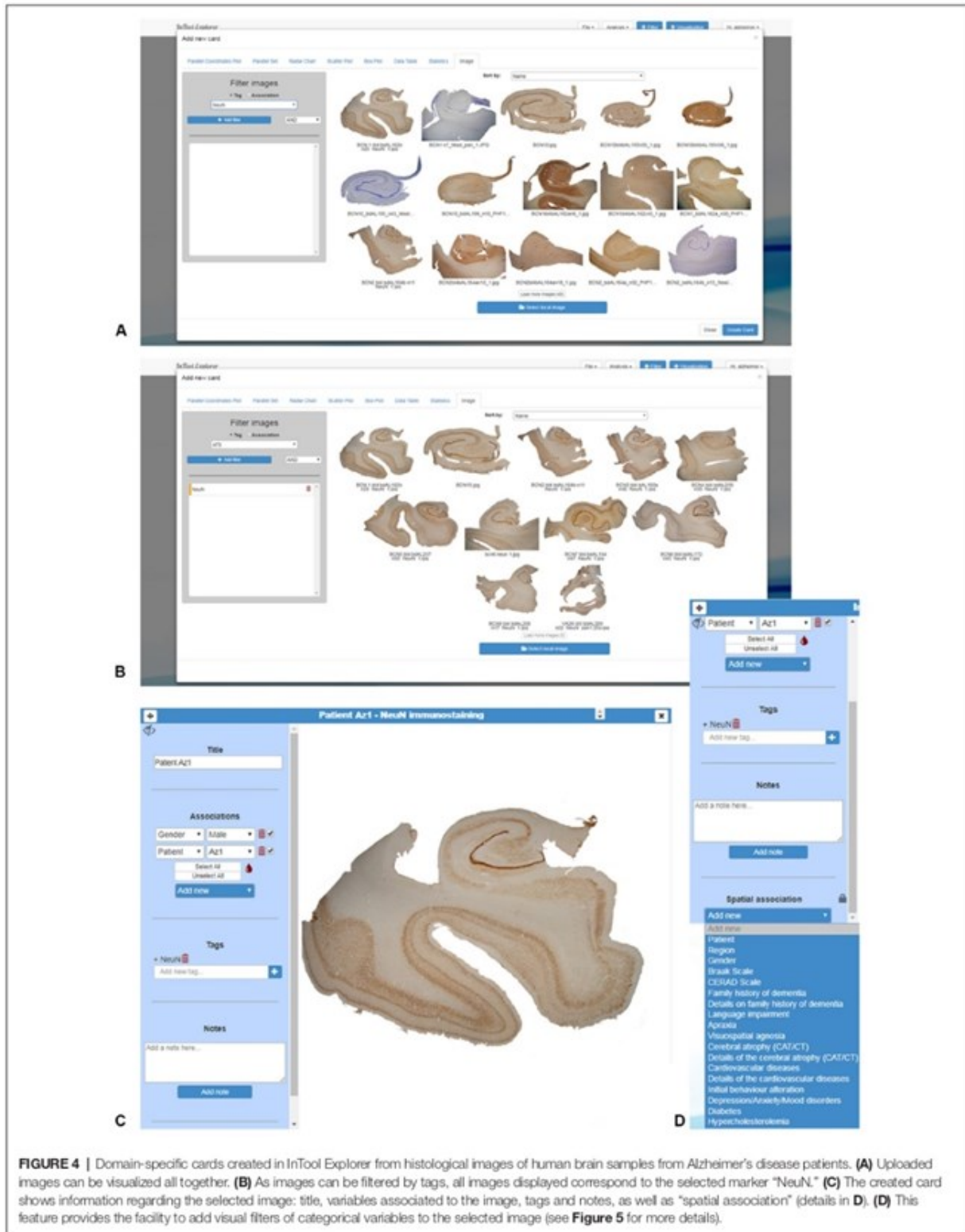
Domain-Specific Data Cards

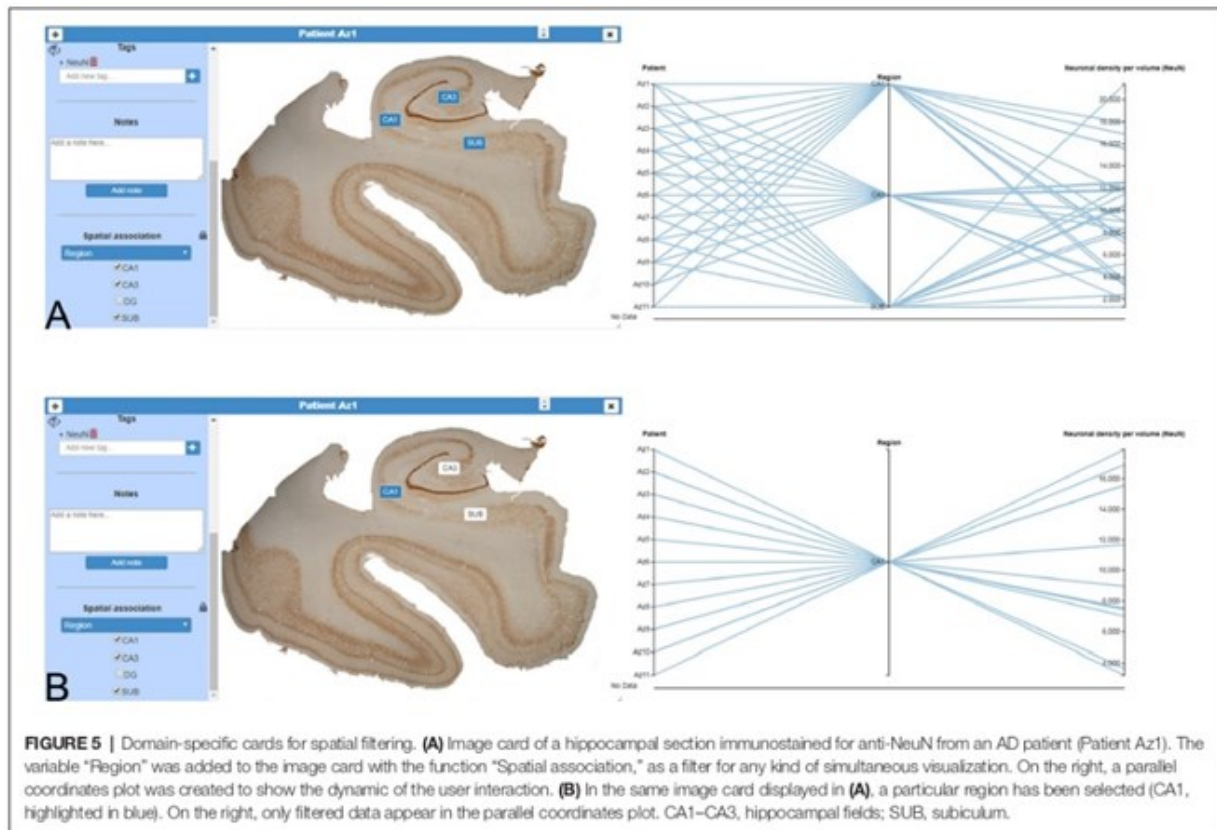
As previously explained, the original data cards provide mechanisms to associate the original input to the data in the transformed domain. The other cards provide several tools to visualize tabular data. Tabular data is the most common type of data in the transformed domain, but it is rarely available in the original domain. Besides, in neuroscience, images are frequently the input data from which the tabular data is computed. In order to support data in the original domain, InTool Explorer allows 2D images to be included within the dataset. These images can be associated to the available tabular data and they can be connected to a particular value of an ordinal or a categorical variable (e.g., one image can be associated to a particular patient). In addition, images can be labeled using arbitrary tags defined by the user. Using an ordinal or categorical value and/or a tag, an image can be retrieved from the database (**Figure 4**).

Image cards can be used for filtering and selecting. In the simplest interaction mode, scientists can use the values of the variable associated to an image to select or filter data. InTool Explorer is a sophisticated tool that allows neuroscientists to develop their own spatial filtering tools. Frequently, general visualization techniques for tabular data fail to represent the spatial structure of the data. In this work, we propose using the original input images to create user defined spatial filter cards. The original data card can be used to add categorical data values to specific parts of the image, and the user can then click on those areas to perform filtering operations. This spatial filtering tool allows InTool Explorer to be adapted to a specific dataset (**Figure 5**).

Analysis of Quantitative Variables

In neuroanatomy, the quantitative analysis of variables is particularly relevant; for example, InTool enables the analysis of quantitative variables such as “Neuronal density per volume (NeuN)” which shows huge inter-individual variability.





Regarding this variable, the filter function in a parallel coordinates plot can be applied and variable values can be associated to each patient and to certain hippocampal regions (Figure 6), which facilitates visualization and exploration. In addition, a value selection of any quantitative variable can be carried out (Figure 6C), to examine a particular range of data, which can be denoted in a different color. Moreover, with InTool Explorer, it is possible to add any variable to a given plot enhancing the interaction of the user. For example, if a user wishes to investigate patients showing a particular value, the variable "Patient" can be added to the parallel coordinates plot (Figure 6D). Particular patients and their particular characteristics can then be further explored to examine inter-individual variability as well as possible relationships with the histopathological characteristics. Thus, InTool Explorer provides a quick visualization of atypical cases within a dataset. Regarding qualitative variables, like clinical-pathological data of patients, InTool Explorer may combine any of them with quantitative data, producing an integrated analysis. To illustrate this utility, the relation between the histopathological variable—"Neuronal density per volume (NeuN)"—and the clinical features—"Disease progression" and "Braak stage"—was explored (Figure 7).

In summary, data from AD patients are very complex and diverse, and multidimensional visualization greatly facilitates the

integration of any type of data as well as exploration of individual values within each variable. As has been shown, InTool Explorer allows users to dynamically configure visualizations and interactions in a very flexible and personalized way, selecting the techniques that best fit their data. The linked-card based approach lends support to this goal, by adjusting the layout of the filters and views according to the particular requirements of the task at hand.

Statistics Cards

As previously mentioned, InTool Explorer was designed to simplify the visual exploratory analysis task of neuroscientists. Furthermore, the tool was intended to be extensible to face forthcoming challenges. Moreover, the tool needed to be flexible enough to solve the peculiarities of the different problems in this specific research area.

In this first version, we have implemented the most common statistical tests performed during a preliminary exploratory analysis.

These tests were implemented in three card types: (i) a column statistics card; (ii) a correlation test card; and (iii) a comparison of means card:

- (i) *Column statistics*: this card provides a brief description of data distribution, providing the mean, standard deviation, size (n), as well as minimum and maximum values (Figure 2B).

