

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea



**TESIS DOCTORAL**

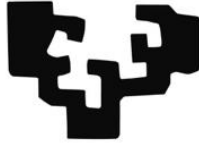
**ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES  
MOLECULARES DE LOS PROTEOGLICANOS DE  
HEPARÁN SULFATO EN LA ENFERMEDAD  
DE ALZHEIMER**

LAURA LORENTE GEA

2021



eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea



**Osakidetza**

Servicio vasco de salud

Doctorado en Medicina y Cirugía

Departamento de Anatomía Patológica

Hospital Universitario Araba

2021

# **ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES MOLECULARES DE LOS PROTEOGLICANOS DE HEPARÁN SULFATO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Director: **Iván Fernández-Vega**

Tutora: **Ariadna Besga Basterra**

Tesis doctoral presentada por Laura Lorente Gea





*Somos parte de la tierra y asimismo  
ella es parte de nosotros.*

*Las flores perfumadas son nuestras hermanas;  
el venado, el caballo, la gran águila;  
estos son nuestros hermanos.*

*Las escarpadas peñas, los húmedos prados,  
el calor del cuerpo del caballo y el hombre,*

*todos pertenecemos a la misma familia.*

Noah Sealh, 1854.



*Hegoak ebaki banizkio  
Nerea izango zen,  
Ez zuen aldegingo.  
Hegoak ebaki banizkio  
Nerea izango zen,  
Ez zuen aldegingo.*

*Bainan, honela  
Ez zen gehiago txoria izango  
Bainan, honela  
Ez zen gehiago txoria izango*

*Eta nik...  
Txoria nuen maite.*

*Eta nik...  
Txoria nuen maite.*

Mikel Laboa, 1974



## AGRADECIMIENTOS

*A mis abuelos, Lola y Ginés.  
A mi madre. A mi padre.*

*A Iván Fernández Vega, por ofrecerme esta gran oportunidad  
y ver escaleras donde yo veía montañas.*

*A Isabel Guerra, por ser el viento que empujaba mis alas  
durante los años de residencia.*

*A Amaia Sagasta, por tantas y tantas cosas  
que no cabrían en dos líneas.*



# ÍNDICE DE CONTENIDO

---

Índice de tablas.....	III
Índice de figuras.....	V
Abreviaturas .....	VII
1. Introducción.....	1
1.1. Enfermedad de alzheimer.....	3
1.1.1. Definición .....	3
1.1.2. Contextualización histórica. ....	4
1.1.3. Epidemiología .....	4
1.1.4. Manifestaciones clínicas por estadios .....	6
1.1.5. Aproximación diagnóstica .....	9
1.1.6. Tratamiento.....	9
1.2. Etiopatogenia .....	10
1.2.1. Principales hipótesis vigentes:.....	10
1.2.2. Factores de riesgo .....	12
1.3. Histopatología.....	15
1.3.1. Amiloide en la EA .....	16
1.3.2. Proteína Tau en la EA.....	19
1.3.3. Progresión de las lesiones.....	20
1.4. Proteoglicanos y glicosaminoglicanos .....	22
1.4.1. Proteoglicanos de heparán sulfato .....	25
1.4.2. Funciones del HS.....	29
1.4.3. Papel fisiológico del HS .....	30
1.4.4. Patología .....	31
2. Hipótesis y objetivos .....	35
2.1. Hipótesis.....	37
2.2. Objetivos .....	37
3. Marco teórico y herramientas metodológicas .....	39
3.1. Material y métodos.....	41
3.1.1. Selección de pacientes y muestras .....	41
3.1.2. Materiales .....	42
3.1.3. Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa (qrt-PCR)..	44
3.1.4. Análisis de los datos .....	46
3.1.5. Inmunohistoquímica .....	46
3.1.6. Evaluación de inmunohistoquímica .....	46
4. Capítulo I.....	47
Estudio de la expresión de las heparanasas en cerebros con enfermedad de alzheimer .....	47
4.1. Introducción .....	49
4.2. Resultados .....	50
4.2.1. Análisis de la expresión diferencial de los genes .....	50

4.3. Discusión .....	53
4.4. Perspectiva .....	56
5. Capítulo II .....	59
Estudio de la expresión de los proteoglicanos de heparán sulfato en cerebros con enfermedad de alzheimer .....	59
5.1. Introducción .....	61
5.1.1. HSPG de superficie celular .....	61
5.1.2. HSPG de MEC .....	62
5.1.3. HSPGs "a tiempo parcial" .....	64
5.2. Resultados .....	66
5.2.1. Análisis de la expresión diferencial de los genes .....	66
5.3. Discusión .....	74
5.4. Perspectiva .....	79
6. Conclusiones .....	81
7. Referencias bibliograficas.....	85
8. Anexos .....	123
Anexo 1: Artículo publicado correspondiente al Capítulo I .....	125
Anexo 2: Artículo publicado correspondiente al Capítulo II .....	133

# ÍNDICE DE TABLAS

---

Tabla 1. Tipos de PGs de HS .....	26
Tabla 2. Datos de las muestras empleadas para la realización del trabajo. EA Leve: estadios I y II de Braak y Braak; EA Moderada: estadios III y IV de Braak y Braak; EA Severa: estadios V y VI de Braak y Braak .....	41
Tabla 3. Zonas analizadas en las muestras recogidas .....	42
Tabla 4. Oligonucleótidos directos y reversos utilizados y características de los amplicones obtenidos .....	45





# ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1. Diferencias clínicas entre paciente con EA y persona de edad avanzada. .	3
Figura 2. Alois Alzheimer (1864-1915). .....	4
Figura 3. Distribución de demencias en una muestra poblacional .....	5
Figura 4. Algoritmo diagnóstico de la EA desde el primer síntoma .....	8
Figura 5. Hipótesis inicial de la cascada amiloidea .....	11
Figura 6. Principales características histopatológicas de la EA .....	15
Figura 7. Procesamiento de la APP y productos de escisión .....	17
Figura 8. Mecanismo de producción, degradación y deposición de A $\beta$ en las arterias de la corteza. ....	18
Figura 9. Representación de la distribución de PS y de ONFs intra y extracelulares en tejido cerebral .....	20
Figura 10. Evolución espacio temporal de las lesiones en relación con el estadio de Braak & Braak (IHQ para tau hiperfosforilada en regiones representativas de la fase identificando ONFs) y la clasificación de Thal .....	21
Figura 11. Estructura de los PGs. ....	22
Figura 12. Estructura de los Glicosaminoglicanos. ....	23
Figura 13. Procesos fisiológicos y patológicos de los HSPGs. ....	29
Figura 14. Transcripción diferencial de HPSE y HPSE 2 en la EA. ....	51
Figura 15. Tinción IHQ de HPSE en la EA .....	52
Figura 16. Tinción IHQ de HPSE 2 en la EA .....	52
Figura 17. Transcripción diferencial de SDCs (1-4) en casos de EA .....	67
Figura 18. Tinción IHQ de los SDCs 1 y 4 en neocórtex (lóbulo temporal) en casos de EA. ....	68
Figura 19. Transcripción diferencial de GPCs (1-6) en casos de EA .....	69
Figura 20. Tinción IHQ de GPCs 4 y 6 en el neocórtex (lóbulo temporal) en casos de EA .....	71
Figura 21. Transcripción diferencial de agrina, colágeno XVIII y PRCAN en casos de EA .....	72
Figura 22. Transcripción diferencial de CD44v3, neuropilina, serglicina y TGFBR3 en casos de EA .....	73
Figura 23. Tinción IHQ de neuropilina y SRGN en la neocorteza cerebral (lóbulo temporal) en casos de EA .....	74



# ABREVIATURAS

---

<b>aa:</b> Aminoácido	<b>PPA:</b> Proteína precursora de amiloide
<b>ACT:</b> Actina	<b>PRCAN:</b> Perlecano
<b>PCR:</b> Reacción en cadena de la polimerasa	<b>PS:</b> Placa senil
<b>AGRN:</b> Agrina	<b>PSEN:</b> Presenilina
<b>PG:</b> Proteoglicano	<b>EA:</b> Enfermedad de Alzheimer
<b>ApoE:</b> Apolipoproteína E	<b>GlcNAc:</b> N-acetilglucosamina
<b>AT:</b> Antitrombina	<b>SDC:</b> Sindecano
<b>A<math>\beta</math>:</b> beta-amiloide	<b>SRGN:</b> Serglicina
<b>BHE:</b> Barrera hematoencefálica	<b>HPSE:</b> heparanasa
<b>AAC:</b> angiopatía amiloidea congofílica o cerebral	<b>TGF<math>\beta</math>:</b> Factor de crecimiento transformante beta
<b>CS:</b> Condroitín sulfato	<b>MEC:</b> Matriz extracelular
<b>dNTPs:</b> Desoxinucleótidos trifosfatos	<b>KS:</b> Keratán sulfato
<b>Gal:</b> Galactosa	<b>NA/NS:</b> dominios N-acetilados/ N-sulfatados
<b>GAG:</b> Glicosaminoglicano	<b>FGF:</b> Factor de crecimiento de fibroblastos
<b>NS:</b> dominios N-sulfatados	<b>qRT-PCR:</b> reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real
<b>Gal:</b> Galactosa	<b>RT polimerasa:</b> Polimerasa de transcripción inversa
<b>ONFs:</b> Ovillos neurofibrilares	<b>GlcA:</b> Ácido glucurónico
<b>ONF-I:</b> Ovillo neurofibrilar intracelular	<b>IdoA:</b> Ácido idurónico
<b>ONF-E:</b> Ovillo neurofibrilar extracelular	<b>IHQ:</b> Inmunohistoquímica
<b>MMSE:</b> Mini Examen del Estado Mental (del inglés Mini-mental state examination)	



# 1. INTRODUCCIÓN

---



## 1.1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

### 1.1.1. Definición

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa primaria cortical caracterizada por una pérdida cognitiva y funcional gradual, progresiva e irreversible que desencadena la muerte de la persona. Debido al gran envejecimiento de las sociedades occidentales, se atribuye a la EA como una de las enfermedades de mayor crecimiento epidemiológico en los últimos años en esos territorios (Savva *et al.*, 2009). No obstante, la EA no se puede considerar parte del proceso normal de envejecimiento pues está ligada a sustratos moleculares, fisiológicos y genéticos que consideraremos en detalle en los próximos capítulos (Figura 1).

A pesar de los grandes avances en la comprensión de la EA desde la descripción del primer caso por Alois Alzheimer en 1907, esta patología supone uno de los mayores retos de salud del siglo XXI. Sin duda, la EA influye en numerosas esferas y es que no sólo es un problema sanitario, sino que afecta también al ámbito social y económico de las familias y de las instituciones.

ENFERMO DE ALZHEIMER	PERSONA DE EDAD AVANZADA
- Olvida situaciones completas	- Olvida detalles de una situación
- Raramente recuerda más tarde	- Con frecuencia recuerda más tarde
- Gradualmente le es imposible seguir indicaciones orales o escritas	- Generalmente puede seguir indicaciones orales o escritas
- Gradualmente le es imposible usar notas para recordar	- Generalmente puede usar notas para recordar
- Gradualmente le es imposible cuidarse a sí mismo	- Generalmente puede cuidarse a sí mismo

**Figura 1. Diferencias clínicas entre paciente con EA y persona de edad avanzada.**

### 1.1.2. Contextualización histórica.

Los antiguos griegos y romanos asociaron la vejez con la demencia otorgándole tintes de persona débil y, asumiendo, que las personas fuertes no podrían desarrollarla (Berchtold & Cotman, 1998). Durante cientos de años, esta patología era conocida pero no correctamente tipificada. No fue hasta 1901 cuando el psiquiatra alemán Alois Alzheimer (Figura 2) identificó el primer caso de lo que se conoce hoy como EA en una mujer de 51 años, llamada Auguste Deter. El 9 de abril de 1906, Alzheimer recibió una llamada de Fráncfort donde le comunicaban que Auguste había fallecido. Pidió que le enviaran su historial clínico y su cerebro para ser estudiado. Su historia clínica documentaba sus últimos años de vida, cuando su condición se había deteriorado considerablemente. Examinando su cerebro, Alois encontró placas seniles (PS) y ovillos neurofibrilares (ONFs), siendo en este momento cuando se reporta públicamente por primera vez el caso y se describen dichos hallazgos.