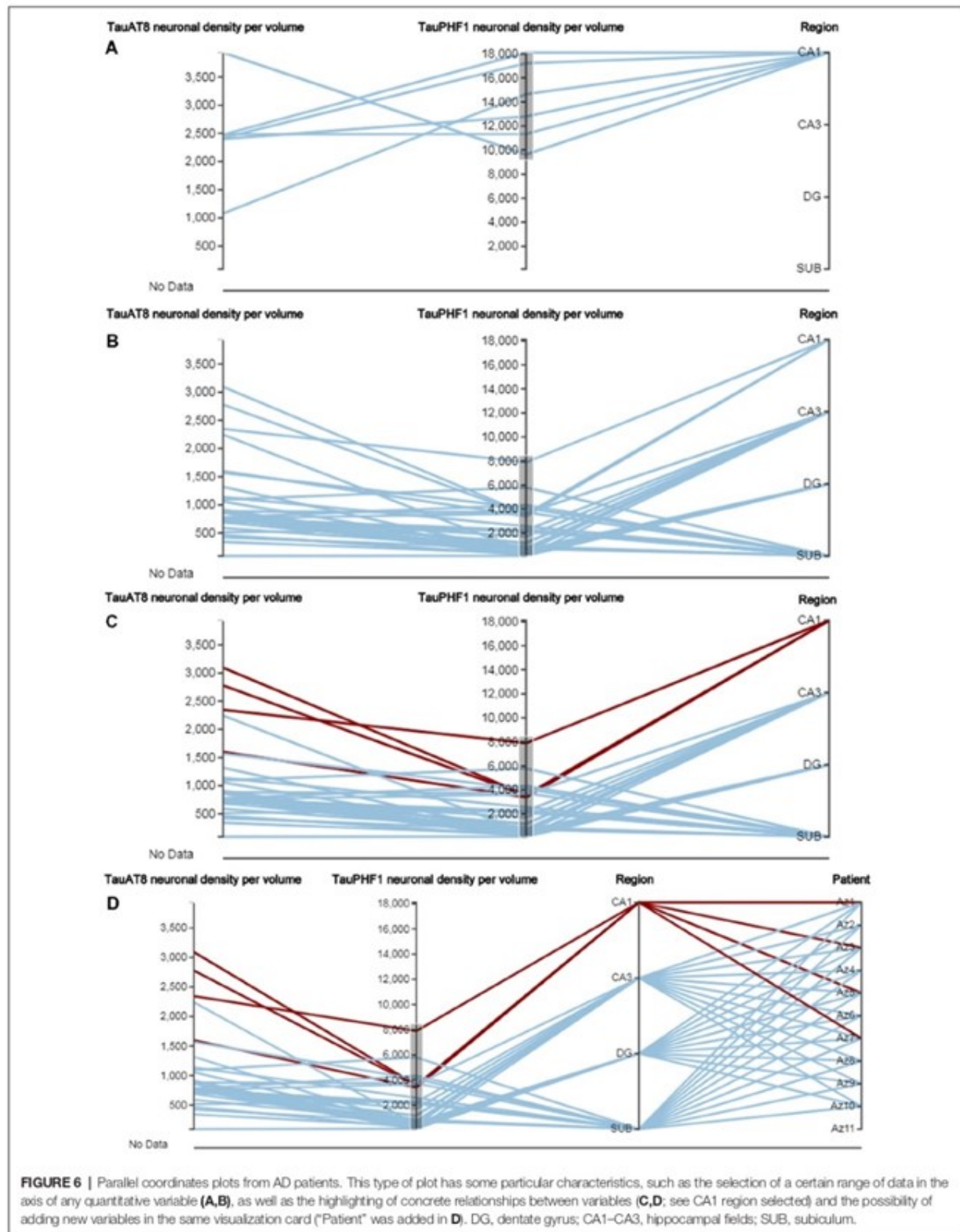
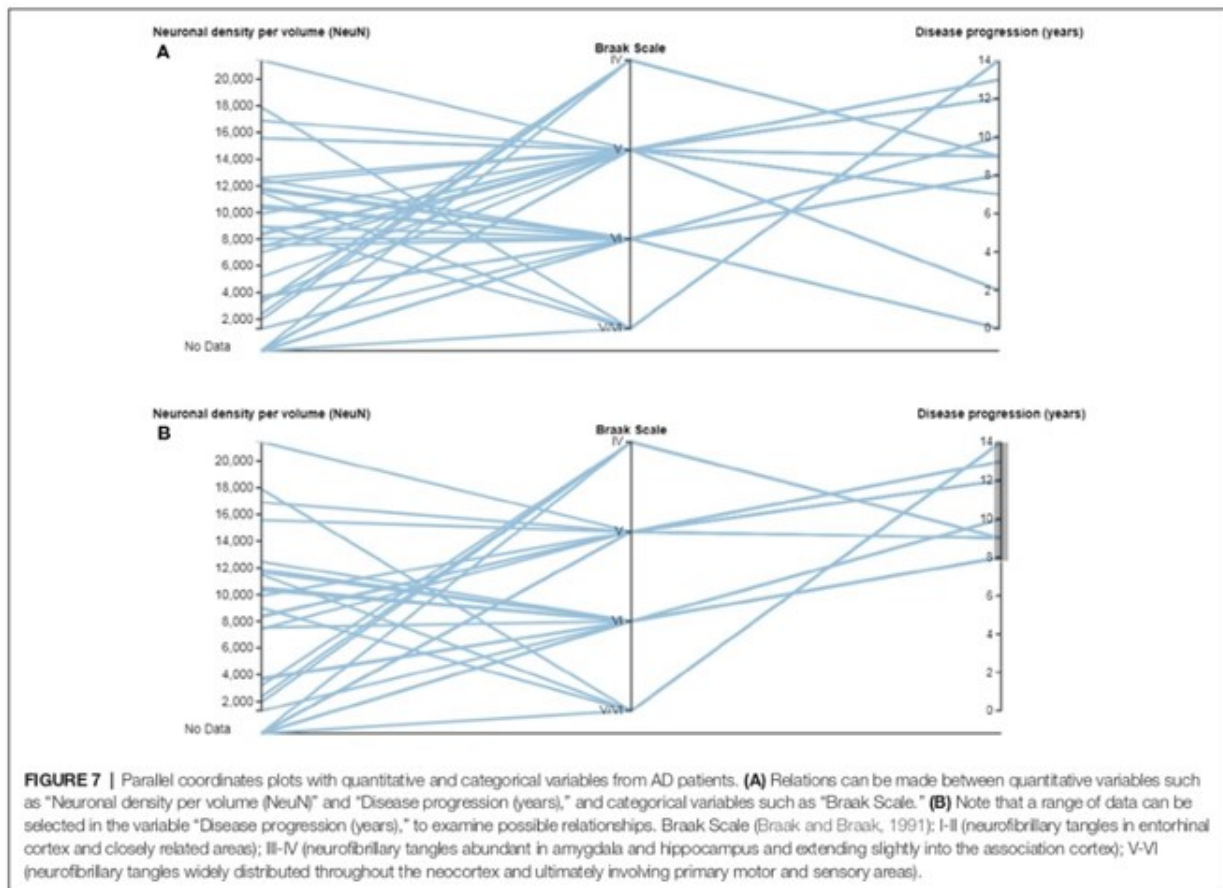


FIGURE 6 | Parallel coordinates plots from AD patients. This type of plot has some particular characteristics, such as the selection of a certain range of data in the axis of any quantitative variable (**A,B**), as well as the highlighting of concrete relationships between variables (**C,D**; see CA1 region selected) and the possibility of adding new variables in the same visualization card ("Patient" was added in **D**). DG, dentate gyrus; CA1-CA3, hippocampal fields; SUB, subiculum.



No previous statistical knowledge is needed to use any of the cards. All of them automatically select the test to be performed, taking into account the nature and size of the analyzed sample. The cards provide a detailed explanation of the process followed, allowing users to communicate their results.

- (ii) *Correlation test*: this card performs a correlation analysis of quantitative random variables. First, we check data normality, using a Kolmogorov-Smirnov Goodness-of-Fit test. If normality holds, two tests can be computed: Pearson's correlation coefficient and Spearman's rank correlation coefficient test. If not, we only calculate the Spearman's rank correlation coefficient (**Figure 8**) Pearson's coefficient offers a measure of linear correlation between two variables, while Spearman's rank coefficient assesses if two variables can be described by monotonic function (linear or non-linear).
- (iii) *Comparison of means*: this card compares two or more unpaired variable distributions (**Figure 9**). Depending on the number of variables and whether normality and homoscedasticity holds, several tests can be performed: Student's *t*-test, Welch's *t*-test, Kolmogorov-Smirnov, One-way ANOVA or Kruskal Wallis. In addition, to test prove the utility of this card with a larger data set, as

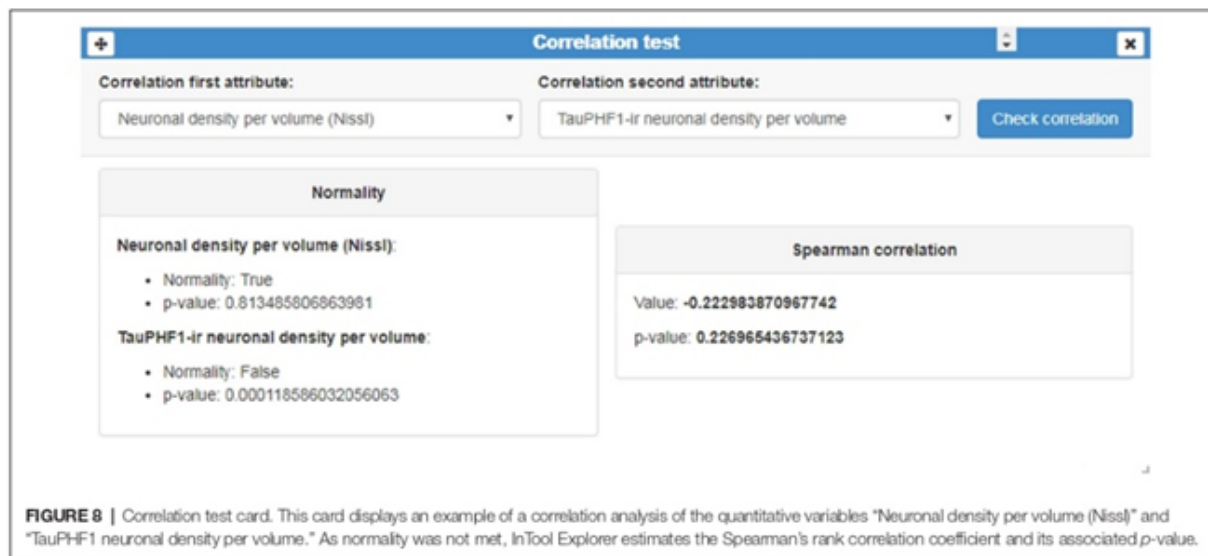
a proof of concept, we selected data from 8,900 human dendritic spines (Benavides-Piccione et al., 2012). In the present study, we compared the dendritic spine length between the apical and basal dendrites obtaining significant differences, in agreement with the findings of Benavides-Piccione et al. (2012).

Finally, in order to guarantee the extensibility of this module, InTool Explorer is fully integrated with R to support statistical analysis cards.

System Architecture and Technologies Used

In order to make the tool portable and to facilitate cooperation among different neuroscientists, a multi-user Web platform was implemented. Furthermore, since InTool Explorer will be released with a policy of it being freely available and given that it is expected to be widely used within the neuroscience community, a set of robust and widely tested free tools were selected.

The tool follows a client-server model and is divided into two layers: a backend and a frontend. Each of the components of these two layers was developed using the appropriate technology



according to its required features. The frontend and backend exchange information through WebSockets (Wang et al., 2012).

The backend is in charge of accessing and processing the data and is made up of three modules (the Main Server, the Statistical Server and the Database). To improve the system portability, these three components run in a Docker virtual container (Docker Inc., 2018). Docker has implementations for MacOS, Linux and Windows making it possible to deploy the server in any of these systems. Furthermore, the use of this virtual container enabled the development of a standalone version of the system, developed for those users unwilling to upload their data to a remote server. With this goal in mind, a portable application called WeCo (Web Container) was implemented for Linux, Mac OS and Windows.

The Main Server is one of the centerpieces of the system. It receives and processes the frontend requests. Among other tasks, it is responsible for the synchronization of the other components; data management operations; filtering operations; and user authentication. It is implemented using a Python Simple Http Server and uses MongoDB for data manipulation (MongoDB Inc., 2018) and ZeroMQ sockets to communicate with the Statistical Server. InTool Explorer is designed to be used in the visual exploration of the data, prior to the statistical analysis. This component provides support to the basic Statistical Analysis cards included in the frontend. Although currently the tool offers limited capabilities, this module was implemented using R to increase the application functionality in the near future. It should be noted that R is a powerful environment for statistical computing that offers a wide variety of statistical techniques.

The frontend provides different visual data representations and data interaction tools. It was developed in a single module and it implements the linked-card model proposed in this article. As previously mentioned, each card contains a data representation and/or filtering tool. User interactions in one card

are designed to affect other cards to address the need for all the data visualizations to be coordinated. In order to accomplish this requirement and to allow the functionality of the available cards to be extended, a publish/subscribe pattern was followed to send and receive events. When the user performs an action, the card broadcasts an event of a given type. The cards that should react to a given event must explicitly subscribe to this event. The senders do not know which cards will receive the event and the receivers do not need to know which card triggers the event. Motivated by the need to also ensure that the system is suitable for a wide range of potential future applications, the visual representations were rendered using D3 (Bostock et al., 2011), a powerful library of interactive visualizations. React-Bootstrap (MIT, 2018) is a library of frontend components that was used to allow the users to configure the visualization layout easily.

DISCUSSION

The complexity of the brain, together with the shortcomings of the instruments and techniques available to date, still hampers progress of the specific research carried out in the field of neuroscience (Kandel et al., 2013; Martone and Ascoli, 2013). Nevertheless, despite these technical difficulties, research in neuroscience is acquiring new tools for study and analysis, as well as improving those that already existed, with the aim of unraveling the complexities of brain organization (DeFelipe, 2010, 2017; Hagemann et al., 2010).

Visualization has proved to be a powerful tool in exploratory analysis (Tukey, 1977). Interactive visualization methods help users to reach unexpected conclusions beyond the insight provided by standard statistics software. In this regard, the declarative languages mentioned above, such as D3 (Bostock et al., 2011), Polaris (Stolte et al., 2002), Vega (Satyanarayan et al., 2016), Protovis (Bostock and Heer, 2009) and ggplot2

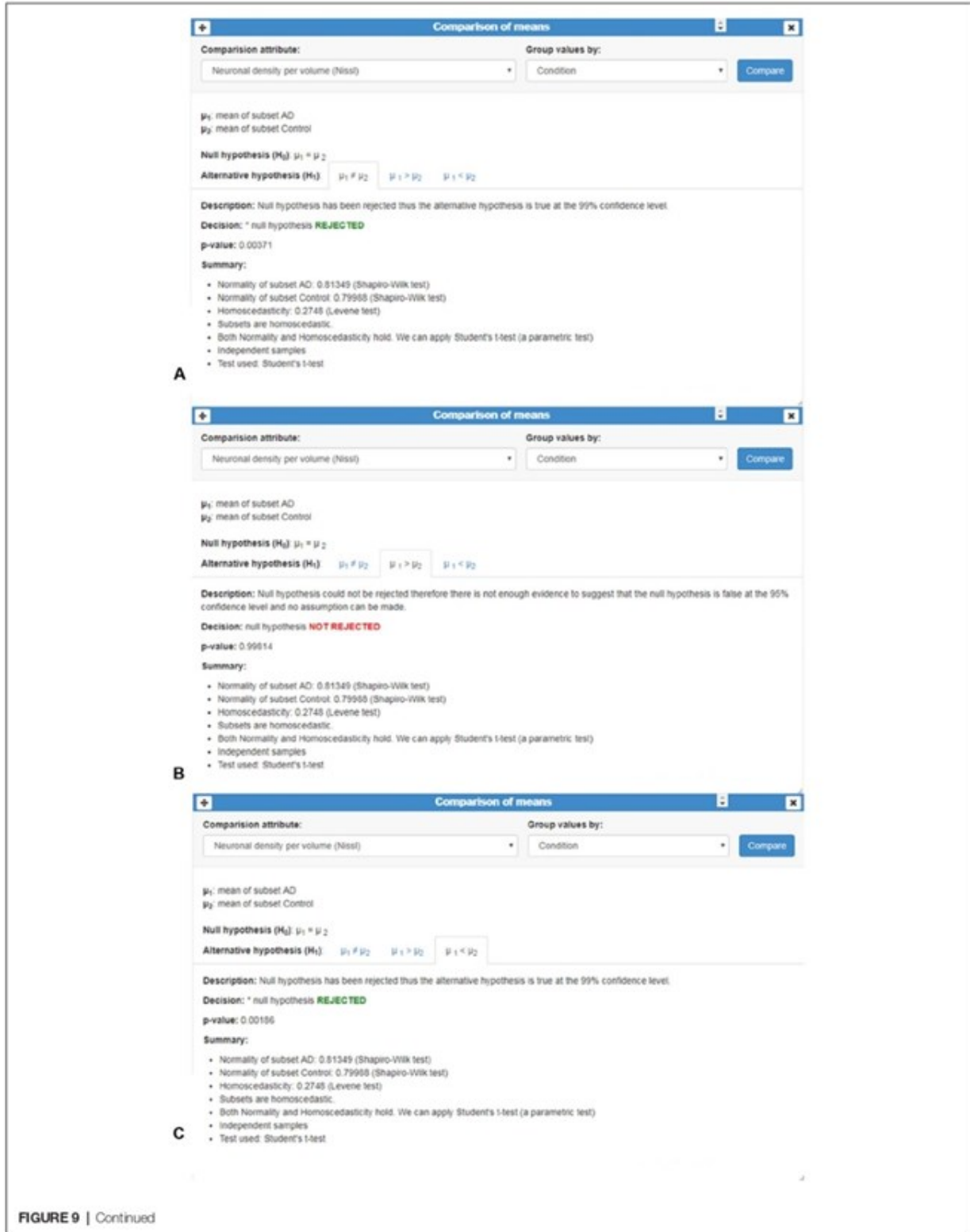


FIGURE 9 | Comparison of means card. This card shows an example of the comparison of the qualitative variable “Neuronal density per volume (NeuN)” grouped by the categorical variable “Condition.” Number of cases, normality and homoscedasticity were evaluated to perform an appropriated test; in this example, Student’s *t*-test was applied. **(A–C)** Analysis is shown in three different tabs corresponding to the results of comparing whether: **(A)** the means are equal ($\mu_1 = \mu_2$); **(B)** one sample is less than the other ($\mu_1 < \mu_2$); and **(C)** one sample is greater than the other ($\mu_1 > \mu_2$). In this example, *p*-values revealed significant mean differences: means were not equal **(A)** and, in particular, the mean of AD group was smaller than the mean of the Control group **(C)**.

(Wickham, 2009) are becoming popular environments to develop customized exploratory data applications. These languages offer a flexible methodology for rapid prototyping, which is essential for investigating new approaches in the context of exploratory analysis. Unfortunately, these environments require coding skills and prevent the final user from defining their own visualization workflow.

Currently, there are high-level visual analysis tools that allow the users to customize their visualizations. One very well-known system is “Tableau,” which provides a graphical user interface to Polaris (Stolte et al., 2002), and supports statistical analysis with R. However, writing scripts in R is beyond the capabilities of most final users. “Autodiscovery” is another exploratory analysis tool that performs a predefined set of statistical tests to find correlations (Butler Scientifics SL, Barcelona, Spain). The results of these tests are then shown using several visualization techniques. This system allows very little interaction and the users have no control over the data analysis process. Dataflow architectures are common in scientific visualization and in data mining (Abram and Treinish, 1995). In general, they are closed platforms that cannot be extended to include new functionalities or specific customized options.

There are already some exploratory data analysis tools available for studying genomics or proteomics (Gentleman et al., 2004; Zeeberg et al., 2005; Lawrence et al., 2006; Buske et al., 2011), or even for exploring the brain anatomy at different levels of detail (for example, displaying fiber tracts or dendrograms Jianu et al., 2009 or brain atlases Sunkin et al., 2013). Similar techniques are being applied for the exploratory analysis of neuronal circuit simulation data (Nowke et al., 2013). In addition, Angulo et al. (2016) have developed BRAVIZ, which is software for exploratory analysis implemented for MRI datasets as well as transcranial magnetic stimulation (TMS) and clinical data. Although BRAVIZ is a very useful tool, it does not support a web interface which allows multiple experts from different laboratories to share data in the way that InTool Explorer does. In the context of neuroscience, Yeatman et al. (2018) described a web-based visualization tool for diffusion MRI data. Although this tool supports simple data analysis, it was not designed for data exploration but rather for story-telling (to understand and reproduce published findings). All of the previously mentioned tools lack the flexibility that InTool Explorer offers. One of the main advantages of our proposed tool is its capacity to dynamically adapt to specific requirements of the task and/or the dataset being studied. Moreover, these tools do not allow the

creation of new spatial filters while the tool is being used—again, a task that is possible with InTool Explorer.

InTool Explorer provides interaction techniques with different data representations, which make use of the power of combining these simultaneous representations to facilitate the task at hand. InTool Explorer has been shown to improve the study of complex data obtained from the analysis of multifactorial neurological conditions, such as AD, the research of which generates a huge volume of data which are both difficult to analyze with simple statistical tools and challenging to interpret. Since data from multidisciplinary sources can be visualized altogether with InTool Explorer, a more detailed analysis can be achieved, opening up the possibility of a more accurate definition of the neurological disease.

From the software point of view, InTool Explorer’s architecture allows new functionalities to be integrated very easily. The current filter and visualization linked-cards are just an example of those that could be implemented. As mentioned above, all the possibilities offered by R packages are available, because this module is already integrated in our tool. However, we have focused our efforts on providing more flexibility to set up linked filters and visualizations in the interactive exploratory analysis stage instead of developing more automatized statistical computations. As has been described above, users are able to create new linked-cards such as the example used in this case study—the Regions filter. In this way, the spatial data present in raw images (e.g., of brain regions) can be linked to tabular data (such as the clinical dataset), with no additional demands in terms of the level of user expertise. No software dependencies or specific hardware requirements are needed to work with InTool Explorer. Only a web browser is required, and the user’s work can be shared with any laboratory around the world *via* the internet.

Regarding task abstraction, InTool Explorer covers all the tasks proposed by Munzner (2014)—except *Enjoy*—although we hope users will implicitly gain enjoyment from performing this task. Below are several examples that cover all of the categories of this taxonomy:

- Analyze:
 - Consume:
 - * Discover: new knowledge has been gained from the use of InTool Explorer.
 - * Present: figures extracted from the tool have been used to show and explain new insights to neuroscientists in several forums.
 - Produce:
 - * Annotate: for example, additional user-specific images can be included as new spatial filters.
 - * Record: screenshots or new subsets of data can be recorded from a working session.
 - * Derive: statistics can be easily extracted from populations.
- Search:
 - Lookup: sometimes users know what they are looking for and where it is.

- Locate: sometimes they know what they are looking for without knowing where it is.
- Browse: users often do not know what they are looking for, but they have a specific location in mind for reviewing a range of data.
- Explore: looking for outliers is a typical case when users are not exactly sure how to start the study (Shneiderman, 1996).
- Query:
 - Identify: specific references to single individuals can be obtained from filtering.
 - Compare: comparisons among different patients can be achieved from several visualization methods.
 - Summarize: finally, a comprehensive view of all patients can be shown, and the statistics card can summarize some specific variables of the population being studied.

CONCLUSIONS

InTool Explorer has proved to be very useful for its intended purpose, providing new insights into the raw data extracted from a variety of analyses performed in different patients and brain areas in AD. The application provides new interactive support (including other tools previously developed by the authors, e.g., Morales et al., 2011, 2012; Brito et al., 2013; Toharia et al., 2014, 2016), which improves and facilitates neuroscientists' research.

Common tools used for analyzing raw data of the dataset presented here are basic spreadsheets and isolated visualization tools, which do not offer the same level of insight. InTool Explorer allows data to be compared quickly and easily, which was not possible with other tools. In clinical practice, a lot of information is obtained from each patient (diverse medical tests, cognitive-behavioral evaluations, etc.), which produces a huge volume of data. Applying exploratory tools, such as InTool, provides the opportunity to visualize all the information as well as manipulate it, filter variables, and explore new hypotheses. It is expected that further experiments with other datasets, similar to the ones presented in this article, will allow new hypotheses about AD and other neurological conditions to be established, thereby leading to a better understanding of these conditions.

Another significant contribution of this tool is its functional design, which makes it possible to easily combine multidimensional variables and to explore their possible relations by multiple plots. Since a large volume of data is generated, errors often appear at late stages of the research. InTool Explorer allows fast visualization of the data, detection of errors, and re-evaluation to establish new hypotheses or new lines of research. Thus, in the laboratory, this tool provides a new opportunity to study and analyze neuroscience data prior to any statistical analysis.

Finally, as mentioned above, the system was designed to facilitate the integration of new tools for visualization and analysis. According to the users' needs, we have identified a set of statistical tests and visualizations to be implemented:

- Multi-factor ANOVA: the currently available test only considers one quantitative variable to be compared by

Student's *t*-test or U-Mann Whitney. Multi-factor ANOVA compares the means of quantitative variables analyzing their variances and allows determination of the effect of multiple factors (qualitative variables).

- Treemaps: this visualization represents data as rectangles in a hierarchical structure of the data, while displaying quantities for each category *via* area and/or color.
- Heatmaps: in combination with the correlation test (already implemented), these maps represent a fast tool for cross-examining multivariate data.
- Chord diagrams: these diagrams can be used to show relationships among categorical data.
- Force-based diagrams: allow interaction with interconnected data items in a simple way.

We plan to include these new features in the next version of the platform. Additionally, since the platform is publicly available, in order to receive feedback from users, we have implemented an e-mailbox. This option is now available under the user's main menu as "Contact development team." Regarding new interactions, our main efforts will focus on improving the usability of the tool.

DATA AVAILABILITY

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors conceived the project. DF acquired the data, contributed to the design of the tool and validations, and drafted the figures. MG designed the software tool implementation, carried out computational experiments and validations, and drafted the article. CT and ALT contributed to software tool implementation. JM designed and implemented a preliminary version of the tool. ÁR and LP supervised the design, development and implementation of the tool. JDF contributed to the design of the tool and supervised validations. LA-N contributed to the design of the tool, supervised validations and drafted the article. All authors contributed to the final manuscript.

FUNDING

This work was supported by grants from the following entities: (1) the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities: SAF 2015-66603-P, TIN2017-83132-C2, and the Cajal Blue Brain Project, Spanish partner of the Blue Brain Project initiative from EPFL (Switzerland); (2) Centro de Investigación en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED, Spain, CB06/05/0066); (3) the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation program under specific Grant Agreement No. 720270 (Human Brain Project SGA1) and No. 785907 (Human Brain Project SGA2); and (4) Universidad Politécnica de Madrid (PINV-18-XEOGHQ-19-4QTEBP).