**Figura 2. Alois Alzheimer (1864-1915).**

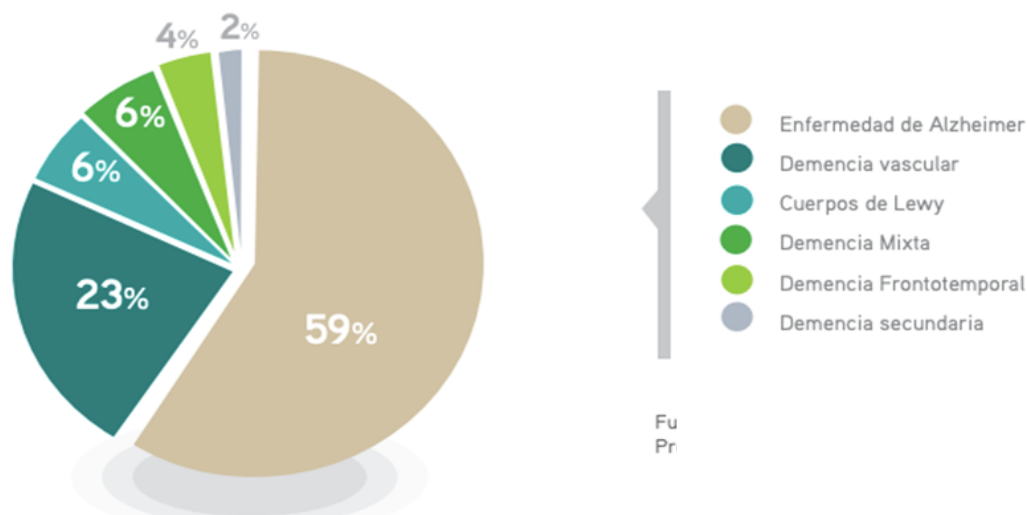
### 1.1.3. Epidemiología

La EA es la principal causa de demencia en todo el mundo (Scheltens *et al.*, 2016). Así, la prevalencia se sitúa entre el 5 y el 7% siendo mayor en zonas de América Latina (8,5%), y menor en las regiones de África subsahariana (2-4%). Se estima que existen unos 35.6 millones de personas que viven con demencia en todo el mundo, aunque para el año 2030 se espera que esta cifra sea casi el doble (Prince *et al.*, 2013).



En Estados Unidos, la EA es la enfermedad neurodegenerativa más común y la sexta causa de muerte (Apostolova, 2016). En Europa, la prevalencia de esta patología fue de 5,05% de forma global para el año 2016. La prevalencia por sexo, en los hombres y las mujeres fue 3,31% y 7,13% respectivamente, y se encontró una tendencia creciente por grupos de edad. La incidencia de EA en Europa fue de 11,08 por 1.000 personas-año, siendo en los hombres y las mujeres de 7,02 por 1.000 personas-año y de 13,25 por 1.000 personas-año respectivamente, con igual tendencia creciente con el aumento de la edad (Niu *et al.*, 2017). En España se estima una prevalencia de entre 500.000 y 800.000 pacientes. La Confederación Española de Asociaciones de Familiares de Personas con Alzheimer y otras Demencias (CEAFA) apunta a unos 800.000 enfermos.

Dentro de las demencias, la EA es la más frecuente y aproximadamente el 59% de las demencias diagnosticadas son DTA (Demencia tipo Alzheimer), seguidas por las demencias vasculares y mixtas, demencia por cuerpos de Lewy y demencia frontotemporal (de Pedro-Cuesta *et al.*, 2009) (Figura 3). Se estima que, debido al envejecimiento de la población española, el número de diagnósticos de esta patología podría triplicarse en los próximos 30 o 40 años (proyecciones de población elaboradas por el Instituto Nacional de estadística).



**Figura 3. Distribución de demencias en una muestra poblacional.** (Fuente: Frades *et al.*, 2013).

#### 1.1.3.1. ¿Cambio de tendencia?

Pese a todo lo anteriormente referenciado, aunque la prevalencia siga aumentando por el envejecimiento de la población, se ha descrito recientemente una disminución del 16% de la incidencia de EA cada década y en los países preferentemente desarrollados, desde 1988 (Wolters *et al.*, 2020).

Aunque este descenso está bien documentado, las causas siguen siendo desconocidas (Knopman, 2020). Las principales hipótesis apuntan a una mejora en el manejo de los factores de riesgo asociados a demencias. Así, en un estudio publicado al respecto, se describe que modificar una docena de factores de riesgo puede evitar o retrasar el 40% de las demencias. Las 12 variables estudiadas fueron la falta de educación, la hipertensión, la discapacidad auditiva, el tabaquismo, la obesidad, la depresión, la inactividad física, la diabetes, el aislamiento social, el consumo excesivo de alcohol, los golpes en la cabeza y la contaminación atmosférica (Livingston *et al.*, 2020). Tanto es así que, en América Latina, según los mismos autores, el porcentaje prevenible de casos de demencia alcanzaría el 56% (Mukadam *et al.*, 2019).

#### 1.1.4. Manifestaciones clínicas por estadios

##### 1.1.4.1. Presentaciones típicas de AD

La EA tiene dos estadios bien diferenciados: el definido como estadio preclínico, antes de que se manifiesten los primeros síntomas, y el estadio clínico (Scheltens *et al.*, 2021).

Al estadio preclínico se le ha denominado también "silente". Es el estadio en el cual se ha demostrado a nivel histopatológico que el cerebro contiene placas neuríticas con depósitos de  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) así como la presencia en las neuronas de (ONFs), pero el paciente no muestra ningún síntoma característico de la enfermedad. Según la literatura, este periodo puede durar aproximadamente 10 años hasta que se manifieste el primer síntoma. Grandes esfuerzos se están depositando en la comprensión de esta fase de cara a realizar el diagnóstico de la forma más precoz posible. Se debería hacer hincapié en esta fase en controlar los factores de riesgo cardiovascular (hipertensión arterial, diabetes mellitus, dieta, tabaquismo...) ya que se conoce la estrecha relación entre ellos y las lesiones del sustrato anatómico cerebral, pudiendo precipitar la evolución en personas genéticamente predispuestas. Así mismo, es de vital importancia llevar a cabo programas de ejercicio físico y mental, para ralentizar la evolución todo lo posible en esta fase precoz de la enfermedad (Dubois *et al.*, 2016).

El estadio clínico da comienzo con la aparición del primer síntoma de la enfermedad (Figura 4). Este estadio se divide a su vez en tres fases:

- Fase leve (3-4 años de duración): La manifestación temprana más común de la EA es la pérdida de memoria reciente. La memoria antigua suele conservarse, aunque se verá afectada a lo largo de la evolución natural de la enfermedad. También es frecuente observar alteraciones en el lenguaje, como por ejemplo dificultad a la hora de encontrar las palabras exactas de aquello a lo que se quiere hacer

referencia. Poco después se observa dificultad afrontando procesos multitarea con la subsecuente pérdida de confianza y autoestima. Además, su carácter va cambiando: el paciente se vuelve esquivo o depresivo, porque se da cuenta de sus pérdidas y se siente frágil y vulnerable. Es comprensible que, en esta fase, el paciente rara vez acuda al médico por voluntad propia.

- Fase moderada (2-3 años): Se vuelve evidente el déficit cognitivo. El paciente deja de ser consciente de su entorno, no reconociendo a sus familiares y/o amigos. Aparece la desorientación temporoespacial y el vocabulario empieza a ser escaso en palabras, lento e impreciso. El paciente ya no es consciente de sus propios fallos, no comprendiendo las situaciones que le acontecen. Por lo tanto, su comportamiento será impredecible y ya no podrá salir solo a la calle. El paso de una fase a la otra puede estar desencadenado por algún hecho relevante (una infección de orina, un cambio de domicilio, de cuidador...). A partir de esta fase, el responsable del paciente debe hacerse cargo de tomar las decisiones por él.
- Fase avanzada (2-3 años): Es el estado más grave al cual se llega con muy poca actividad cognitiva y sin capacidades motoras ni control de esfínteres. En este momento, la dependencia es total y absoluta. Suele ser un paciente encamado todo el día que no reacciona a ningún estímulo y con severas dificultades para la ingesta de alimentos. En este estadio surgen múltiples complicaciones como riesgo de neumonía por aspiración, malnutrición y las derivadas de la inmovilización prolongada: trombosis venosa profunda, infecciones o úlceras por presión.

La muerte sobreviene, de media, unos 8,5 años después del diagnóstico inicial de EA (Jost & Grossberg, 1995).

#### 1.1.4.2. Presentaciones atípicas de AD

Existen variantes y formas de presentación atípicas que normalmente hacen referencia a la presentación de síntomas no relacionados con la memoria pero que, tanto en escalas de EA como en estudios postmórtem, son compatibles con este diagnóstico. Se suelen dar en pacientes más jóvenes y la progresión suele ser más rápida.

- AFASIA LOGOPÉNICICA: En este subtipo destaca una presentación con pausas prominentes a la hora de encontrar las palabras, discapacidad en la memoria de trabajo y anomia (Gorno-Tempini *et al.*, 2011).
- VARIANTE FRONTAL DE AD: Se denomina así a la presentación en forma de cambios bruscos y precoces de la personalidad, el comportamiento y las funciones ejecutivas. Estos pacientes se

muestran profundamente impacientes, irritables, impulsivos y desinhibidos. Este subtipo puede recordar, de forma cercana, a la demencia de variante frontotemporal, pero estudios de autopsia muestran marcadores de EA, con una distribución que afecta fundamentalmente a los lóbulos frontales (Herrero-San Martín *et al.*, 2013).

- **ATROFIA CORTICAL POSTERIOR:** Presentación con disfunción visoespacial, agnosia visual aperceptiva y desorientación espacial. Estos pacientes frecuentemente desarrollan apraxias de construcción, vestido o ideomotoras antes que los trastornos de memoria. A nivel anatomopatológico, los depósitos de TAU y la atrofia se focalizan, al menos inicialmente, en los lóbulos parieto-occipitales (Crutch *et al.*, 2012).

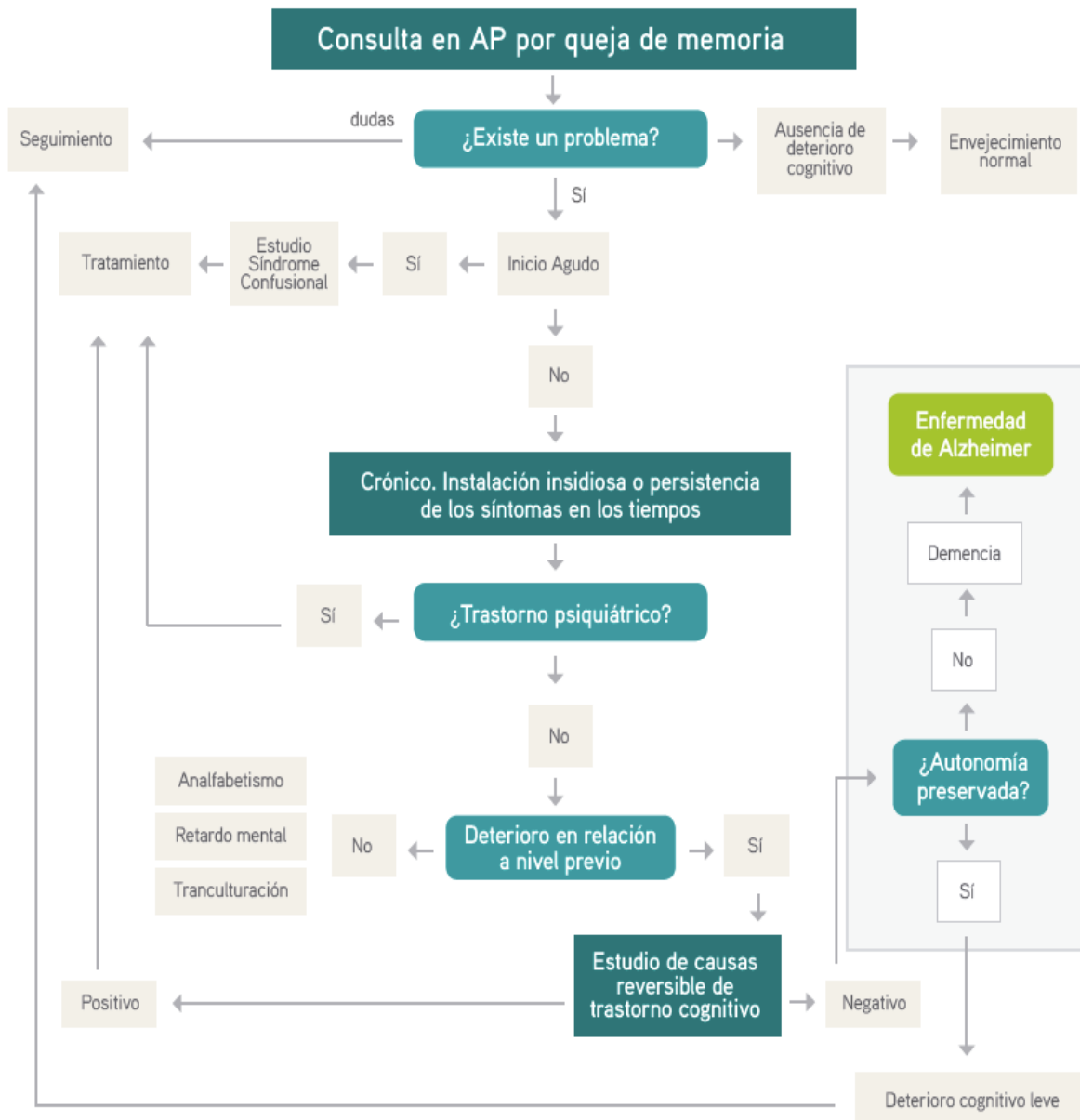


Figura 4. Algoritmo diagnóstico de la EA desde el primer síntoma.