REFERENCES

- Abram, G., and Treinish, L. (1995). "An extended data-flow architecture for data analysis and visualization," in *Proceedings Visualization '95*, (Atlanta, GA: IEEE), 263–270. doi: 10.1109/visual.1995.480821
- Angulo, D. A., Schneider, C., Oliver, J. H., Charpak, N., and Hernandez, J. T. (2016). A multi-faceted visual analytics tool for exploratory analysis of human brain and function datasets. *Front. Neuroinform.* 10:36. doi: 10.3389/fninf.2016.00036
- Arkkelin, D. (2014). *Using SPSS to Understand Research and Data Analysis. Psychology Curricular Materials*. Available online at: http://scholar.valpo.edu/psych_oer/1
- Benavides-Piccione, R., Fernaud-Espina, I., Robles, V., Yuste, R., and DeFelipe, J. (2012). Age-based comparison of human dendritic spine structure using complete three-dimensional reconstructions. *Cereb. Cortex* 23, 1798–1810. doi: 10.1093/cercor/bhs154
- Bostock, M., and Heer, J. (2009). Protovis: a graphical toolkit for visualization. *IEEE Trans. Vis. Comput. Graph.* 15, 1121–1128. doi: 10.1109/TVCG.2009.174
- Bostock, M., Ogievetsky, V., and Heer, J. (2011). D3: data-driven documents. *IEEE Trans. Vis. Comput. Graph.* 17, 2301–2309. doi: 10.1109/TVCG.2011.185
- Brito, J. P., Mata, S., Bayona, S., Pastor, L., DeFelipe, J., and Benavides-Piccione, R. (2013). Neuronize: a tool for building realistic neuronal cell morphologies. *Front. Neuroanat.* 7:15. doi: 10.3389/fnana.2013.00015
- Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82, 239–259. doi: 10.1007/BF00308809
- Buske, O. J., Hoffman, M. M., Ponts, N., Roch, K. G. L., and Noble, W. S. (2011). Exploratory analysis of genomic segmentations with segtools. *BMC Bioinformatics* 12:415. doi: 10.1186/1471-2105-12-415
- Chambers, J. M., Cleveland, W. S., Kleiner, B., and Tukey, P. A. (1983). *Graphical Methods for Data Analysis*. Belmont, CA: Wadsworth.
- DeFelipe, J. (2010). From the connectome to the synaptome: an epic love story. *Science* 330, 1198–1201. doi: 10.1126/science.1193378
- DeFelipe, J. (2017). Neuroanatomy and global neuroscience. *Neuron* 95, 14–18. doi: 10.1016/j.neuron.2017.05.027
- Docker Inc. (2018). Docker. Available online at: <https://www.docker.com/>
- Friendly, M., and Denis, D. (2005). The early origins and development of the scatterplot. *J. Hist. Behav. Sci.* 41, 103–130. doi: 10.1002/jhbs.20078
- Furcila, D., DeFelipe, J., and Alonso-Nanclares, L. (2018). A study of amyloid and phosphotau in plaques and neurons in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *J. Alzheimers Dis.* 64, 417–435. doi: 10.3233/JAD-180173
- Gentleman, R. C., Carey, V. J., Bates, D. M., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., et al. (2004). Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 5:R80. doi: 10.1007/s10827-029362-0_21
- Gonzalez-Riano, C., Tapia-González, S., García, A., Muñoz, A., DeFelipe, J., and Barbas, C. (2017). Metabolomics and neuroanatomical evaluation of post-mortem changes in the hippocampus. *Brain Struct. Funct.* 222, 2831–2853. doi: 10.1007/s00429-017-1375-5
- Hagmann, P., Cammoun, L., Gigandet, X., Gerhard, S., Grant, P. E., Wedeen, V. J., et al. (2010). MR connectomics: principles and challenges. *J. Neurosci. Methods* 194, 34–45. doi: 10.1016/j.jneumeth.2010.01.014
- Ihaka, R., and Gentleman, R. (1996). R: a language for data analysis and graphics. *J. Comput. Graph. Stat.* 5, 299–314. doi: 10.2307/1390807
- Inselberg, A., and Dimsdale, B. (1990). "Parallel coordinates: a tool for visualizing multi-dimensional geometry," in *Proceedings of the First IEEE Conference on Visualization: Visualization '90*, (San Francisco, CA: IEEE), 361–378. doi: 10.1109/visual.1990.146402
- Jianu, R., Demiralp, C., and Laidlaw, D. (2009). Exploring 3D DTI fiber tracts with linked 2D representations. *IEEE Trans. Vis. Comput. Graph.* 15, 1449–1456. doi: 10.1109/tvcg.2009.141
- Kandel, E. R., Markram, H., Matthews, P. M., Yuste, R., and Koch, C. (2013). Neuroscience thinks big (and collaboratively). *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 659–664. doi: 10.1038/nrn3578
- Kosara, R., Bendix, F., and Hauser, H. (2006). Parallel sets: interactive exploration and visual analysis of categorical data. *IEEE Trans. Vis. Comput. Graph.* 12, 558–568. doi: 10.1109/TVCG.2006.76
- Lawrence, M., Lee, E.-K., Cook, D., Hofmann, H., and Wurtele, E. (2006). "exploRase: exploratory data analysis of systems biology data," in *Fourth International Conference on Coordinated and Multiple Views in Exploratory Visualization (CMV'06)*, (London, England: IEEE), 14–20. doi: 10.1109/cmv.2006.7
- Martone, M. E., and Ascoli, G. A. (2013). Connecting connectomes. *Neuroinformatics* 11, 389–392. doi: 10.1007/s12021-013-9207-0
- Mei, H., Ma, Y., Wei, Y., and Chen, W. (2018). Design space of construction tools for information visualization: a survey. *J. Vis. Lang. Comput.* 44, 120–132. doi: 10.1016/j.jvlc.2017.10.001
- MIT (2018). React bootstrap. Available online at: <https://react-bootstrap.github.io/>
- MongoDB Inc. (2018). MongoDB. Available online at: <https://www.mongodb.com/>
- Montero, C. (2003). The antigen-antibody reaction in immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 51, 1–4. doi: 10.1177/002215540305100101
- Morales, J., Alonso-Nanclares, L., Rodríguez, J. R., DeFelipe, J., Rodríguez, A., and Merchán-Pérez, A. (2011). ESPINA: a tool for the automated segmentation and counting of synapses in large stacks of electron microscopy images. *Front. Neuroanat.* 5:18. doi: 10.3389/fnana.2011.00018
- Morales, J., Benavides-Piccione, R., Rodríguez, A., Pastor, L., Yuste, R., and DeFelipe, J. (2012). Three-dimensional analysis of spiny dendrites using straightening and unrolling transforms. *Neuroinformatics* 10, 391–407. doi: 10.1007/s12021-012-9153-2
- Munzner, T. (2014). *Visualization Analysis and Design*. Boca Raton, FL: AK Peters/CRC Press.
- Nguyen, H., and Rosen, P. (2017). DSPCP: a data scalable approach for identifying relationships in parallel coordinates. *IEEE Trans. Vis. Comput. Graph.* 24, 1301–1315. doi: 10.1109/TVCG.2017.2661309
- Nowke, C., Schmidt, M., van Albada, S. J., Eppler, J. M., Bakker, R., Diesmann, M., et al. (2013). "VisNEST—interactive analysis of neural activity data," in *2013 IEEE Symposium on Biological Data Visualization (BioVis)*, (Atlanta, GA: IEEE), 65–72. doi: 10.1109/biovis.2013.6664348
- Rising, L., and Janoff, N. S. (2000). The scrum software development process for small teams. *IEEE Software* 17, 26–32. doi: 10.1109/52.854065
- Satyanarayan, A., Moritz, D., Wongsuphasawat, K., and Heer, J. (2016). Vega-lite: a grammar of interactive graphics. *IEEE Trans. Vis. Comput. Graph.* 23, 341–350. doi: 10.1109/TVCG.2016.2599030
- Shneiderman, B. (1996). "The eyes have it: a task by data type taxonomy for information visualizations," in *Proceedings 1996 IEEE Symposium on Visual Languages*, (Boulder, CO, USA: IEEE), 336–343. doi: 10.1109/VL.1996.545307
- Stolte, C., and Tang, D., and Hanrahan, P. (2002). Polaris: a system for query, analysis, and visualization of multidimensional relational databases. *IEEE Trans. Vis. Comp. Graph.* 8, 52–65. doi: 10.1109/2945.981851
- Sunkin, S., Ng, L., Lau, C., Dolbeare, T., Gilbert, T. L., Thompson, C. L., et al. (2013). Allen brain atlas: an integrated spatio-temporal portal for exploring the central nervous system. *Nucleic. Acids Res.* 41, 996–1008. doi: 10.1093/nar/gks1042
- TIBCO Software Inc. (2018). Tibco statistica. Available online at: <https://community.tibco.com/products/tibco-statistica>
- Toharia, P., Morales, J., de Juan, O., Fernaud, I., Rodríguez, A., and DeFelipe, J. (2014). Musical representation of dendritic spine distribution: a new exploratory tool. *Neuroinformatics* 12, 341–353. doi: 10.1007/s12021-013-9195-0
- Toharia, P., Robles, O. D., Fernaud, I., Makarova, J., Galindo, S., Rodríguez, A., et al. (2016). Pyramidal explorer: a new interactive tool to explore morpho-functional relations of pyramidal neurons. *Front. Neuroanat.* 15:9. doi: 10.3389/fnana.2015.00159
- Tukey, J. W. (1977). *Exploratory Data Analysis*. Boston, MA: Addison-Wesley.
- Wang, V., Salim, F., and Moskovits, P. (2012). *The Definitive Guide to HTML5 WebSocket*. Germany: Apress.
- Werner, M., Chott, A., Fabiano, A., and Battifora, H. (2000). Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am. J. Surg. Pathol.* 24, 1016–1019. doi: 10.1097/0000478-200007000-00014
- Wickham, H. (2009). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York, NY: Springer-Verlag.

- Yeatman, J. D., Richie-Halford, A., Smith, J. K., Keshavan, A., and Rokem, A. (2018). A browser-based tool for visualization and analysis of diffusion MRI data. *Nat. Commun.* 9:940. doi: 10.1038/s41467-018-03297-7
- Yu, B., and Silva, C. T. (2017). Visflow: web-based visualization framework for tabular data with a subset flow model. *IEEE Trans. Vis. Comput. Graph.* 23, 251–260. doi: 10.1109/tvcg.2016.2598497
- Zeeberg, B. R., Qin, H., Narasimhan, S., Sunshine, M., Cao, H., Kane, D. W., et al. (2005). High-throughput GoMiner, an 'industrial-strength' integrative gene ontology tool for interpretation of multiple-microarray experiments, with application to studies of Common Variable Immune Deficiency (CVID). *BMC Bioinformatics* 6:168. doi: 10.1186/1471-2105-6-168

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Furcila, García, Toader, Morales, LaTorre, Rodríguez, Pastor, DeFelipe and Alonso-Nanclares. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Phospho-Tau Changes in the Human CA1 During Alzheimer's Disease Progression

Mamen Regalado-Reyes^b, Diana Furcila^b, Félix Hernández^{c,d}, Jesús Ávila^{c,d},
Javier DeFelipe^{a,b,d} and Gonzalo León-Espinosa^{b,c,*}

^a*Instituto Cajal, CSIC, Madrid, Spain*

^b*Laboratorio Cajal de Circuitos Corticales (CTB), Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, Spain*

^c*Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Madrid, Spain*

^d*CIBERNED, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas, Spain*

^e*Departamento de Química y Bioquímica, Facultad de Farmacia, CEU San Pablo University – CEU Universities, Madrid, Spain*

Accepted 4 March 2019

Abstract. Despite extensive studies regarding tau phosphorylation progression in both human Alzheimer's disease cases and animal models, the molecular and structural changes responsible for neurofibrillary tangle development are still not well understood. Here, by using the antibodies AT100 (recognizes tau protein phosphorylated at Thr212 and Ser214 in the proline-rich region) and pS396 (recognizes tau protein phosphorylated at serine residue 396 in the C-terminal region), we examined phospho-tau immunostaining in neurons from the hippocampal CA1 region of 21 human cases with tau pathology ranging from Braak stage I to VI. Our results indicate that the AT100/pS396 ratio decreases in CA1 in accordance with the severity of the disease, along with its colocalization. We therefore propose the AT100/pS396 ratio as a new tool to analyze the tau pathology progression. Our findings also suggest a conformational modification in tau protein that may cause the disappearance of the AT100 epitope in the late stages of tau pathology, which may play a role in the toxic tangle aggregation. Thus, this study provides new insights underlying the stages for the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease.