### 1.1.5. Aproximación diagnóstica

El sostén principal del diagnóstico de la EA continúa siendo la valoración clínica, basada en dos pilares: la entrevista con el paciente o bien un cuidador, y un examen cognitivo y físico orientado a esta patología. El resto de técnicas se consideran complementarias y dirigidas a corroborar o no el diagnóstico. Hoy en día no existe ninguna prueba específica para diagnosticar una demencia en estadio preclínico, por lo que son de obligado uso las pruebas complementarias orientadas a descartar otros procesos que pudieran mimetizar o solaparse en síntomas a una demencia. (Slachevsky & Oyarzo, 2008).

### 1.1.6. Tratamiento

No existe un tratamiento definitivo para detener o erradicar la EA. De forma paliativa se utilizan algunos fármacos para el control de síntomas asociados, incluyendo inhibidores de la colinesterasa, antidepresivos y antipsicóticos. Por otro lado, desde hace unas décadas es objeto de estudio una amplia serie de tratamientos experimentales, como fármacos moduladores de la inmunidad, del metabolismo del colesterol y la glucosa (estatinas, antidiabéticos) y fármacos antiinflamatorios no esteroideos.

También se están realizando ensayos con fármacos modificadores de Apolipoproteína E4 (ApoE4), contra el acúmulo de A $\beta$  y Tau, e incluso, tratamientos con células madre y recambio plasmático (Boada *et al.*, 2017; Funk *et al.*, 2015; Karran, 2012; McCartney, 2015; McGeer *et al.*, 2018; Young *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2014). Finalmente, después de casi dos décadas, la FDA ha aprobado en junio de 2021 un nuevo tratamiento para la EA, el fármaco Aducanumab. Se trata de un anticuerpo monoclonal humano contra las formas agregadas de A $\beta$  tanto solubles como insolubles.

La valoración individual de cada uno de ellos no ha ofrecido resultados concluyentes por el momento. Es necesario conocer más en profundidad las bases moleculares de los fenómenos que tienen lugar durante la EA para un mejor abordaje terapéutico. Existen varios tipos de moléculas implicadas a lo largo de este proceso, incluyendo los proteoglicanos (PGs). Se ha descrito previamente la participación de los PGs en muchos procesos fisiológicos, como la inflamación, y patológicos, incluyendo algunas enfermedades neurodegenerativas como la EA. Diversos estudios detallan la interacción de los PGs con la Proteína precursora de amiloide (PPA), el A $\beta$  y la proteína Tau, y su presencia en los depósitos amiloideos y los ONFs (Shaffer *et al.*, 1995).

## 1.2. ETIOPATOGENIA

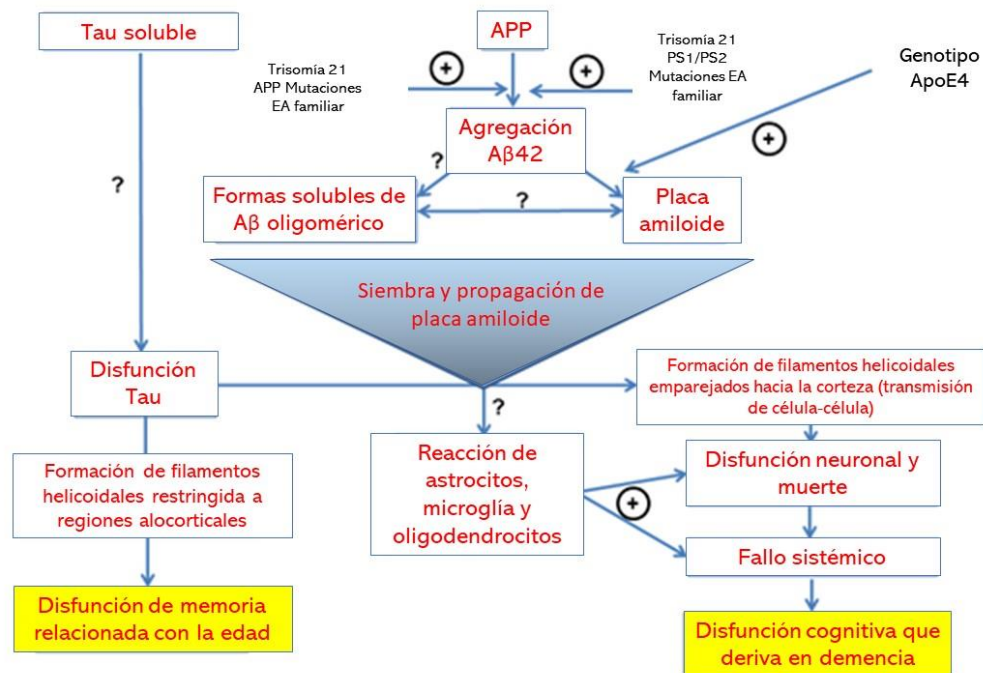
---

Las causas exactas de la enfermedad aún están siendo sometidas a investigación científica. Se han propuesto varias hipótesis y factores de riesgo potenciales.

### 1.2.1. Principales hipótesis vigentes:

- Hipótesis colinérgica. En los años 80 se propuso la primera hipótesis sobre el posible origen de la EA. El sistema colinérgico está formado por la acetilcolina (ACh) y las moléculas encargadas de su metabolismo. La ACh es uno de los neurotransmisores más importantes del organismo, produce en las neuronas y tiene efectos fundamentales en el sistema nervioso central (SNC) y periférico al interaccionar con receptores específicos. Entre sus principales funciones destaca en participar en el mantenimiento de la supervivencia neuronal y en los circuitos de aprendizaje y memoria en corteza cerebral e hipocampo. En pacientes con EA se ha visto un déficit de ACh en dichas regiones y la hipótesis colinérgica sostiene que este déficit es el causante del daño cognitivo impulsando el desarrollo de fármacos inhibidores de la enzima encargada de la eliminación de la ACh, o anticolinesterásicos para frenar la enfermedad (Coyle *et al.*, 1983; Craig *et al.*, 2011). La falta de éxito descarta esta hipótesis como causa única de la EA, aunque se siguen empleando en las estrategias paliativas. En contra de esta hipótesis también cabría señalar que se ha demostrado la implicación de otros neurotransmisores en la sintomatología de la EA y que la disminución de la ACh se debe a la destrucción de las regiones cerebrales donde se sintetiza, fundamentalmente el núcleo basal de Meynert, no ocurriendo en todos los casos con la misma magnitud (Bartus, 2000; A. V Terry & Buccafusco, 2003; Whitehouse *et al.*, 1982).
- Hipótesis de la cascada amiloidea. Esta teoría fue propuesta en 1992 por Hardy y Higgins, que sostiene que los depósitos de  $\beta$  amiloide, sobre todo A $\beta$ 42, son el elemento inicial de la enfermedad. Las PS activarían mecanismos inflamatorios, promoviendo una disfunción sináptica y generando neuritis distróficas, así como estrés oxidativo. Con el tiempo esto afectaría la homeostasis de las neuronas deteriorando la función de determinadas enzimas (fosfatasas y quinasas) e hiperfosforilando la proteína Tau, dañando así el transporte axonal y formando ONFs. El resultado final del proceso es la alteración funcional de la neurona, la muerte celular y el declive cognitivo (Figura 5) (J. A. Hardy & Higgins, 1992; LaFerla *et al.*, 2007; Small, 2008). Esta hipótesis ha recibido muchas críticas y ha sido modificada en varias ocasiones principalmente porque:

- Se ha observado en prepúberes y adultos sanos la presencia de agregados cerebrales de Tau y  $\beta$  amiloide sin repercusión clínica posterior (Armstrong, 2011; Bennett *et al.*, 2006; Heiko Braak *et al.*, 2011; Esparza *et al.*, 2013; Giannakopoulos *et al.*, 2003; Hulette *et al.*, 1998; Price & Morris, 2004).
- Se sabe que las alteraciones cognitivas están vinculadas de modo directo con la proteína Tau anómala y su acúmulo (A. D. C. Alonso *et al.*, 1997; Cárdenas *et al.*, 2012)
- La formación de las PS y ONFs es independiente y aunque ambas están relacionadas en la evolución de la EA, es posible detectarlas aisladas en otras patologías (R. D. Terry *et al.*, 1987).
- Los ONFs preceden a las placas amiloides (Price & Morris, 2004).
- La inmunización activa contra el amiloide puede disminuir su acúmulo, pero no mejora la función cognitiva (Gilman *et al.*, 2005; Green *et al.*, 2009; Nicoll *et al.*, 2006).



**Figura 5. Hipótesis inicial de la cascada amiloidea** (Traducido de Karran & De Strooper, 2016).

- Hipótesis inflamatoria. Algunas líneas de investigación defienden que la causa de la EA podría ser la respuesta inflamatoria crónica en el SNC. Los depósitos de  $\beta$  amiloide y Tau hiperfosforilada generarían una respuesta anómala del sistema inmunológico, sea por una disfunción o por su prolongación excesiva en el tiempo. Algunos autores se apoyan en la presencia de reactantes de fase aguda e infiltrados inflamatorios en las placas densas y macrófagos con amiloide fagocitado alrededor de estas placas. La terapia con



antiinflamatorios no ha ofrecido resultados significativos, de manera que no es posible concretar si la inflamación característica de la EA es causa o consecuencia (J. Hardy *et al.*, 2014; J. Hardy & Allsop, 1991; Kimura *et al.*, 1994; Selkoe, 2001).

- Hipótesis infecciosa: relacionada con la hipótesis anterior, cada vez hay más datos sobre el papel de los microorganismos en la respuesta inflamatoria e inmunológica cerebral. Las infecciones están adquiriendo más importancia como posibles causas de procesos neurodegenerativos: infecciones por hongos (R. Alonso *et al.*, 2014; Prusiner, 2013), virus (Chiu *et al.*, 2014; Lurain *et al.*, 2013), bacterias (Asti & Gioglio, 2014; Hammond *et al.*, 2010; Miklossy, 2011), protozoos (Prandota, 2014). También se está estudiando la participación de la propia microbiota. Estos microorganismos, además del mantenimiento nutricional de los seres vivos, actúan como potentes activadores proinflamatorios, interviniendo en las cascadas inflamatoria e inmunológica del hospedador. Estos eventos aceleran la producción de radicales libres, aumentan la permeabilidad vascular e incluso la activación aberrante del sistema inmune innato, intensificando la agregación del A $\beta$  (Hill *et al.*, 2014; Welling *et al.*, 2015; Y. Zhao & Lukiw, 2015).
- Otras hipótesis. En los últimos años han surgido otras líneas de investigación de factores influyentes como la resistencia a insulina, el papel del estrés oxidativo, alteraciones en la microvasculatura cerebral o la hipótesis neuroenergética que propone la disminución del aporte de glucosa en el cerebro como evento que acelera la sintomatología de la EA (Drachman, 2014; Pooja Naik, 2014; Winkler *et al.*, 2015).