Keywords: Alzheimer's disease, hippocampus, AT100, neurofibrillary tangles, pS396, tau phosphorylation

INTRODUCTION

Neurofibrillary tangles (NFTs), together with amyloid- β (A β) plaques, are the major neuropathological hallmarks of Alzheimer's disease (AD). Symptoms in early stages of the disease include loss of context, disorientation, and deficits in memory functions [1]. It has also been proposed that the early loss of episodic memory is closely associated with the progressive degeneration of the medial tempo-

ral lobe structures [2]. Damage to the hippocampus causes profound impairments in long-term episodic memory [3–5], suggesting a central role of the hippocampus in learning and memory. In particular, the CA1 field has been proposed as a relevant region for memory consolidation, since it represents a gateway of information between the hippocampus and cortico/subcortical areas [6, 7]. In support of this, in AD cases, the CA1 usually presents a clear atrophy when compared to the non-demented brains, as well as a reduction in the number of neurons and synapses, which correlates with cognitive decline [8–12]. Recently, it has been proposed that features of the CA1 are key indicators of memory dysfunction in amnesic mild cognitive impairment [13]. In this

*Correspondence to: Gonzalo León, PhD, Departamento de Química y Bioquímica, Facultad de Farmacia, Universidad San Pablo CEU, Madrid, Pozuelo de Alarcón, Madrid 28223, Spain. E-mail: gonzalo.leonespinosa@ceu.es.

regard, it has been suggested that NFTs are most closely correlated with cognitive decline, promoting neuronal morphology impairment [14].

The main components of NFTs are the paired helical filaments (PHFs), composed of aggregates of abnormally hyperphosphorylated tau protein. In AD, anomalous tau phosphorylation first appears in the transentorhinal and entorhinal cortices; it then spreads to the hippocampus and, eventually, extends to the neocortex [15]. The monomeric form of tau protein promotes assembly and stabilization of microtubules [16], playing a crucial role in the cytoskeleton maintenance. However, once tau is hyperphosphorylated, it decreases microtubule binding affinity, inhibiting the assembly of microtubules and changing the interaction with plasma membranes. Some of the consequences of these modifications are the impairment of axonal transport, as well as differential dendritic and post-synaptic tau distribution, among others [17]. Recently, new harmful roles have been associated with pathological tau, such as targeting microglia to promote neuron phagocytosis [18] or the impairment of nucleocytoplasmic transport, which would affect the integrity and functioning of the nucleus of the neurons [19].

Tau protein contains over 80 potential tau phosphorylation sites that may alter the protein structure and promote conformational changes, which in turn may allow its aggregation [20, 21]. The microtubule binding domain (a repeat region at the C-terminus) is critical for PHF assembly while, in the proline-rich region, the phosphorylation of T212/S214 residues decreases the interaction with microtubules [22] and prevents PHF formation [23]. These two phosphorylated amino acids form the epitope of the antibody AT100 [24].

It has been proposed that the sequential phosphorylation of tau protein is linked to NFT development and the progression of AD [25]. Phosphorylation at Ser202/Thr205 (epitope recognized by the antibody AT8) represents an early degenerative change of the cytoskeleton [26, 27], which plays a central role in the successive tau phosphorylation [28] and has been associated with early stages of the AD [29, 30]. AT8 is used to classify the neurofibrillary degeneration into stages known as the Braak stages [31]. Conversely, phosphorylation at site Ser396 is commonly related to late stages, as it is mostly found in NFTs [29]. However, another study reported that tau phosphorylation at S396/S404 is one of the earliest events in AD [32], along with the truncation of the C-terminal region [33, 34]. In addition, Luna-Muñoz et al.

have characterized the sequential appearance of specific tau phospho-dependent epitopes, revealing that AT100 appears after AT8 [34]. In general, although these studies suggest that toxic tau aggregates are formed by a cooperative and sequential tau hyperphosphorylation [35], further research is needed to understand which events are crucial to promote neurodegeneration.

In the present study, we have used the antibodies AT100 and pS396 which are directed against different phospho-tau sites to examine the phospho-tau staining in neurons from the human hippocampal CA1 region. For this purpose, we have studied human brain samples from individuals with tau pathology with a neurofibrillary tangle Braak stage ranging from I to VI. Our findings revealed that the AT100/pS396 ratio decreased in CA1 and that this decrease is in accordance with the severity of the disease. Furthermore, the lower AT100/pS396 ratio was in parallel with a decrease in the colocalization of immunostaining using AT100 and pS396 antibodies.

MATERIALS AND METHODS

Human brain tissue samples were obtained from two different sources: *Banc de Teixits Neurològics* from *Hospital Universitari Clinic de Barcelona* (Dr. I. Ferrer, *Servicio de Anatomía Patológica*, IBIDELL-*Hospital Universitario de Bellvitge*, Barcelona, Spain) and the *Banco de Tejidos Fundación CIEN* (Dr. A. Rábano, *Área de Neuropatología*, *Centro Alzheimer*, *Fundación Reina Sofía*, Madrid, Spain). Clinical data and other variables about cases were obtained from each individual (Table 1). Samples were obtained from 4 subjects with no evidence of cognitive impairment or dementia (IF9, IF8, AB5 and AB6), and 17 cases with AD (VK2, VK21, BCN11, BCN15, BCN4, BCN2, BCN6, BCN10, VK15, VK27, VK28, BCN1, BCN7, BCN9, BCN12, BCN13 and VK16). According to the clinical and neuropathological criteria provided by the above-mentioned centers, the cases were classified in Table 1 from low to high Braak staging.

Tissue blocks were fixed in cold 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 0.1 M sodium phosphate buffer (PB; Panreac, 131965, Spain) pH 7.4 for 24-48 h. After fixation, the tissue was washed in PB, cryoprotected (30% sucrose solution for at least 24 h) and frozen at -20°C for longer preservation. Serial 50 μm thick coronal sections from the hippocampus were obtained using a

Table 1

Pathological and technical information of the 21 cases from which the brain samples were obtained. We have used an internal code to ensure the confidentiality of each sample. LBD, Lewy body disease; HS, hippocampal sclerosis; Syn, synuclein; –, not available

Cases	Age (y)	Gender	Postmortem delay (h:min)	Braak stage	CERAD stage	Evidence of cognitive impairment or dementia	Additional Neurological diagnosis
IF9	72	Male	3:30	I	None	NO	Multi-infarct encephalopathy; Argyrophilic grain disease stage II
VK2	87	Male	4	II	A	YES	Small Vessel Disease. Signs of ischemia-acute global anoxia, with infarction in the left hippocampus
IF8	91	Male	2:30	III	A	NO	Argyrophilic grain disease stage III, neuronal ballooning
VK21	78	Female	3:30	III	None	YES	Vascular alterations
BCN11	94	Female	5:45	III	None	YES	Associated Parkinsonism
BCN15	64	Female	3	III	None	YES	LBD; Small Vessel Disease
AB5	59	Male	4	III	None	NO	–
AB6	92	Female	4	III	A	NO	Aging-related tau astroglialopathy
BCN4	87	Female	5:30	IV	B	YES	TDP43; HS
BCN2	82	Female	2	V	C	YES	α Syn (amygdala); HS
BCN6	76	Female	5	V	C	YES	TDP43 (limbic); HS
BCN10	80	Female	5	V	C	YES	Meningioma
VK15	86	Male	2:30	V	C	YES	Vascular alterations; HS
VK27	95	Female	4	V	B	YES	LBD (amygdala)
VK28	86	Female	5:30	V	C	YES	LBD (limbic)
BCN1	90	Male	4:30	VI	C	YES	TDP43 (hippocampus)
BCN7	89	Female	4:15	VI	C	YES	Microinfarctions
BCN9	84	Female	5	VI	C	YES	TDP43 (amygdala)
BCN12	74	Female	3:30	VI	C	YES	TDP43 (limbic); α Syn (orbitofrontal); HS
BCN13	83	Male	2:30	VI	C	YES	Small Vessel Disease
VK16	88	Female	2	VI	C	YES	Vascular encephalopathy; LBD (amygdala) Vascular alterations; LBD; HS

microtome (MICROM, HM450; freeze unit, KS34, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA).

Selected sections were first rinsed in 0.1 M PB, pretreated in 2% H₂O₂ for 30 min to remove endogenous peroxidase activity, and then incubated for 1 h at room temperature in a solution of 3% normal horse serum (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) and 0.25% Triton-X (Merck, Darmstadt, Germany). Subsequently, sections were incubated for 48 h at 4°C in the same solution with mouse IgG1-anti-phospho-tau, clone AT8 (1:2000, MN1020, Thermo Scientific), mouse anti-human A β antibody (1:50, clone 6F/3D; Dako, Glostrup, Denmark) or rabbit anti phospho (409/410) TDP43 (1:500; 22309-1-AP; Proteintech, Chicago, IL, USA). Sections were then processed with a secondary biotinylated horse anti-mouse IgG antibody (1:200, Vector Laboratories), and then incubated for 1 h in an avidin-biotin peroxidase complex (Vectastain ABC Elite PK6100, Vector) and, finally, with the chromogen 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Sigma-Aldrich). Thereafter, sections

were dehydrated, cleared with xylene and coverslipped.

To study tau phosphorylation colocalization, double immunostainings were performed. Sections were first rinsed in 0.1 M PB, pretreated in 2% H₂O₂ for 30 min, and then incubated for 1 h at room temperature in a solution of 0.25% Triton-X (Merck) with 3% normal goat serum (Vector Laboratories Inc.). The sections were then incubated for 48 h at 4°C with the primary antibodies: mouse anti tau (phospho Thr212/Ser214; AT100) (1:500, MN1060, Thermo Scientific) and rabbit anti-Tau (PHF-Tau clone PHF1 pS396) (1:2000, 44752 G, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA). Afterwards, sections were rinsed in 0.1 M PB and incubated for 2 h at room temperature in different solutions containing a goat anti-rabbit antibody coupled to Alexa Fluor 594 and a goat anti-mouse coupled to Alexa Fluor 488 (1:1000; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) along with DRAQ5 (1:5000; ab108410 Abcam, Cambridge, UK), a far-red fluorescent DNA dye used to label the cell nucleus [36]. The sections were finally washed

and mounted with ProLong Gold Antifade Reagent (Invitrogen Corp.).

As fixation could affect the biochemical properties of proteins, such that the antigen of interest is masked, we performed antigen retrieval before immunostaining to confirm that the epitopes were still recognizable by our primary antibodies. For that purpose, several sections were incubated in a 10 mM sodium citrate buffer (pH 8.5) for 30 min at 80°C before incubation in 2% H₂O₂.

Image acquisition and analysis

Immunofluorescence sections were examined with a Zeiss LSM 710 confocal laser scanning system (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany). They were recorded at 0.35 μm (63x objective) or 0.5 μm intervals (40x objective) through separate channels, and ZEN 2012 software (Zeiss) was then used to construct composite images from each optical series by combining the images recorded through the different channels (image resolution 1024 × 1024 pixels; pixel size 188 nm). Z depth in every confocal stack was 40 μm. We scanned at least 6 image stacks from the whole CA1 region from each case (at least one section for each tissue sample). We manually quantified the number of the colocalizing neurons (somas) by analyzing each confocal plane.

Measurements of Aβ plaques in CA1 area (mm²) were performed using Neurolucida software (MicroBrightField, Williston, USA). We have used one coronal section from each case. Normality and homoscedasticity of mean values obtained were analyzed with the Shapiro–Wilk and Levene tests, respectively. As normality and homoscedasticity criteria were satisfied, we used a paired t test to compare between the AT100/pS396 ratios and colocalization percentage mean values obtained in low (I–III) and high (V–VI) Braak Stage (GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA, <http://www.graphpad.com>). The results are presented as mean ± standard deviation of the mean (SD).

RESULTS

We have performed double immunofluorescences using the antibodies AT100 and pS396 to study the differential staining of the two markers depending on the severity of the disease associated with the neurofibrillary pathology. Our analyses were carried out using brain coronal sections containing the anterior

portion of the CA1 region of the hippocampus from 21 autopsies of cases presenting different degrees of tau pathology, most of them diagnosed with AD (see Table 1). In order to classify the neurofibrillary pathology from the samples used in this study, we have considered the criteria provided by the donor Hospital or Foundation (see the Materials and Methods section), which is based on the profiles described by Braak et al. (1994) using AT8 labeling (Braak staging). Figure 1 shows the differential pattern of tau phosphorylation (AT100 and pS396) from a Braak stage IV case.

Characterization of AT100 and pS396 staining and cell viability in CA1 neurons

The pattern of staining of the phospho-tau neurons was studied in detail. Figure 2A shows an example of a neuron from a Braak stage I case stained both with AT100 and pS396 that shows a granular (non-fibrillar) staining. This kind of staining may indicate an intermediate form of tau fibrils and has been described as an early event in the development of tau pathology [37]. Moreover, we found that in the cells showing a granular staining, AT100 labeling was also always present, either colocalizing with pS396 (Fig. 2A; empty yellow arrow) or alone (Fig. 2E; empty purple arrow). However, no granular AT100 negative but pS396 positive cells were found, supporting the notion that AT100 epitope appears prior to Serine 396 phosphorylation. In addition to the granular pattern of staining, we found cells in an intermediate stage between granular and NFT (Fig. 2C; empty yellow arrow). These cells were predominantly stained with AT100 and the majority of them showed isolated pS396 positive fibers or small aggregates in the process of forming (pre-tangles). Finally, it is worth noting that we found all possible phospho-tau combinations in the NFTs analyzed: AT100 positive (Fig. 2D; purple arrows), pS396 positive (Fig. 2C, E; white arrows), and AT100/pS396 positive (Fig. 2B, C; yellow arrows).