### 1.2.2. Factores de riesgo

A pesar de que la etiología concreta sigue siendo un enigma, la tendencia general considera un origen multicausal para la EA y, debido a la gran variabilidad de los factores de riesgo que intervienen en el desarrollo y la clínica, algunos autores proponen abordar la EA como un síndrome (Rolland *et al.*, 2008; Wallin & Blennow, 1996). Los factores de riesgo se dividen en modificables y no modificables.

De los modificables destacan:

- Factores de riesgo cardiovascular: según el National Institute of Aging-Alzheimer's Association (NIA-AA) enfermedades como la diabetes mellitus, la hipertensión arterial y dislipemias, en especial la hipercolesterolemia, podrían activar la vía amiloidogénica precipitando la progresión de la enfermedad. Algunos estudios demuestran que es posible reducir hasta un 35% el riesgo de



- demencia controlando estas patologías (Attems & Jellinger, 2014; Barnes & Yaffe, 2011; Broce *et al.*, 2019; Livingston *et al.*, 2017; Petitti *et al.*, 2005; Sperling, Aisen, *et al.*, 2011; Winkler *et al.*, 2015)
- Agentes tóxicos: el curso de la enfermedad podría verse acelerado por la exposición a metales pesados como el plomo en etapas infantiles (Bihaqi *et al.*, 2014; Lidsky & Schneider, 2003) y el aluminio (Shin *et al.*, 1994); el tabaco, los disolventes orgánicos, la silicona, etc (Cacabelos, 1990).
  - Otros relacionados con menor evidencia: el déficit de vitamina D (Annweiler *et al.*, 2012; Shen & Ji, 2015), el aislamiento social, el estilo de vida sedentario, el estrés (Vallejo Johnson & Marcial Velastegui, 2017); los traumatismos craneoencefálicos (Djordjevic *et al.*, 2016). Más recientemente, se ha postulado también la carencia del sueño No-Rem como posible factor de riesgo (Falter & Van Den Bossche, 2021).

Entre los factores no modificables destacan:

- Edad: es el factor más importante ya que ser mayor de 65 años incrementa exponencialmente la probabilidad de padecer demencia (Ballard *et al.*, 2011).
- Sexo: se identifica cierta prevalencia en mujeres respecto a varones (Hebert *et al.*, 2003; Irvine *et al.*, 2012).
- Factores genéticos: se ha descrito la influencia de mutaciones de determinados genes en el aumento de los acúmulos de  $\beta$ Ay proteína Tau hiperfosforilada. Dentro de todos los posibles genes implicados, cabe destacar cuatro de ellos por el patrón de herencia que presentan. Los genes de las presenilinas (PSEN) *PSEN1*, *PSEN2* y el gen *APP* tienen una herencia autosómica dominante, siendo los responsables de las formas preseniles (Bekris *et al.*, 2010; Bertram & Tanzi, 2004; Harold *et al.*, 2009; Lambert *et al.*, 2009; Selkoe, 2001). Mientras que el gen *APOE* se transmite con patrón de herencia mendeliana semi-dominante y penetrancia incompleta, y se relaciona con las formas seniles de EA.
  - El gen *PSEN1* se localiza en el cromosoma 14 y su alteración da lugar a las formas de EA más incapacitantes, agresivas y tempranas (predomina en menores de 30 años). Se han identificado cerca de 200 mutaciones en este gen, siendo el más implicado en variantes familiares de EA. Hoy sabemos que fue el responsable del caso de la paciente Auguste Deter Crook *et al.*, 1998; Janssen *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 1991; Müller *et al.*, 2013).

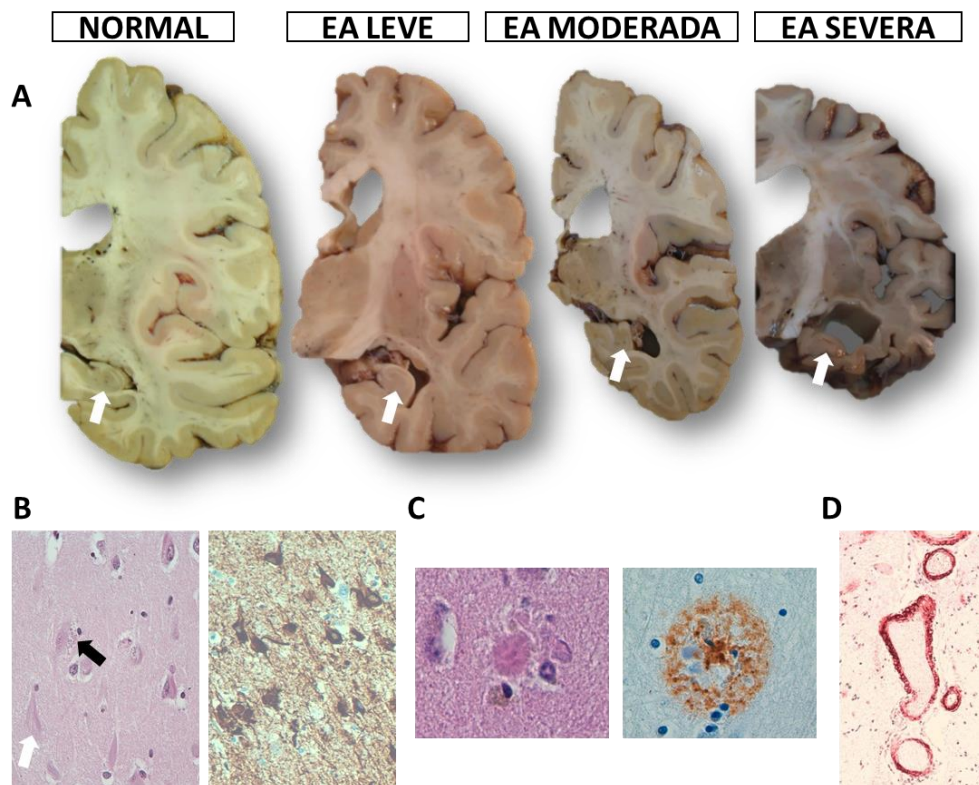
- El gen *PSEN2*, localizado en el cromosoma 1, condiciona una clínica algo más tardía y con mayor similitud a las formas esporádicas. Ambos genes codifican la síntesis de las PSEN (Bird *et al.*, 1989; RogaeV *et al.*, 1995).
- El gen *APP*, en el cromosoma 21, codifica la formación de la PPA, es responsable de un fenotipo característico que aparece entre los 40 y 50 años y de algunos casos de demencia en el síndrome de Down (Doran *et al.*, 2017).
- El gen *APOE* codifica la Apolipoproteína E (ApoE), el transportador de lípidos más importante del SNC. Se trata de una proteína plasmática de 299 aa codificada por dicho gen situado en el cromosoma 19, (Fernández-Viadero *et al.*, 2013). La mutación de este gen es el factor de riesgo más importante en los casos de EA esporádica y EA familiar tardía (Corder *et al.*, 1993). Existen varios alelos, la mayoría de ellos están implicados en funciones protectoras del SNC como reparación de daños moleculares en membranas celulares y proteínas, eliminación del amiloide, modulación y metabolismo del PPA y procesos inflamatorios e inmunológicos (Hauser *et al.*, 2011; Ye *et al.*, 2005; Youmans *et al.*, 2012). En la EA los alelos más implicados son  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ ,  $\epsilon 4$ . Dos de ellos,  $\epsilon 2$  y  $\epsilon 3$ , se consideran factores protectores porque son menos neurotóxicos, y más efectivos para eliminar el A $\beta$  y transportar colesterol (Bekris *et al.*, 2010; Chartier-harlin *et al.*, 1994). Por el contrario, ser portador del alelo  $\epsilon 4$  incrementa el riesgo de EA porque favorece el acúmulo de A $\beta$  en PS y aumenta la fosforilación de proteína Tau. Además, se sabe que este alelo altera la plasticidad neuronal y la funcionalidad mitocondrial lo que origina fenómenos neurotóxicos y déficits sinápticos y también participa de forma aberrante en fenómenos neuroinflamatorios y altera la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE), lo que se traduce, en definitiva, en atrofia tisular y déficit cognitivo (Basak & Kim, 2010; Corder *et al.*, 1993; Dean *et al.*, 2014; Harris *et al.*, 2003; Mahley & Huang, 2012; Mufson *et al.*, 2016).

Por otro lado, aunque se necesitan más estudios, se cree que hay otras circunstancias que podrían tener efecto protector frente a la enfermedad. Una adecuada reserva cognitiva, obtenida mediante estimulación intelectual y el alto nivel educativo, estimula la sinaptogénesis y la plasticidad neuronal amortiguando las lesiones por depósito. También tiene un efecto positivo el ejercicio físico moderado y la dieta equilibrada. Las últimas tendencias apuntan a la dieta cetogénica como un posible protector (Gough *et al.*, 2021); una red social estimulante, el consumo regular de ciertos fármacos como antiinflamatorios no esteroideos y estatinas (Ferris *et al.*, 2007; Fratiglioni *et al.*, 2000; Kirk-Sanchez & McGough, 2013; Law *et al.*, 2018; Stern *et al.*,

1999) e incluso la realización de actividades que estimulen el uso del cerebro, como la práctica del ajedrez (Barzegar & Barzegar, 2017; Dowd & Davidhizar, 2003).

### 1.3. HISTOPATOLOGÍA

El elemento patológico central en la EA es la acumulación de la proteína Tau hiperfosforilada y del péptido citotóxico A $\beta$  (Glennner & Wong, 1984; Selkoe, 1994). Otras lesiones histopatológicas frecuentes en EA son la degeneración granulovacuolar, las neuritas distróficas y los cuerpos de Hirano, que son agregados proteicos citoplasmáticos que predominan en el asta de Amón en el hipocampo (Fechheimer *et al.*, 2002; Munoz *et al.*, 1993) (Figura 6).



**Figura 6. Principales características histopatológicas de la EA.** A) Secuencia del hemisferio derecho desde un cerebro control sano a la izquierda hasta un cerebro con EA severo a la derecha. Nótese la progresiva atrofia cerebral y en particular del hipocampo (flecha blanca). B) Patología Tau. Imagen de H&E que muestra ONFs (flecha blanca) y degeneración gránulo vacuolar (flecha negra). A la derecha se observa la imagen de la inmunohistoquímica (IHQ) hecha para Tau hiperfosforilada mostrando los depósitos de tau (anticuerpo AT8) C) Patología A $\beta$ . Imagen de H&E que muestra una placa neurítica con centro denso. A la derecha se observa la imagen de la IHQ para A $\beta$  mostrando una placa neurítica. D) IHQ para A $\beta$  mostrando la angiopatía amiloide en varias arteriolas de las leptomeninges.

### 1.3.1. Amiloide en la EA

El amiloide engloba un grupo de proteínas fibrilares heterogéneas presentes en distintos tejidos. En condiciones patológicas estas proteínas pueden adquirir el plegamiento en hoja  $\beta$ , lo que les confiere una resistencia a la degradación y eliminación, organizándose estas estructuras en agregados insolubles que dan lugar a numerosas enfermedades amiloides sistémicas. En el cerebro estos agregados se encuentran asociados a procesos degenerativos principalmente la EA pero también se han identificado en relación con la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la demencia por cuerpos de Lewy entre otras (R. D. Terry *et al.*, 1987; Walsh & Selkoe, 2005; Wechalekar *et al.*, 2016).

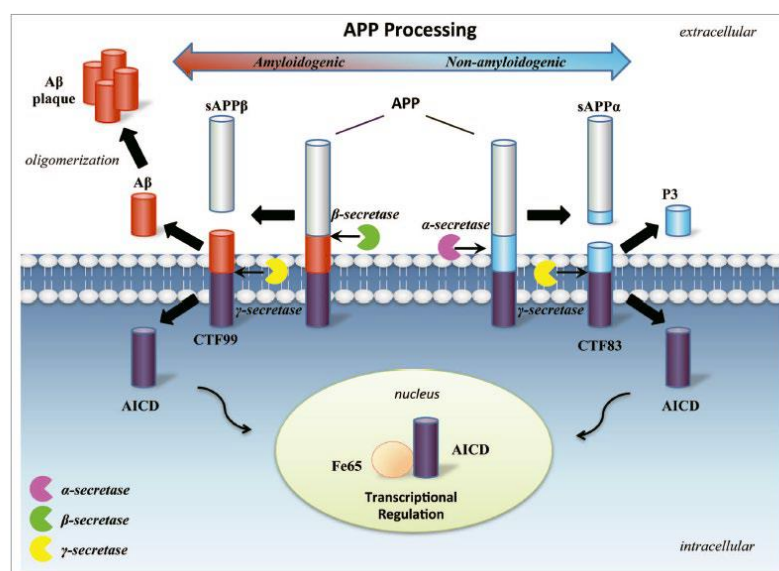
El A $\beta$  está formado por péptidos de entre 37 y 43 aa que encontramos formando monómeros u oligómeros solubles. Estos péptidos son altamente flexibles y propensos a la agregación, conformando fibrillas rectas no ramificadas de entre 6 y 10 nm de diámetro (J. A. Hardy & Higgins, 1992; J. Hardy & Allsop, 1991). El papel que desempeña el A $\beta$  en condiciones fisiológicas no está del todo aclarado. Se sabe que interacciona con diferentes ligandos e interviene en el crecimiento celular, transporte de colesterol y ejerce cierta protección frente al estrés oxidativo y a la infección por algunos microbios (Barrett *et al.*, 2012; Baruch-Suchodolsky & Fischer, 2009; Soscia *et al.*, 2010; Yao & Papadopoulos, 2002).

El A $\beta$  deriva de la PPA, una glicoproteína de 110 kDa que interviene en el crecimiento, reparación y supervivencia de las células (Glennner & Wong, 1984; Kang *et al.*, 1987). Es posible encontrarla en muchos tejidos y en los espacios sinápticos. Esta proteína está codificada por un gen situado en el cromosoma 21 y mutaciones en dicho gen podrían incrementar la producción de A $\beta$  (Priller *et al.*, 2006; Turner *et al.*, 2003). La PPA se sintetiza en el retículo endoplasmático, migra a la membrana celular donde puede ser procesada por una familia de secretasas. Las  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas, codificadas por los genes de las PSEN, se encargan de la lisis de proteínas transmembrana tipo 1, incluyendo la PPA, cuya escisión puede seguir dos caminos: una vía no amiloidogénica o una vía amiloidogénica (Figura 7) (De Strooper *et al.*, 2012; Haass *et al.*, 2012; Selkoe, 2001).

- a. Vía no amiloidogénica: En esta ruta, la  $\alpha$ -secretasa es la primera que actúa sobre la PPA liberando un fragmento del extremo carboxi-terminal de 83 aa, conocido como p83. Es un péptido pequeño y soluble sobre el que actúa la  $\gamma$ -secretasa para dar lugar a un péptido aún menor, llamado p3, que será degradado sin acumularse ni interferir con la actividad celular fisiológica (Haass & Selkoe, 1993).
- b. Vía amiloidogénica: La PPA es escindida por la  $\beta$ -secretasa en el extremo carboxi-terminal liberando un péptido de 99 aa que incluye una región

hidrofóbica correspondiente al A $\beta$ . Este péptido de 99 aa es fragmentado por la  $\gamma$ -secretasa en varios puntos, dando lugar a isoformas de entre 36 y 46 aa de A $\beta$ . Las isoformas más conocidas son:

- El residuo de 40 aa (A $\beta$ 40) es el más frecuente (LaFerla *et al.*, 2007); tiene cierta solubilidad y se organiza en monómeros. Estos monómeros se agregan predominantemente en el endotelio de la microvasculatura cerebral dando lugar a la angiopatía amiloidea congofílica o cerebral (AAC), que se caracteriza por la aparición de microaneurismas, microinfartos corticales y hemorragias cerebrales más o menos extensas (Halfter *et al.*, 1998; Rensink *et al.*, 2003). Los agregados vasculares se observan independientemente de si hay acúmulo de amiloide en el parénquima cerebral (Charidimou *et al.*, 2012).
- El residuo de 42/43 aa (A $\beta$ 42/43) es menos abundante, más hidrofóbico y con mayor capacidad fibrogénica que el anterior. Su asociación en oligómeros le proporciona una extraordinaria capacidad de agregación en forma de fibrillas. Estos agregados dañan las sinapsis, desencadenan vías tóxicas y dan lugar a cambios degenerativos y déficits cognitivos (Mucke & Selkoe, 2012). Los dos aa adicionales parecen ser los responsables de las propiedades biofísicas tóxicas porque favorecen la organización del amiloide en conglomerados anulares. Estos conglomerados interactúan con componentes de la membrana plasmática y alteran la homeostasis de los canales iónicos y ciertas moléculas de adhesión celular (neuroliginas y reurexinas de la hendidura sináptica) (Jarrett *et al.*, 1993; Mawuenyega *et al.*, 2010; Saito *et al.*, 2011; Younkin, 1998; Y. Zhao & Lukiw, 2015).



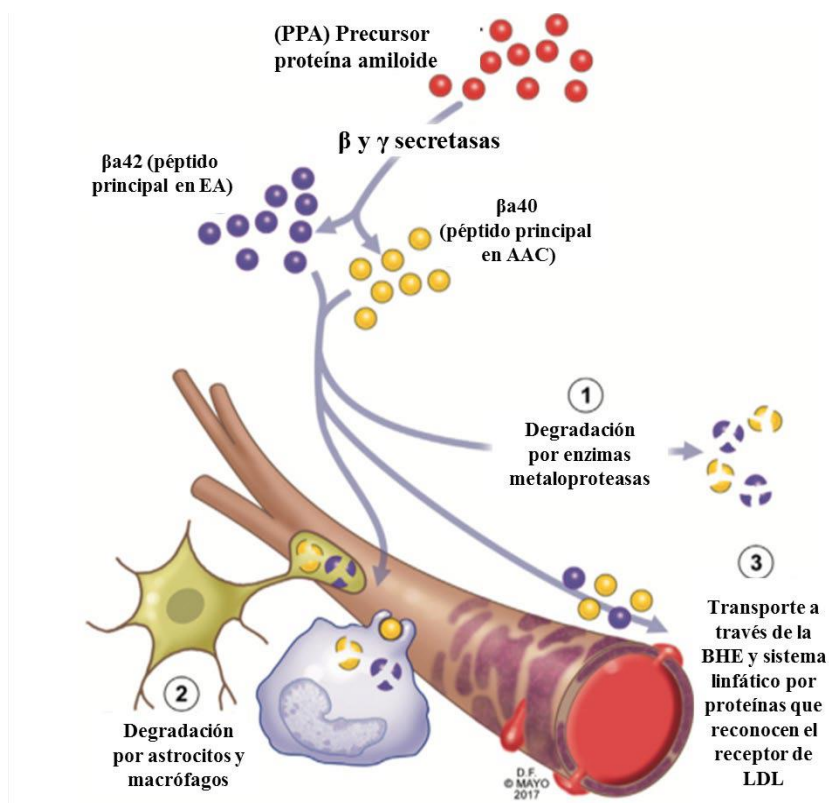
**Figura 7. Procesamiento de la APP y productos de escisión: vía no amiloidogénica y vía amiloidogénica.** (Zhou *et al.*, 2011).



El A $\beta$  forma un las PS a nivel del parénquima cerebral, además de acúmulos en pequeños vasos cerebrales (Glennner & Wong, 1984; Selkoe, 1994). Aunque ambas isoformas pueden formar parte de las PN, es A $\beta$ 42/43 el que compone el núcleo central de las mismas.

El tamaño de las PS oscila entre 10 y 200  $\mu$ m y pueden ser clasificadas de menor a mayor grado de maduración en placas difusas, placas primitivas, placas densas o neuríticas (PN), que son las patognomónicas de la EA. La maduración de dichas placas consiste en la adición al conglomerado de diferentes moléculas: oligómeros de A $\beta$ 42/43, A $\beta$ 40, fragmentos de PPA, moléculas de heparán sulfato (HS), ApoE, marcadores de inflamación, fragmentos de neuritas distróficas, astrocitos y microglía reactiva, entre otras (Armstrong, 2009; Bussièrè *et al.*, 2004; Serrano-Pozo *et al.*, 2011)

El A $\beta$  puede ser eliminado de varias maneras: por proteólisis, por degradación en lisosomas celulares del parénquima cerebral, por astrocitos y macrófagos y por aclarado mediante el sistema cerebrovascular, que incluye las vías de drenaje del fluido intersticial y de la barrera hematoencefálica (Kanekiyo *et al.*, 2014) (Figura 8). Cuando la producción de amiloide está anormalmente aumentada o la eliminación es insuficiente y/o defectuosa, la cascada inflamatoria se exagera de forma anómala dando lugar a la formación de las PS (Almeida *et al.*, 2006; S. Wang *et al.*, 2016).



**Figura 8. Mecanismo de producción, degradación y deposición de A $\beta$  en las arterias de la corteza.** La PPA se descompone por las secretasas  $\beta$  y  $\gamma$  para formar

A $\beta$ 42, péptido principal asociado con la EA y A $\beta$ 40, péptido principal asociado con la angiopatía amiloide cerebral. Estos péptidos se pueden degradar por metaloproteinasas, astrocitos o macrófagos, o se transportan a través de la barrera hematoencefálica a través de la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL), y se drenan a través del sistema linfático (Modificado de DeSimone *et al.*, 2017).

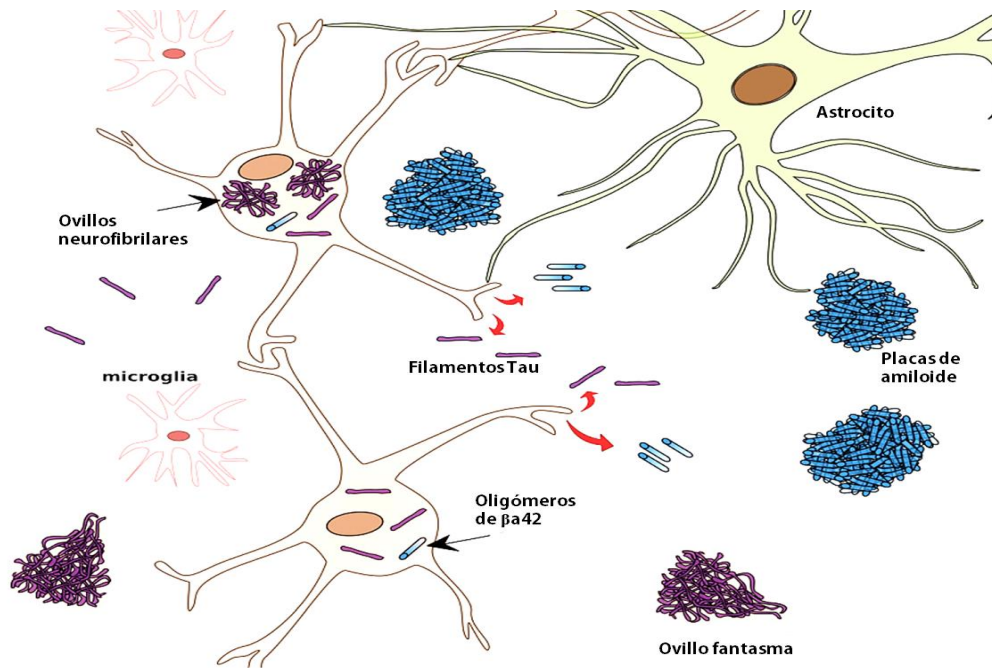
### 1.3.2. Proteína Tau en la EA

La proteína Tau está localizada fundamentalmente en el sistema nervioso. Se trata de una unidad tubular que se asocia al heterodímero tubulina para estabilizar los microtúbulos de la neurona, facilitando el transporte de señales y nutrientes en la célula. En los últimos años también se ha relacionado con el mantenimiento de la integridad del ADN y ARN y la plasticidad sináptica (Fuster-Matanzo *et al.*, 2018; Stamer *et al.*, 2002; Weingarten *et al.*, 1975).