Based on the nuclear DRAQ5 staining, we have also analyzed the nucleus integrity of the phospho-tau labeled neurons. When a neuron dies, the intraneuronal aggregates (iNFTs) of hyperphosphorylated and misfolded tau become extracellular tangles (eNFTs, known as “ghost” tangles) [25]. Based on this, we found viable nuclei in all cells stained with a granular AT100 or AT100/pS396 (Fig. 2A; empty yellow arrows and Fig. 1E; empty purple arrows). Conversely, ghost tangles are only found in the

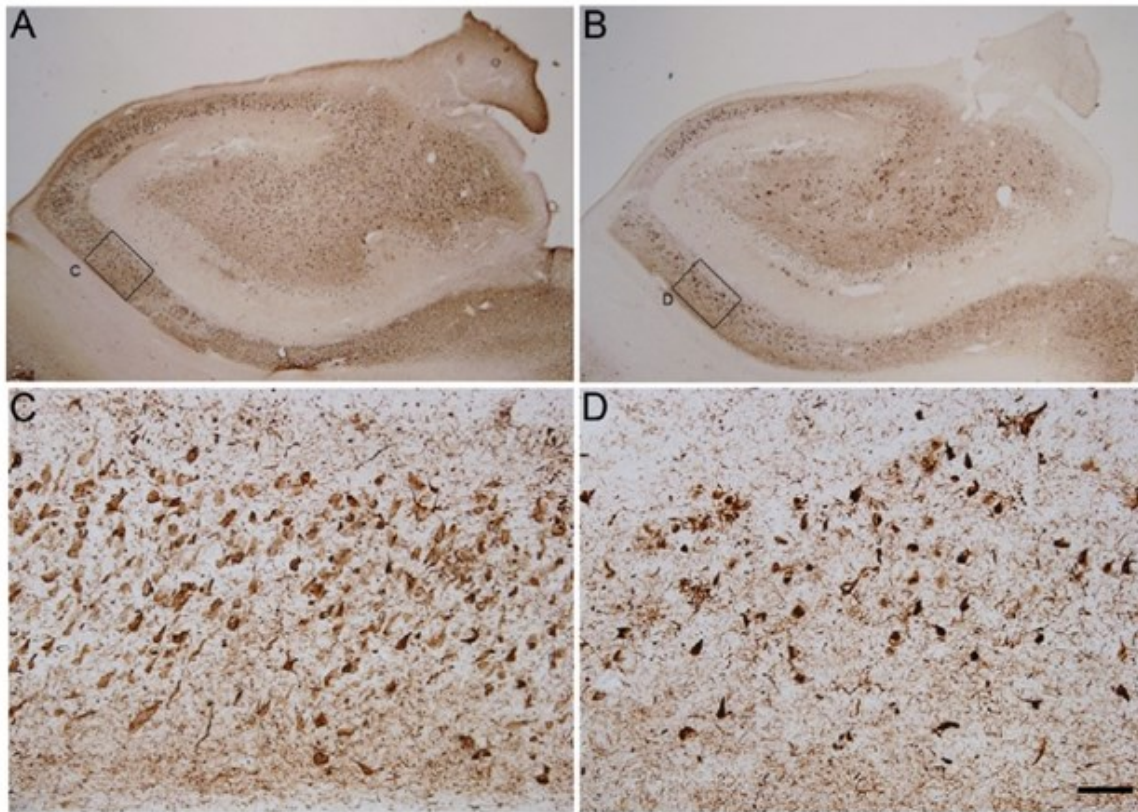


Fig. 1. Photomicrographs showing the pattern of hyperphosphorylated tau immunostaining using pS396 (A and C) and AT100 (B and D) antibodies in two adjacent coronal sections from the hippocampus of an AD case (BCN4). Small squared zones in A and B are shown at higher magnification in C–D (CA1 field of the hippocampus). Scale bar shown in D indicates 1824 μm in A–B and 114 μm in C–D.

pS396 positive NFTs (Fig. 2C, E; white arrows). Nonetheless, when analyzing cells showing either an AT100 NFT or an AT100/pS396 NFT, we did not find any alteration of their nuclei (Fig. 2B, C; yellow arrows). However, the nucleus was completely missing if pS396 immunoreactivity is predominant in NFTs labeled both with AT100 and pS396. Thus, the presence or absence of the nucleus appears to be dependent on the pS396 and AT100 immunoreactive elements, with AT100 epitope appearing to protect cell integrity while pS396 seems to promote cell death.

AT100/pS396 ratio and Braak stage

After characterizing the AT100 and pS396 labeling, we studied the ratios and colocalization values between these two markers, comparing early Braak stages (I–III) and late Braak stages (IV–VI). Our results indicate that the progression of tau pathology inversely correlates with the AT100/pS396 ratio (see

Table 2). Cases with lower Braak stages display a higher ratio than cases with higher Braak stages. Figures 3A and 3B shows representative examples of the AT100 and pS396 immunostaining. Figure 3C shows that the differences found are statistically significant. In most of the analyzed cells, an intense labeling of pS396 was normally present in the NFT, which indicates a late state in the progression of PHF assembly. This reverse correlation was also observed when the colocalization percentage versus the Braak staging is compared (Fig. 3C). In the IV–VI Braak cases, the colocalization percentage was 30.8%, whereas in the I–III Braak cases, the colocalization was 74.8%. As for the AT100/pS396 ratio, the differences observed were statistically significant.

Furthermore, since TDP-43 accumulation is associated with cognitive impairment and dementia, we have determined the relationship between TDP43 and the progression of AD (see Supplementary Fig. 6 and Table 2). Our results are in accordance with previous reports which indicate that, in advanced AD cases,

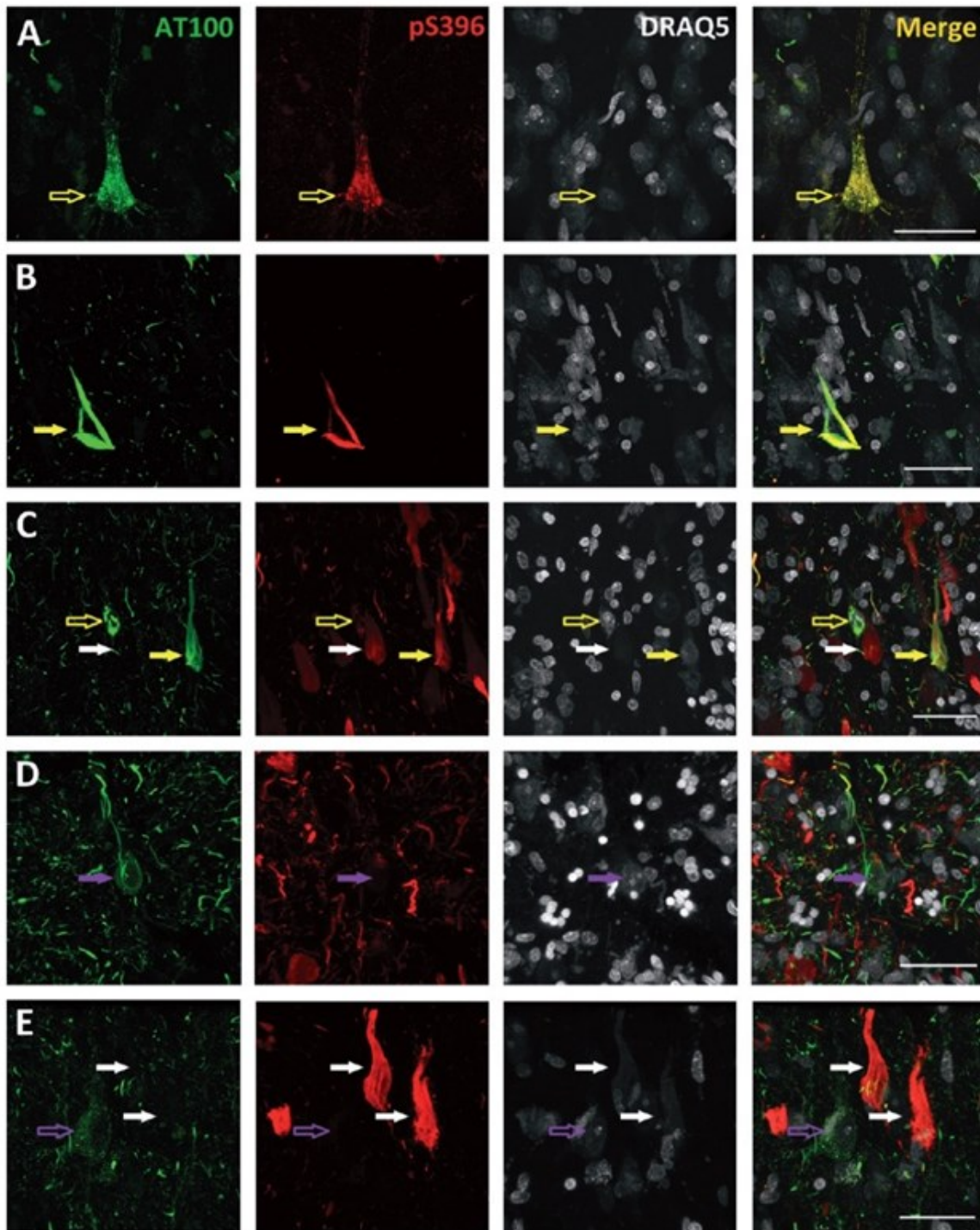


Fig. 2. Photomicrographs belonging to cases with Braak stage I (A), III (B), and VI (C, D, and E) illustrating the different patterns of AT100 (green), pS396 (red), and DRAQ5 (grey) labeling found. Empty arrows indicate neurons with a granular staining—either AT100 positive (empty purple arrows) or both AT100 and pS396 positive (empty yellow arrows). Filled arrows indicate NFTs: AT100 positive (purple arrows), pS396 positive (white arrows), or AT100 and pS396 positive (yellow arrows). Higher magnification of panels in Supplementary Figs. 1–5. All scale bars: 40 μ m.

Table 2

Table showing the number of AT100 and pS396 ir-cells in each case, along as the volume analyzed, the ratio AT100/pS396 and the percentage of colocalization. In addition, the table shows the number of plaques per mm² and if TDP43 cytoplasm inclusions were present. –, not available

Cases	Braak	CERAD	Number of AT100 ir-cells	Number of pS396 ir-cells	Total volume analyzed (mm ³)	Ratio AT100/pS396	Percentage of colocalization	Number of A β plaques/mm ²	TDP43 cytoplasm inclusions
IF9	I	None	3	4	0.054	0.75	75	0	NO
VK2	II	A	29	31	0.136	0.93	93.5	–	NO
IF8	III	A	12	16	0.067	0.75	64.7	0	NO
VK21	III	A	36	57	0.119	0.63	63.1	1.01	NO
BCN11	III	None	20	25	0.102	0.80	80	0	–
BCN15	III	None	31	28	0.153	1.10	84.3	0	NO
AB5	III	None	13	13	0.067	1	85.7	0	NO
AB6	III	A	10	19	0.071	0.53	52.6	2.03	NO
BCN4	IV	B	81	231	0.119	0.35	27.3	4.61	NO
BCN2	V	C	43	76	0.054	0.56	52.5	8.59	–
BCN6	V	C	27	124	0.119	0.22	19.8	5.84	YES
BCN10	V	C	33	96	0.102	0.34	30.3	23.11	YES
VK15	V	C	38	40	0.102	0.95	69.5	–	–
VK27	V	B	30	116	0.119	0.26	14	22.96	NO
VK28	V	C	67	156	0.119	0.43	42.9	56.47	YES
BCN1	VI	C	41	74	0.102	0.55	40.2	19.53	YES
BCN7	VI	C	27	140	0.102	0.17	12.3	6.18	–
BCN9	VI	C	4	32	0.102	0.12	12.5	9.35	–
BCN12	VI	C	22	169	0.119	0.13	9.1	40.37	YES
BCN13	VI	C	65	99	0.085	0.65	56.2	7.27	YES
VK16	VI	C	37	246	0.102	0.15	13.6	10.49	YES

TDP43 positive cytoplasmic inclusions are found in around 75% of the cases [38]. Finally, we have measured the number of A β plaques in CA1 region for each case which, as expected, correlates with the severity of the disease (see Supplementary Fig. 6 and Table 2).