El gen que codifica la proteína Tau se sitúa en el cromosoma 17 y da lugar a 6 isoformas distintas que precisan ser fosforiladas para su correcto funcionamiento (Goedert *et al.*, 1992). En condiciones patológicas la proteína se encuentra anormalmente fosforilada, lo que impide que funcione correctamente y facilita su acúmulo de dos maneras: predominantemente en filamentos helicoidales aberrantes de doble cadena apareada, o en filamentos rectos (Goedert, 1993). Ambos tipos se pueden encontrar dispersos de manera soluble o enredados en ONFs insolubles (Kidd, 1963; Limorenko & Lashuel, 2021).

Los ONFs empiezan a formarse muchos años antes de que aparezcan los síntomas neurodegenerativos y están directamente relacionados con fenómenos de estrés oxidativo, alteraciones en las sinapsis y la destrucción y muerte neuronal (A. D. C. Alonso *et al.*, 1997; Armstrong, 2009; Cárdenas *et al.*, 2012; Morsch *et al.*, 1999; Pérez-Tur, 2000) (Figura 9).

Estos ovillos pueden tener ubicación intracelular o extracelular (ONF-I, ONF-E) y aunque no son exclusivos de la EA, sí son muy característicos. En la EA los ONF-I se localizan en el cuerpo neuronal, en dendritas apicales y distales a modo de hebras del neurópilo. Por otra parte, los ONF-E son ovillos más compactos y se sitúan preferentemente en dendritas o axones anormales de neuronas destruidas que están asociados a PS (Armstrong, 2009; Basak & Kim, 2010; Cras *et al.*, 1995; Fukutani *et al.*, 1995; Gómez-Ramos *et al.*, 2006).



**Figura 9. Representación de la distribución de PS y de ONFs intra y extracelulares en tejido cerebral** (Modificado de Saint-Aubert *et al.*, 2017).

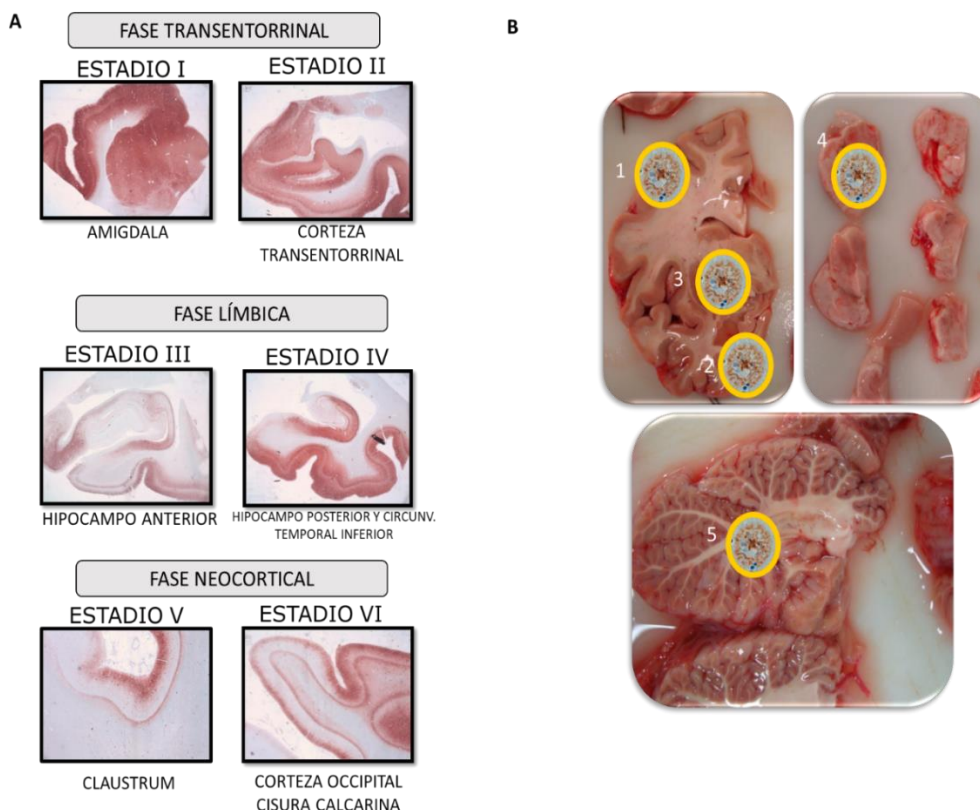
### 1.3.3. Progresión de las lesiones

Los cambios morfológicos en la EA siguen un patrón de diseminación secuencial en las zonas implicadas ya descrito en 1991 por Braak & Braak, que diferencian tres fases y seis estadios (Heiko Braak *et al.*, 2006; Heiko Braak & Braak, 1996):

- Fase transentorrinal (estadios I y II de Braak): las alteraciones ocurren en esta región sin que en principio se aprecian cambios o deterioro cognitivo, para después progresar a la amígdala y al hipocampo.
- Fase límbica (estadios III y IV de Braak): se intensifica el daño en las regiones anteriores y se extiende a lóbulos temporal, frontal, parietal y parte del neocórtex. Correspondería clínicamente con la EA incipiente, con poca destrucción en córtex cerebral y sin atrofia detectable macroscópicamente. Los cambios severos sólo ocurren en algunas regiones y áreas cognitivas como las áreas de asociación frontotemporal, respetando áreas motoras, visuales y sensitivas primarias y con dilatación predominante en el ventrículo lateral. Se considera que al final de esta fase la transferencia de datos desde neocórtex al hipocampo y viceversa se interrumpe, por lo que comenzarían el deterioro cognitivo y los cambios sutiles en la personalidad.
- Fase isocortical: (estadios V y VI de Braak): destrucción masiva del neocórtex, de mayor gravedad en las áreas de asociación neocortical, áreas primarias sensitiva y motora, núcleo estriado y sustancia negra. Se confirma el diagnóstico de EA.



Descubrimientos realizados durante los últimos años (Dubois *et al.*, 2021; Scheltens *et al.*, 2021) han llevado a una revisión de la clasificación en estos estadios. Los acúmulos de la proteína Tau y de A $\beta$  seguirían secuencias de depósito independientes (Figura 10), identificándose también en otras zonas como núcleos subcorticales, tronco encéfalo (locus coeruleus), núcleo serotoninérgico dorsal del rafe y cerebelo. Más concretamente, los acúmulos de Tau se localizarían en el locus coeruleus, en las regiones transentorrinal y entorrinal en los estadios I y II. Después se afectaría la formación del hipocampo y parte del neocórtex en los estadios III y IV, y finalmente el resto del neocórtex en estadios V y VI. Mientras que A $\beta$  seguiría la distribución descrita por Thal y colaboradores (2002) en 5 fases. Inicialmente A $\beta$  se observa en neocórtex temporal basal y orbitofrontal (fase 1). Se diseminaría posteriormente a lo largo del neocórtex hacia la formación del hipocampo, la amígdala, el diencefalo y los ganglios basales (fases 2 y 3). En los casos graves de EA, las placas de A $\beta$  también se encuentran en mesencéfalo, tronco cerebral inferior (núcleos del puente y locus coeruleus) y la corteza del cerebelo (fases 4 y 5) (Thal *et al.*, 2002) (Figura 10).

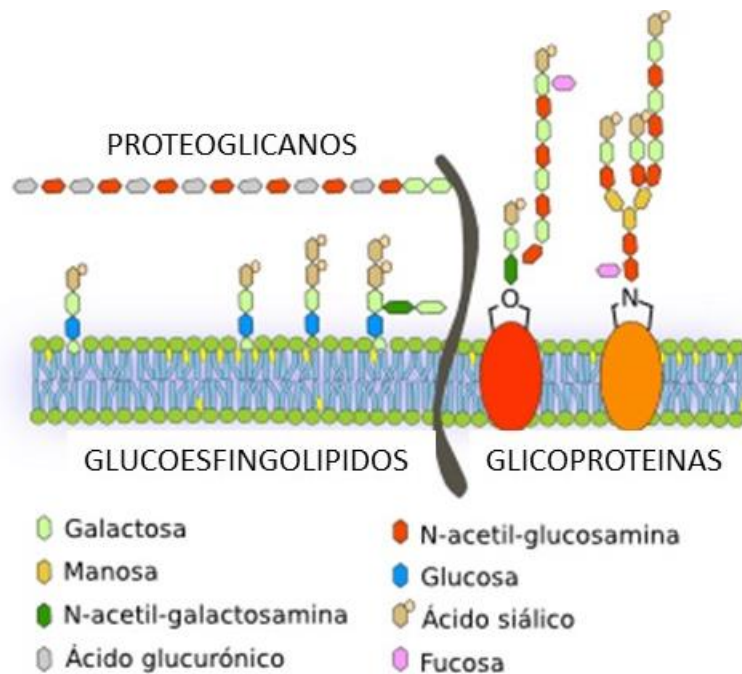


**Figura 10. Evolución espacio temporal de las lesiones en relación con el estadio de Braak & Braak (IHQ para tau hiperfosforilada en regiones representativas de la fase identificando ONFs) y la clasificación de Thal. A)** Fase transentorrinal, límbica y neocortical. B) Esquema numérico que representa el avance del depósito de amiloide a lo largo del encéfalo: 1- neocórtex; 2- sistema límbico; 3- ganglios de la base; 4- tronco del encéfalo; 5- cerebelo.

Ambos tipos de acúmulos han sido observados incluso en etapas muy tempranas del desarrollo, poniendo en duda que la corteza entorrinal sea la primera afectada e, incluso, se han detectado acúmulos en individuos sanos. En cualquier caso, la afectación de estas regiones presenta correlación evidente con formas atípicas y típicas de EA (Heiko Braak & Tredici, 2018; Duyckaerts *et al.*, 2015; Grinberg *et al.*, 2009; Jacobs *et al.*, 2018; Kelly *et al.*, 2017; Simic *et al.*, 2009; Theofilas *et al.*, 2017).

#### 1.4. PROTEOGLICANOS Y GLICOSAMINOGLICANOS

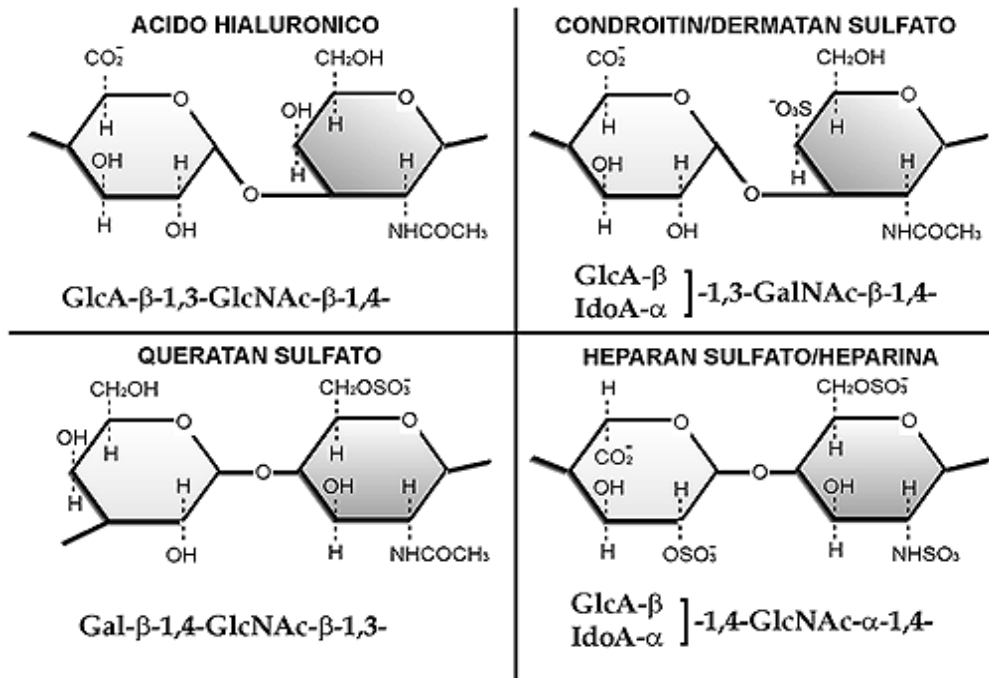
Los PGs son un grupo muy diverso de glicoconjugados constituido por cadenas de carbohidratos específicos de longitud variable, llamadas glicosaminoglicanos (GAGs), unidas covalentemente a diferentes proteínas núcleo (Fernández-Vega *et al.*, 2013) (Figura 11). Existen aproximadamente 50 genes que codifican estas moléculas en el genoma humano y que determinan su ubicación: en la superficie celular, en la matriz extracelular (MEC), e incluso, en el interior celular en algunos casos (Iozzo & Schaefer, 2015).



**Figura 11. Estructura de los PGs.**

Los PGs están formados por la unión de cadenas de GAGs a una proteína núcleo. Los GAGs son cadenas de disacáridos repetidos con residuos sulfatados en carbonos determinados.

Los GAGs se encuentran en todos los tipos celulares humanos y consisten en la repetición de unidades de disacáridos compuestas de una hexosamina N-acetilada o N-sulfatada y un ácido idurónico (GlcA o IdoA) o galactosa (Gal). Los GAGs pueden clasificarse en varios tipos según la estructura química de la unidad disacáridica que los compone: HS, condroitín sulfato (CS)/dermatán sulfato, ácido hialurónico y el keratán sulfato (KS) (Cui *et al.*, 2013) (Figura 12).



**Figura 12. Estructura de los Glicosaminoglicanos.**

- Condroitín sulfato /Dermatán sulfato. El CS está formado por la repetición de unidades disacáridicas de ácido glucurónico (GlcA) y N-acetil galactosamina (GalNAc) unidas por enlace  $\beta$ 1-3. El dermatán sulfato contiene residuos de IdoA, resultado de la epimerización del GlcA, unidos a GalNAc (Malavaki *et al.*, 2008).
- KS, formado por disacáridos de Gal y N-acetilglucosamina (GlcNAc) unidos por enlace  $\beta$ 1-3. Se diferencian tres tipos de KS en función de la localización: KS tipo I en córnea, KSII en cartílago, KSIII en cerebro, sin embargo, se sabe que su ubicuidad es aún mayor (Funderburgh, 2002).
- Ácido hialurónico, el disacárido de este GAG está formado por la asociación de residuos de GlcA unidos por enlace  $\beta$ 1-3 a residuos de GlcNAc (Tammi *et al.*, 2002).
- HS/Heparina, formado por unidades de GlcA y GlcNAc ensambladas por enlaces  $\beta$ 1-4. Son las moléculas con mayor carga negativa y

complejidad estructural conocidas hasta el momento (Habuchi *et al.*, 2003).

Los PGs se relacionan con gran cantidad de moléculas a través de interacciones de carga con baja especificidad y afinidad, hasta uniones con una gran especificidad y afinidad. Por ello, los PGs intervienen en el procesamiento y acumulación de los ligandos y ejercen funciones diferentes en los tejidos. Algunas de estas funciones vienen dadas por las proteínas núcleo, pero la mayoría dependen de las cadenas de GAGs que los componen.

Gracias a las modificaciones químicas en dichas cadenas, es decir, determinados patrones de epimerización y sulfatación, adquieren la capacidad de codificar información biológica (Alan David Snow, Sekiguchi, Nochlin, Kalaria, *et al.*, 1994). En este sentido, por ejemplo, el CS es muy importante para el desarrollo esquelético ya que interviene en la formación del cartílago y en la división celular en el periodo embrionario.

El dermatán sulfato, fue identificado inicialmente en piel. Ambos GAGs pueden actuar como correceptores o moduladores de señalización celular para el crecimiento, la proliferación, la síntesis de neuritas, de células madre neuronales y progenitoras, ayudando en la regeneración de neuronas y de la MEC. Por otro lado, su alteración puede dar lugar a procesos patológicos como determinadas enfermedades raras debidas a la mutación en los genes que intervienen en su síntesis, pueden formar cicatrices gliales y favorecer algunos tipos de neuropatías periféricas.

Se les ha relacionado con fenómenos de progresión de la arterioesclerosis, con un tipo de cáncer llamado condrosarcoma, e incluso pueden actuar como receptores de superficie celular para patógenos (Mikami & Kitagawa, 2013; S. Wang *et al.*, 2016). El KS facilita la hidratación de la MEC para mantener la transparencia corneal; en cartílago y tejido óseo tiene un papel estructural; y también se sabe que interviene en la regeneración y plasticidad neuronal. Puede dar lugar a procesos patológicos como las enfermedades denominadas mucopolisacaridosis, la distrofia macular corneal, ciertos carcinomas de tracto genital femenino, etc. (Funderburgh, 2002; Pomin, 2015; Uchimura, 2015).

La principal función del ácido hialurónico se relaciona con el mantenimiento de la hidratación y ciertas propiedades físicas de los tejidos (piel, cartílago, líquido sinovial, humor vítreo). Interviene en el desarrollo de la arquitectura y mecánica celulares y puede traducir señales para el funcionamiento biológico de los organismos. Además, carece de proteína núcleo por lo que se le identifica como un polisacárido libre en MEC (Tammi *et al.*, 2002; Tsepilov & Beloded, 2015).

### 1.4.1. Proteoglicanos de heparán sulfato

Los Proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs) son los PGs más relevantes desde un punto de vista fisiológico especialmente por su ubicuidad, puesto que se encuentra en la superficie de todas las células y también en la MEC que las rodea, y por su implicación además en múltiples procesos patológicos. Esta capacidad de participar en numerosas funciones viene principalmente determinada por la información biológica incluida en las cadenas de HS generada a través de modificaciones enzimáticas, cuyo resultado es un código molecular de información biológica transcendental (Bernfield *et al.*, 1992; Ori *et al.*, 2008; Ricard-Blum & Lisacek, 2017). Entre estas modificaciones se destaca la adición de grupos sulfato en posiciones concretas de la unidad disacáridica del HS, otorgando características funcionales específicas de cada localización. Además de las reacciones de sulfatación, también ocurren epimerizaciones del GlcA que confieren flexibilidad a las cadenas. Ejemplo de ello es la heparina, un tipo de HS altamente sulfatado con capacidad anticoagulante, producido por los mastocitos del tejido conectivo y células progenitoras gliales, con aproximadamente un 70 % de residuos de GlcA epimerizados en IdoA (Lindahl *et al.*, 2015). Las moléculas presentan longitudes comprendidas entre 40 y 300 residuos disacáridos, y se encuentran estructuradas en dominios capaces de codificar información detallada para su interacción con ligandos concretos (Sarrazin *et al.*, 2011). Al conjunto de los genes que codifican los sistemas enzimáticos que proporcionan la capacidad a cada célula de generar estos GAGs enriquecidos con información específica para cada momento o evento celular es lo conocemos como heparanoma.

Los HSPGs están principalmente constituidos por cadenas de HS y algunos de ellos también pueden contener cadenas de CS, lo que incrementa su diversidad (Tabla 1). Únicamente 13 proteínas aparecen habitualmente como HSPGs en el ser humano. Diez de ellas corresponden a dos familias de PGs de superficie celular, los sindecanos (SDC) y los glicanos (GPCs), aunque pueden ser liberados por proteólisis a la MEC (Hassan *et al.*, 2021). Los otros 3 HSPGs incluyen al perlecano (PRCAN), agrina (AGRN) y colágeno XVIII (COL18A1) (Iozzo & Schaefer, 2015; Sarrazin *et al.*, 2011). El primero se localiza en la membrana basal, pero como la AGRN y el COL18A1, también pueden localizarse en la MEC. Además, recientemente se ha descrito que el PRCAN puede encontrarse a nivel del núcleo celular y en zonas perinucleares. Existe finalmente un grupo de HSPGs denominado "a tiempo parcial" y es un grupo heterogéneo de proteínas entre las que se encuentran la SRGN, el receptor CD44v3, el TGFBR3 y la neuropilina (NRP1) que pueden tener unidas o no moléculas de GAGs sulfatados (K. Watanabe *et al.*, 1995).

**Tabla 1. Tipos de PGs de HS.** HS, heparán sulfato; CS Condroitín sulfato; DS dermatán sulfato; MEC, matriz extracelular; TFGB, factor de crecimiento transformante beta; FGF, factor de crecimiento de fibroblastos; MB, membrana basal (Traducido y modificado de Lindahl *et al.*, 2015).

PROTEOGLICANO	PROTEINA NUCLEO (KDA)	NUMERO/TIPO DE CADENA GAG	DISTRIBUCIÓN TISULAR	FUNCIONES PROPUESTAS	ENFERMEDADES HUMANAS RELACIONADAS
<b>PROTEOGLICANOS UNIDOS A LAS MEMBRANAS</b>					
Sindecanos 1-4	31-45	1-2 HS 0-2 CS	Mayoría de células nucleada.	Regula adhesión celular, migración y organización de actina en citoesqueleto, control de eliminación de ligandos de superficie celular	Desregulación en varios cánceres (p. ej. mieloma, carcinoma mamario)
Betaglicanos	110	0-1HS 0-1 CS	Fibroblastos	Correceptor que regula la unión del ligando (por ejemplo, inhibinas), señalización a través de receptores TGFβ	Supresor de tumores comúnmente perdido en cáncer de ovario
Glipicanos 1-6	60	1-3 HS	Células epiteliales y mesenquimales cerebro	Co-receptores que regulan la señalización a través de receptores asociados (p. ej. tirosina quinasa)	Síndrome de crecimiento excesivo Simpson-Golabi-Mehmel, progresión del carcinoma hepatocelular
<b>PROTEOGLICANOS SECRETADOS</b>					
Perlecano	400	1-3 HS 0-2 CS	MBs, MEC, cartílago	Ensamblaje MEC, regula migración celular por interacción con integrinas, secuestro de factores de crecimiento (p.ej. tirosina quinasa)	Mutaciones raras causan malformaciones esqueléticas severas
Agrina	200	1-3 HS	MBs, cerebro y uniones neuromusculares	Maduración de la unión neuromuscular ligando para integrina y α-destroglicano	
Colágeno tipo XVIII	147	2-3 HS	MBs, isoforma más larga extendida	Estabilidad de MB, el dominio	Mutaciones: Sd. Knobloch, múltiples defectos



PROTEOGLICANO	PROTEINA NUCLEO (KDA)	NUMERO/TIPO DE CADENA GAG	DISTRIBUCIÓN TISULAR	FUNCIONES PROPUESTAS	ENFERMEDADES HUMANAS RELACIONADAS
				Monomérico C-terminal (endostatina) es anti-angiogénico	de cierre del tubo neural y ocular
PGS DE GRÁNULOS INTRACELULARES					
Serglicina	10-19	10-15 heparina/CS	Mastocitos, leucocitos células endoteliales, condrocitos, células del músculo liso	Empaquetamiento del contenido de gránulos, mantenimiento de actividad de la proteasa, regulación después de la secreción de la coagulación, defensa del huésped y reparación de heridas	Inflamación, progresión del cáncer

#### 1.4.1.1. Breve descripción de la biosíntesis del HS

El HS es un GAG cuya estructura se fundamenta en la repetición del disacárido formado por GlcA y GlcNAc, dando lugar a cadenas largas y no ramificadas. El proceso es complejo e implica a múltiples enzimas. Así, tras la polimerización, estas cadenas experimentan una serie de reacciones químicas que producen una enorme diversidad estructural, y que incluyen:

- La N-deacetilación de GlcNAc, habitualmente seguida de N-sulfatación del residuo.
- La epimerización del C5 del GlcA para originar IdoA.
- Diferentes O-sulfataciones: sobre los carbonos C2 del IdoA, y los C6 o C3 de GlcNAc.

Cada disacárido concreto puede permanecer inalterado o ser modificado por todas o sólo una parte de las reacciones antedichas, pudiendo generarse por combinación hasta 48 unidades disacáridicas diferentes (Esko & Lindahl, 2001; Esko & Selleck, 2002; Iozzo, 2001). Estos monómeros aparecen localmente ordenados, originando secuencias específicas capaces de codificar la información necesaria para el cumplimiento de sus funciones biológicas (Esko & Selleck, 2002; Lamanna *et al.*, 2007).

Las células son capaces de controlar y alterar de forma dinámica la estructura del HS que expresan para lo cual poseen, para la mayoría de las reacciones citadas, múltiples isoenzimas responsables de la catálisis (Esko & Selleck, 2002; Lamanna *et al.*, 2007). Cada isoenzima manifiesta diferentes

especificidades de sustrato, y su expresión varía de forma controlada en función de las células, los tejidos, el estado de desarrollo y las condiciones fisiológicas y patológicas (Esko & Selleck, 2002).