DISCUSSION

The main findings in the present study are: 1) the AT100/pS396 ratio decreases in line with the increase in the tau pathology of the samples analyzed and 2) the majority of the neurons in the CA1 area of human samples with a Braak stage of IV–VI do not show colocalization between the AT100 and pS396 tau antibodies (73%). We also demonstrated that, in the late Braak Stages, pS396 phosphorylation is predominant in most of the hippocampal neurons analyzed. Similar results have been reported when analyzing AT8 and pS396 tau immunostaining [39]. Therefore, the use of phospho-tau antibodies in immunohistochemistry may show an underrepresented population of positive phospho-tau cells, especially in advanced AD cases. Regarding the cases that were considered control but that after histopathological analysis of the brain samples showed NFTs with or without A β plaques in the hippocampal formation, it has been

reported that AD affects about 80% of individuals over 65 years, but dementia only occurs in a small percentage of individuals at this age (the prevalence of dementia in AD increases to 25% in 80-year-old individuals). Consequently, it is possible that cases IF8, AB5 and AB6 represent a pre-dementia stage of AD (prodromal AD) [40].

The profiles of several phosphorylation sites have been recently analyzed by western blot to characterize the temporal and spatial phosphorylation patterns in AD tau pathology [41]. However, western blot studies with AD samples provide an average signal of mixed iNFTs and eNFTs, making interpretation of the results difficult. Therefore, we have used an immunocytochemical approach to study the possible tau pathology progression in single neurons.

In a native unfolded state, tau protein adopts a “paperclip” conformation [42]. Pseudo-phosphorylation experiments, targeting epitopes that are recognized by PHF-1 antibody (S396/S404), showed that the paperclip conformation is opened up [43]. The NFTs evolve in a sequential manner depending on the tau conformation adopted. Garcia-Sierra et al. demonstrated that Alz50 conformation, which has the N- and C-terminus intact, precedes the tau 66 conformation, characterized by truncations in the N- and C-terminus [44]. Thus, the order in which tau protein is phosphorylated may affect the

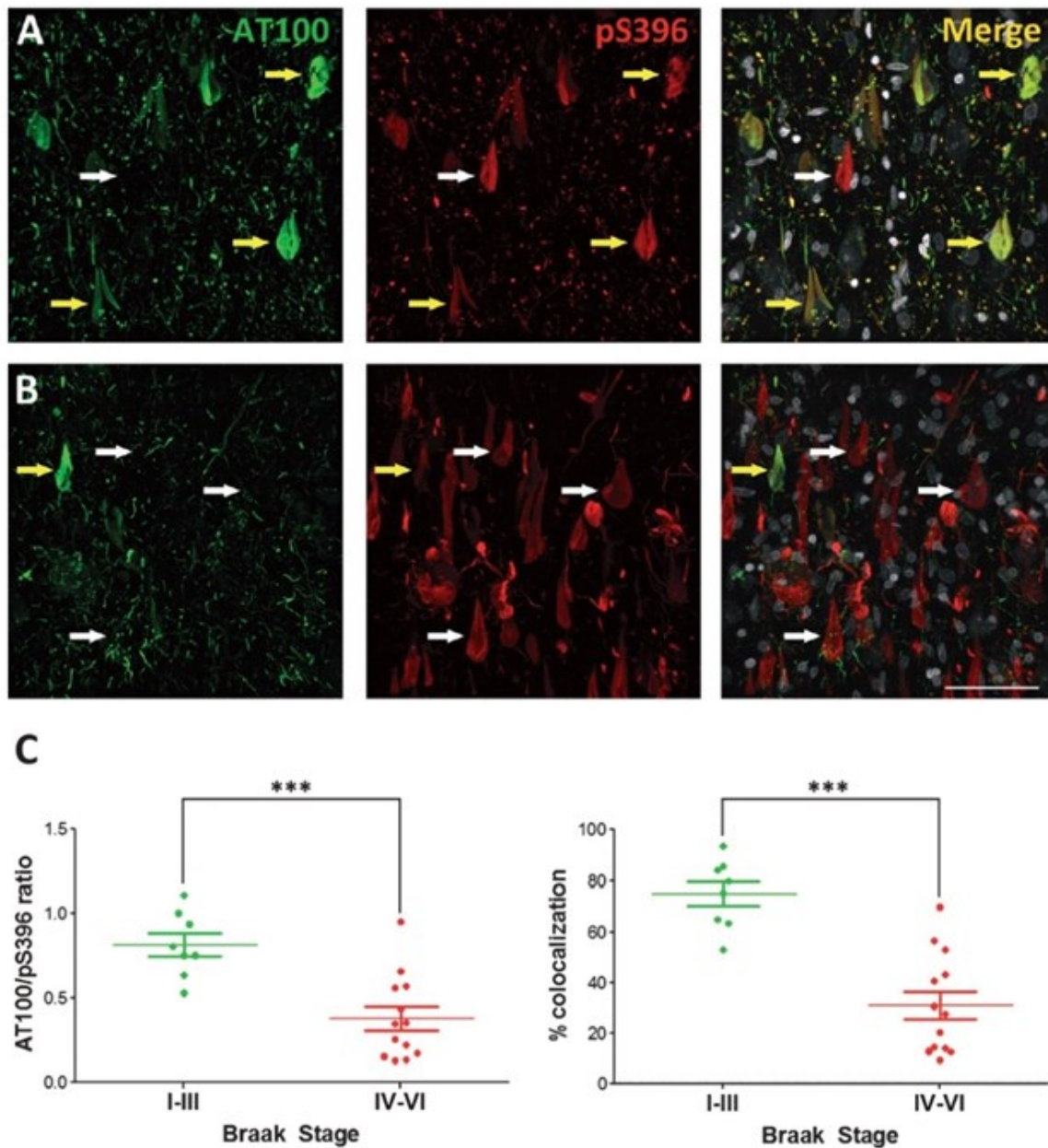


Fig. 3. Representative photomicrographs showing the pattern of both AT100 and pS396 immunostaining in cases with low (I–III) (A) or high (V–VI) (B) Braak Stages. White arrows mark examples of neurons presenting no colocalization, whereas yellow arrows mark double-labeled neurons. (C) Histograms show the AT100/pS396 labeling ratio (left) or the colocalization percentage (right) in all the cases examined in this study grouped by low or high Braak Stage. A paired t test found significant differences in the comparisons between low and high Braak stages for both AT100/S396 ratio and colocalization (mean \pm SD). *** $p < 0.0005$. Scale bar: 60 μ m.

tridimensional structure of tau. If this is the case, our results strongly suggest that the transition from T212/S214 to S396 phosphorylation promotes tau protein misfolding—a change that could be responsible for hiding the recognition sites for AT100 antibody. Further studies are needed to determine if

this event is capable of triggering a conformational change that promotes transition to a toxic NFT. However, there are other possibilities that could explain the results obtained here: 1) serine at position 396 is mostly phosphorylated by GSK3 (via insulin receptor signaling), whereas AT100 recognition

sites are phosphorylated by other kinases such as Dyrk1, PKA, JNK, or PKB/AKT (NMDA and calcium signaling) [21, 45–47]. Therefore, we could hypothesize that a specific neuron-dependent activity of one or more phosphatase/kinase is affecting the tau phosphorylation pattern in the progression of the disease. 2) Another possibility is that, after generation of truncated tau subproducts [44], the C-terminal aggregated region is not accessible to proteases but the proteolytic cleavage is feasible in the proline-rich region.

The analysis of the abnormal posttranslational modifications of tau may be dependent on the A β aggregates or other pathological hallmarks such as TDP43 cytoplasmic inclusions. Here, we have shown that the number of A β plaques or the TDP43 cytoplasm accumulation correlate, as expected, with the severity of the disease. Further studies are needed to study their possible role in the activation of signaling pathways involved in tau phosphorylation. Another issue to take into account is the influence of the postmortem delay on tau and other proteins' structure/degradation [48, 49]. The postmortem delay in human brain samples usually ranges from around 2 hours to several days—a fact that should be taken into consideration when establishing relationships regarding tau phosphorylation and its impact on the development of AD. Our results come from the analysis of samples with very low postmortem intervals, minimizing the possible effects of tau degradation

(see Table 1) thereby avoiding biased antibody recognition results.

Although PHF assembly is phospho-tau dependent, this tau modification does not necessarily have to be harmful. For example, it has been described that tau phosphorylation occurs naturally in hibernating mammals and is a non-pathological, reversible event [50]. The sequence recognized by AT100 and pS396 antibodies is conserved in human and in Syrian hamster—a small mammal with the capacity to hibernate under adverse conditions [51], which suggests that these phosphorylations could also be reversed in AD cases. In others studies, it has been described that phosphorylation of tau on threonine 205 may have a protective role by preventing A β -induced excitotoxicity [52] and that serine 305 phosphorylation inhibits tau aggregation [53]. In addition, *in vitro* experiments revealed that phosphorylation of threonine 212 may inhibit the toxic aggregation of tau [23]. Finally, it has been shown that tau phosphorylation at sites 202/205 alone is not sufficient to promote dendritic spine degeneration in human pyramidal neurons from AD cases [54].

The development of neuronal cytopathology in AD reveals an interesting relationship: tau phosphorylation seems to sequentially advance from the N-terminal to the C-terminal domain, as illustrated in Fig. 4. We also highlight that tau phosphorylation, in the N-terminal or proline-rich regions, inhibits PHF formation and prevails during the early stages,

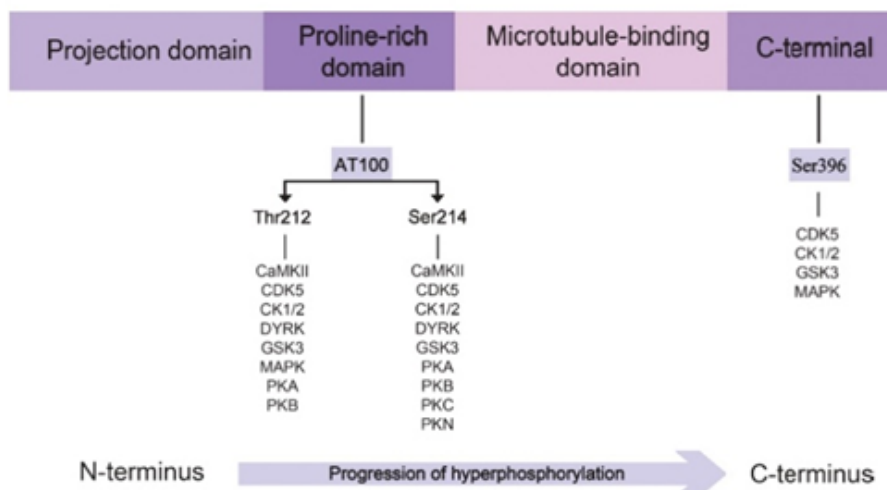


Fig. 4. Direction of the progression of tau protein hyperphosphorylation. The proline-rich domain contains the epitope which is recognized by the AT100 antibody, whereas pS396 antibody recognizes the C-terminal region. Specific kinases phosphorylating each residue are illustrated. A blue arrow highlights the sequential tau hyperphosphorylation from the N-terminal to the C-terminal.

whereas phosphorylation in the C-terminal is associated with PHF assembly and is the dominating feature during the late stages of the disease.

Conclusions

Our work represents a step forward in the understanding of NFT development and the progression of AD. We have characterized, using double immunofluorescence techniques, the staining of a proline rich region directed phospho-tau antibody (epitope AT100) and a C-terminal directed phospho-tau antibody (pS396). Our findings revealed that the AT100/pS396 ratio and the colocalization between these two phospho-tau markers decreases along with the severity of the disease in CA1, a hippocampal region linked to memory consolidation. This result may indicate that a conformational change in the tau protein hides the recognition site for the AT100 epitope during the late stages of the disease. As tau phosphorylation in the N-terminal or proline-rich regions inhibits PHF formation, this possible structural change could favor the aggregation of toxic tau and cell death.

In view of our results, the analysis of the CA1 region using double immunostaining with AT100 and anti-pS396 antibodies could provide more clues to correlate the tau phosphorylation pattern with the progression of AD.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Carmen Álvarez, Miriam Marín, and Lorena Valdés for their helpful technical assistance. We are grateful to Alberto Rábano for his help determining the Braak Stage of the human brain cases. We also would like to thank the patients and their families for their invaluable contributions to AD research.

This work was supported by grants from the following entities: the Spanish *Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades* (Grants SAF 2015-66603-P and Cajal Blue Brain Project, Spanish partner of the Blue Brain Project initiative from EPFL, Switzerland to JDF and Grant BFU 2016-77885-P to JA and FH), *Comunidad de Madrid* (S2017/BMD-3700) to JA and FH, *Centro de Investigación Biomédica en Red sobre Enfermedades Neurodegenerativas* (CIBERNED, Spain, CB06/05/0066) and the Alzheimer's Association (ZEN-15-321663) to JDF.

Authors' disclosures available online (<https://www.j-alz.com/manuscript-disclosures/18-1263r1>).

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The supplementary material is available in the electronic version of this article: <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-181263>.

REFERENCES

- [1] Dickerson BC, Eichenbaum H (2010) The episodic memory system: neurocircuitry and disorders. *Neuropsychopharmacology* **35**, 86-104.
- [2] Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT (2011) Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **1**, a006189.
- [3] Bird CM, Burgess N (2008) The hippocampus and memory: insights from spatial processing. *Nat Rev Neurosci* **9**, 182-194.
- [4] Scoville WB, Milner B (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **20**, 11-21.
- [5] Zola-Morgan S, Squire LR, Amaral DG (1986) Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. *J Neurosci* **6**, 2950-2967.
- [6] Basu J, Siegelbaum SA (2015) The corticohippocampal circuit, synaptic plasticity, and memory. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a021733.
- [7] van Strien NM, Cappaert NL, Witter MP (2009) The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal-hippocampal network. *Nat Rev Neurosci* **10**, 272-282.
- [8] West MJ, Kawas CH, Stewart WF, Rudow GL, Troncoso JC (2004) Hippocampal neurons in pre-clinical Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **25**, 1205-1212.
- [9] Andrade-Moraes CH, Oliveira-Pinto AV, Castro-Fonseca E, da Silva CG, Guimaraes DM, Szczupak D, Parente-Bruno DR, Carvalho LR, Polichiso L, Gomes BV, Oliveira LM, Rodriguez RD, Leite RE, Ferretti-Rebustini RE, Jacob-Filho W, Pasqualucci CA, Grinberg LT, Lent R (2013) Cell number changes in Alzheimer's disease relate to dementia, not to plaques and tangles. *Brain* **136**, 3738-3752.
- [10] Scheff SW, Price DA, Schmitt FA, Mufson EJ (2006) Hippocampal synaptic loss in early Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* **27**, 1372-1384.
- [11] Hyman BT, Van Hoesen GW, Damasio AR (1990) Memory-related neural systems in Alzheimer's disease: an anatomic study. *Neurology* **40**, 1721-1730.
- [12] Terry RD, Masliah E, Salmon DP, Butters N, DeTeresa R, Hill R, Hansen LA, Katzman R (1991) Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is

- the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol* **30**, 572-580.
- [13] Li H, Jia X, Qi Z, Fan X, Ma T, Pang R, Ni H, Li CR, Lu J, Li K (2018) Disrupted functional connectivity of cornu ammonis subregions in amnesic mild cognitive impairment: a longitudinal resting-state fMRI study. *Front Hum Neurosci* **12**, 413.
- [14] Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, Castellani RJ, Crain BJ, Davies P, Del Tredici K, Duyckaerts C, Frosch MP, Haroutunian V, Hof PR, Hulette CM, Hyman BT, Iwatsubo T, Jellinger KA, Jicha GA, Kovari E, Kukull WA, Leverenz JB, Love S, Mackenzie IR, Mann DM, Masliah E, McKee AC, Montine TJ, Morris JC, Schneider JA, Sonnen JA, Thal DR, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Wisniewski T, Woljter RL, Beach TG (2012) Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol* **71**, 362-381.
- [15] Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* **82**, 239-259.
- [16] Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW (1975) A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 1858-1862.
- [17] Ittner A, Ittner LM (2018) Dendritic tau in Alzheimer's disease. *Neuron* **99**, 13-27.
- [18] Brelstaff J, Tolkovsky AM, Ghetti B, Goedert M, Spillantini MG (2018) Living neurons with tau filaments aberrantly expose phosphatidylserine and are phagocytosed by microglia. *Cell Rep* **24**, 1939-1948 e1934.
- [19] Eftekharzadeh B, Daigle JG, Kapinos LE, Coyne A, Schiantarelli J, Carlomagno Y, Cook C, Miller SJ, Dujardin S, Amaral AS, Grima JC, Bennett RE, Tepper K, DeTure M, Vanderburgh CR, Corjuc BT, DeVos SL, Gonzalez JA, Chew J, Vidensky S, Gage FH, Mertens J, Troncoso J, Mandelkew E, Salvatella X, Lim RYH, Petrucelli L, Wegmann S, Rothstein JD, Hyman BT (2018) Tau protein disrupts nucleocytoplasmic transport in Alzheimer's disease. *Neuron* **99**, 925-940 e927.
- [20] Iqbal K, Liu F, Gong CX (2016) Tau and neurodegenerative disease: the story so far. *Nat Rev Neurol* **12**, 15-27.
- [21] Hanger DP, Anderton BH, Noble W (2009) Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol Med* **15**, 112-119.
- [22] Illenberger S, Zheng-Fischhofer Q, Preuss U, Stamer K, Baumann K, Trinczek B, Biernat J, Godemann R, Mandelkew EM, Mandelkew E (1998) The endogenous and cell cycle-dependent phosphorylation of tau protein in living cells: implications for Alzheimer's disease. *Mol Biol Cell* **9**, 1495-1512.
- [23] Schneider A, Biernat J, von Bergen M, Mandelkew E, Mandelkew EM (1999) Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments. *Biochemistry* **38**, 3549-3558.
- [24] Zheng-Fischhofer Q, Biernat J, Mandelkew EM, Illenberger S, Godemann R, Mandelkew E (1998) Sequential phosphorylation of Tau by glycogen synthase kinase-3beta and protein kinase A at Thr212 and Ser214 generates the Alzheimer-specific epitope of antibody AT100 and requires a paired-helical-filament-like conformation. *Eur J Biochem* **252**, 542-552.
- [25] Augustinack JC, Schneider A, Mandelkew EM, Hyman BT (2002) Specific tau phosphorylation sites correlate with severity of neuronal cytopathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **103**, 26-35.
- [26] Goedert M, Jakes R, Vanmechelen E (1995) Monoclonal antibody AT8 recognises tau protein phosphorylated at both serine 202 and threonine 205. *Neurosci Lett* **189**, 167-169.
- [27] Braak E, Braak H, Mandelkew EM (1994) A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads. *Acta Neuropathol* **87**, 554-567.
- [28] Bertrand J, Plouffe V, Senechal P, Leclerc N (2010) The pattern of human tau phosphorylation is the result of priming and feedback events in primary hippocampal neurons. *Neuroscience* **168**, 323-334.
- [29] Kimura T, Ono T, Takamatsu J, Yamamoto H, Ikegami K, Kondo A, Hasegawa M, Ihara Y, Miyamoto E, Miyakawa T (1996) Sequential changes of tau-site-specific phosphorylation during development of paired helical filaments. *Dementia* **7**, 177-181.
- [30] Su JH, Cummings BJ, Cotman CW (1994) Early phosphorylation of tau in Alzheimer's disease occurs at Ser-202 and is preferentially located within neurites. *Neuroreport* **5**, 2358-2362.
- [31] Braak H, Alafuzoff I, Arzberger T, Kretschmar H, Del Tredici K (2006) Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol* **112**, 389-404.
- [32] Mondragon-Rodriguez S, Perry G, Luna-Munoz J, Acevedo-Aquino MC, Williams S (2014) Phosphorylation of tau protein at sites Ser(396-404) is one of the earliest events in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neuropathol Appl Neurobiol* **40**, 121-135.
- [33] Fasulo L, Ugolini G, Visintin M, Bradbury A, Brancolini C, Verzillo V, Novak M, Cattaneo A (2000) The neuronal microtubule-associated protein tau is a substrate for caspase-3 and an effector of apoptosis. *J Neurochem* **75**, 624-633.
- [34] Luna-Munoz J, Chavez-Macias L, Garcia-Sierra F, Mena R (2007) Earliest stages of tau conformational changes are related to the appearance of a sequence of specific phospho-dependent tau epitopes in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **12**, 365-375.
- [35] Steinhilb ML, Dias-Santagata D, Fulga TA, Felch DL, Feany MB (2007) Tau phosphorylation sites work in concert to promote neurotoxicity in vivo. *Mol Biol Cell* **18**, 5060-5068.
- [36] Smith PJ, Wiltshire M, Davies S, Patterson LH, Hoy T (1999) A novel cell permeant and far red-fluorescing DNA probe, DRAQ5, for blood cell discrimination by flow cytometry. *J Immunol Methods* **229**, 131-139.
- [37] Maeda S, Sahara N, Saito Y, Murayama M, Yoshiike Y, Kim H, Miyasaka T, Murayama S, Ikai A, Takashima A (2007) Granular tau oligomers as intermediates of tau filaments. *Biochemistry* **46**, 3856-3861.
- [38] Chang XL, Tan MS, Tan L, Yu JT (2016) The role of TDP-43 in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* **53**, 3349-3359.
- [39] Furcila D, DeFelipe J, Alonso-Nanclares L (2018) A study of amyloid-beta and phosphotau in plaques and neurons in the hippocampus of Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis* **64**, 417-435.
- [40] Ferrer I (2012) Defining Alzheimer as a common age-related neurodegenerative process not inevitably leading to dementia. *Prog Neurobiol* **97**, 38-51.
- [41] Neddens J, Temmel M, Flunkert S, Kerschbaumer B, Hoeller C, Loeffler T, Niederkofler V, Daum G, Attems J, Hutter-Paier B (2018) Phosphorylation of different tau sites during progression of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* **6**, 52.

- [42] Jeganathan S, von Bergen M, Bruttach H, Steinhoff HJ, Mandelkow E (2006) Global hairpin folding of tau in solution. *Biochemistry* **45**, 2283-2293.
- [43] Jeganathan S, Hascher A, Chinnathambi S, Biemat J, Mandelkow EM, Mandelkow E (2008) Proline-directed pseudo-phosphorylation at AT8 and PHF1 epitopes induces a compaction of the paperclip folding of Tau and generates a pathological (MC-1) conformation. *J Biol Chem* **283**, 32066-32076.
- [44] Garcia-Sierra F, Ghoshal N, Quinn B, Berry RW, Binder LI (2003) Conformational changes and truncation of tau protein during tangle evolution in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **5**, 65-77.
- [45] Yoshida H, Goedert M (2006) Sequential phosphorylation of tau protein by cAMP-dependent protein kinase and SAPK4/p38delta or JNK2 in the presence of heparin generates the AT100 epitope. *J Neurochem* **99**, 154-164.
- [46] Ksiezak-Reding H, Pyo HK, Feinstein B, Pasinetti GM (2003) Akt/PKB kinase phosphorylates separately Thr212 and Ser214 of tau protein *in vitro*. *Biochim Biophys Acta* **1639**, 159-168.
- [47] Woods YL, Cohen P, Becker W, Jakes R, Goedert M, Wang X, Proud CG (2001) The kinase DYRK phosphorylates protein-synthesis initiation factor eIF2Bepsilon at Ser539 and the microtubule-associated protein tau at Thr212: potential role for DYRK as a glycogen synthase kinase 3-priming kinase. *Biochem J* **355**, 609-615.
- [48] Gartner U, Janke C, Holzer M, Vanmechelen E, Arendt T (1998) Postmortem changes in the phosphorylation state of tau-protein in the rat brain. *Neurobiol Aging* **19**, 535-543.
- [49] Gonzalez-Riano C, Tapia-Gonzalez S, Garcia A, Munoz A, DeFelipe J, Barbas C (2017) Metabolomics and neuroanatomical evaluation of post-mortem changes in the hippocampus. *Brain Struct Funct* **222**, 2831-2853.
- [50] Arendt T, Stieler J, Strijkstra AM, Hut RA, Rudiger J, Van der Zee EA, Harkany T, Holzer M, Hartig W (2003) Reversible paired helical filament-like phosphorylation of tau is an adaptive process associated with neuronal plasticity in hibernating animals. *J Neurosci* **23**, 6972-6981.
- [51] Leon-Espinosa G, Garcia E, Garcia-Escudero V, Hernandez F, DeFelipe J, Avila J (2013) Changes in tau phosphorylation in hibernating rodents. *J Neurosci Res* **91**, 954-962.
- [52] Ittner A, Chua SW, Bertz J, Volkerling A, van der Hoven J, Gladbach A, Przybyla M, Bi M, van Hummel A, Stevens CH, Ippati S, Suh LS, Macmillan A, Sutherland G, Kril JJ, Silva AP, Mackay JP, Poljak A, Delerue F, Ke YD, Ittner LM (2016) Site-specific phosphorylation of tau inhibits amyloid-beta toxicity in Alzheimer's mice. *Science* **354**, 904-908.
- [53] Strang KH, Sorrentino ZA, Riffe CJ, Gorion KM, Vijayaraghavan N, Golde TE, Giasson BI (2018) Phosphorylation of serine 305 in tau inhibits aggregation. *Neurosci Lett* **692**, 187-192.
- [54] Merino-Serrais P, Benavides-Piccione R, Blazquez-Llorca L, Kastanauskaite A, Rabano A, Avila J, DeFelipe J (2013) The influence of phospho-tau on dendritic spines of cortical pyramidal neurons in patients with Alzheimer's disease. *Brain* **136**, 1913-1928.