Las células regulan todas estas funciones mediante el control dinámico de la síntesis de HSPGs, los cuales están sometidos a una rápida reposición. El resultado de toda esta variedad de interacciones a escala molecular es una participación activa en el control de numerosos procesos celulares. Estos incluyen desde cuestiones mecánicas, esenciales para mantener la integridad estructural, a aspectos más dinámicos como la motilidad y adhesión. También desarrollan influencias complejas sobre organogénesis y desarrollo embrionario, diferenciación celular, angiogénesis, regulación de la coagulación sanguínea, metabolismo lipídico, interacción con factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas, patogénesis microbiana, etc (Esko & Selleck, 2002; Lamanna *et al.*, 2007; Lander & Selleck, 2000).

#### 1.4.1.2. Modificaciones del HS posteriores a la síntesis

Las cadenas formadas pueden sufrir diversas modificaciones posteriores a su síntesis, con finalidad funcional específica de la célula o del tejido donde se encuentre. Estas modificaciones son realizadas por tres enzimas, dos sulfotransferasas (SULF1 y -2) y una heparanasa (HPSE) (Kreuger & Kjellén, 2012).

##### A. Sulfotransferasas

SULF1 y SULF2 son endosulfatasas extracelulares que se encargan de retirar selectivamente grupos sulfato del C-6, principalmente de Glucosamina N-sulfato (GlcNS) de los dominios N-sulfatados (NS), aunque también actúan en algunos dominios N-acetilados/ N-sulfatados (NA/NS). La actividad catalítica de estas sulfatasas reside en su extremo N-terminal, mientras que en su extremo C-terminal, hidrofílico y característico de las dos isoformas, se encuentra la zona de unión específica a GlcNS. Está descrito que modulan las interacciones de los HSPGs con determinados ligandos y su labor resulta imprescindible durante el desarrollo embrionario, la reparación tisular y el crecimiento tumoral (Ai *et al.*, 2006; El Masri *et al.*, 2017; Morimoto-Tomita *et al.*, 2002).

##### B. Heparanasa

La HPSE es una endo-beta-glucuronidasa que cataliza la escisión de la cadena de HS en zonas concretas, liberando fragmentos de entre 10 y 20 unidades sacarídicas, con pesos moleculares entre 5 y 7 kDa que pueden tener diversas actividades biológicas (Okada *et al.*, 2002; Peterson & Liu, 2012).

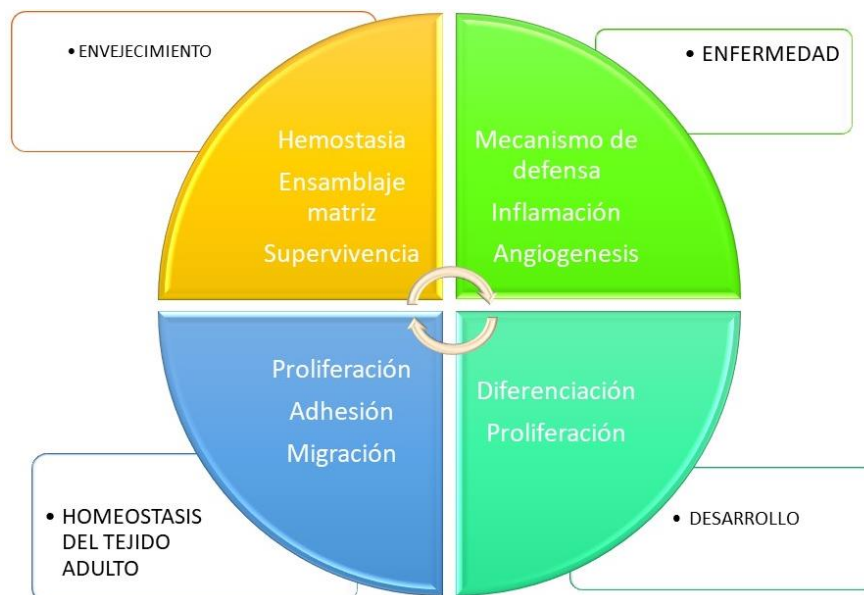


La HPSE está involucrada en funciones biológicas esenciales modulando la señalización y la capacidad de unión del HS a multitud de proteínas, incluyendo factores de crecimiento, quimiocinas, enzimas y proteínas de la MEC. Además, su actividad está estrechamente relacionada con procesos de inflamación y angiogénesis y patologías como la diabetes, infecciones, determinados tipos de cáncer y progresión metastásica y estados neurodegenerativos como la EA (Rivara *et al.*, 2016; Vlodaysky *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2014).

#### 1.4.2. Funciones del HS

Las cadenas de HS están implicadas en multitud de funciones esenciales para la biología humana. Su participación en el control de los procesos fisiológicos sucede sobre todo mediante interacción de los patrones específicos de sulfatación de las cadenas con diferentes ligandos como citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento, antígenos, enzimas, moléculas lipídicas, proteínas y otros componentes de la MEC. Su función está condicionada no solo por su estructura fina, sino también por la asociación a diferentes proteínas núcleo.

Por otro lado, se han relacionado también con muchos procesos patológicos. Esta doble actividad se debe a las estructuras específicas que adoptan las cadenas en los diferentes tejidos celulares (Whitelock & Iozzo, 2005) (Figura 13).



**Figura 13. Procesos fisiológicos y patológicos de los HSPGs.**

### 1.4.3. Papel fisiológico del HS

La interacción de los HSPGs con otras moléculas se establece fundamentalmente mediante enlaces iónicos de las cadenas de GAGs que, en ocasiones, requieren estabilización adicional por puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals. Las moléculas ligando tienen secuencias de aa concretas, lisina y arginina en su mayoría, que se unen, preferentemente, a los grupos sulfato y carboxilo del HS. Una vez asociadas, el HS puede modificar características de la molécula y, por ejemplo, protegerla de mecanismos de degradación. También puede posibilitar su almacenamiento y/o transporte, modular su conformación para incrementar la capacidad de interacción del ligando con su receptor, actuar como marcadores de señalización celular o puede, incluso, inhibir la acción del ligando (Esko & Selleck, 2002; Guimond *et al.*, 2009; Kreuger *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 1994).

Como decíamos anteriormente, la unión no se produce de forma aleatoria. Normalmente tiene lugar en dominios NS concretos de la cadena del GAG. Con esas regiones los ligandos pueden establecer asociaciones más o menos específicas dependiendo de si reconocen:

- a. Patrones de distribución de dominios (NS y NA/NS), como es el caso de la endostatina, el factor 4 plaquetario o la interleukina-8 que se unen a dominios llamados SAS, formados por dos dominios NS separados por zonas con residuos GlcNAc menos modificados (Kreuger *et al.*, 2002; Spillmann *et al.*, 1998; Stringer & Gallagher, 1997).
- b. Una distribución concreta de grupos sulfato, como hace el FGF2 que reconoce una secuencia mínima de 5 sacáridos con unidades GlcNS (6s)-IdoA (2s) (Reiland *et al.*, 2006).
- c. Disposiciones específicas de epímeros de ácido urónico y ciertos residuos sulfatados, como es el caso de la sulfatación por las HS3STs en la etapa última de la biosíntesis del HS. A pesar de que en humanos hay descritas 7 enzimas implicadas en la adición de un sulfato en el carbono 3, no es una modificación frecuente. En cualquier caso, queda reservada a un número limitado de moléculas tales como la glicoproteína D del VHS, FGFs, ciclofilina B, estabilina y la antitrombina (AT). La AT es el paradigma de molécula que reconoce grupos 3-O-S; concretamente, la AT se une a un pentasacárido de la cadena sacarídica que contiene un grupo 3-O-sulfato central. Esta unión potencia la actividad anticoagulante de la AT y su papel secundario como inhibidor de la inflamación y la angiogénesis (De Agostini *et al.*, 2008; Thacker *et al.*, 2014; Wiedermann & Römisch, 2002).

- d. Habría que añadir que la presencia de residuos IdoA dota a la cadena de mayor flexibilidad y cierta disposición helicoidal en la estructura secundaria y esta característica también influye en la unión a otras moléculas (Mulloy & Forster, 2000; Spillmann *et al.*, 1998) (Mulloy & Forster, 2000; Spillmann *et al.*, 1998).

Los HSPGs son esenciales durante el desarrollo embrionario porque median la señalización de factores de crecimiento participando en la diferenciación celular y la organogénesis (Nakato & Kimata, 2002; Patel *et al.*, 2017). Organizan el espacio extracelular y el citoesqueleto en numerosos tejidos, intervienen en la reparación del daño tisular, regulan la homeostasis, participan en procesos como la proliferación celular, la inflamación y la vascularización. Concretamente en el cerebro, mediante la unión a lamininas, PPA y FGF2, modulan la plasticidad neuronal y sináptica interviniendo en actividades relacionadas con la memoria (Bernfield *et al.*, 1999; Lindahl *et al.*, 2015; Schaefer & Schaefer, 2010).

#### 1.4.4. Patología

Las moléculas de HS también participan en muchos eventos patológicos. En este sentido, están relacionados con procesos infecciosos, algunas enfermedades del metabolismo como dislipemias y diabetes mellitus, enfermedades neurodegenerativas, pulmonares, gastrointestinales, renales, hematológicas y autoinmunes. Además, la mutación en los genes que codifican las enzimas de la síntesis de HS y también la alteración en las enzimas que intervienen en la degradación de las cadenas pueden dar lugar a enfermedades raras (mucopolisacaridosis), malformaciones congénitas, enfermedades por depósito de proteínas (conocidas como amiloidosis) y varios tipos de cáncer (Fernández-Vega *et al.*, 2015; Freeze *et al.*, 2015; García *et al.*, 2017; C. Martin *et al.*, 2019).

##### 1.4.4.1. HS en infecciones

El HS participa en la transmisión de enfermedades infecciosas. Los microorganismos utilizan estas moléculas para potenciar su virulencia e infectividad. Hay que tener en cuenta que los HSPGs se encuentran en prácticamente todas las células del cuerpo humano por lo que, además de bacterias, priones, virus, y otros parásitos interaccionan con sus cadenas. Estos microorganismos, mediante la adhesión a las cadenas de GAGs pueden evitar ser destruidos por los mecanismos de defensa del huésped. Algunos virus como el virus de la hepatitis B, el virus herpes simple y el VIH se unen a cadenas de HS para ser vehiculados al interior de las células y diseminarse. Pueden hacerlo por mecanismos de endocitosis de forma general o incluso más específicos como la internalización por macropinocitosis.

El grado de sulfatación de las cadenas es reconocido por algunos parásitos para su unión al HS, por ejemplo, *Plasmodium spp.*, *Leishmania spp.*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*. También muchas bacterias Gram + y Gram- se valen de los HSPGs como co-receptores para diseminarse, pudiendo incluso escindir la proteína núcleo y dar lugar al proceso conocido como "shedding" (Hess *et al.*, 2006; C. Martin *et al.*, 2019). En relación con el SARS-CoV-2, responsable de la pandemia que estamos viviendo actualmente, se ha descrito que el HS actúa como cofactor para la entrada del virus a las células y que además esto podría servir como una nueva estrategia para el diseño de alternativas terapéuticas (Q. Zhang *et al.*, 2020).

Los procesos infecciosos cobran cada vez más importancia en el establecimiento y progresión de la EA. Conociendo la relación entre patógenos y HS, estudios recientes sugieren la implicación de infecciones en la patogenia de la enfermedad, en tanto que los parásitos atraviesan la BHE y dan lugar a una respuesta inmunológica sostenida en el tiempo que podría ser el origen de la formación de las PS y los ONFs (Allen, 2016; Kumar *et al.*, 2016; Miklossy, 2011).

#### 1.4.4.2. HS en cáncer

Los HSPGs se relacionan estrechamente con la patogénesis y la progresión de tumores (Nagarajan *et al.*, 2018). Su ubicuidad favorece su participación en diferentes tipos de cánceres cuando se alteran las enzimas encargadas de la biosíntesis y modificación de la molécula. De esta forma, el HS está implicado en neoplasias hematológicas, cáncer de colon, próstata, cérvix, páncreas, mama, hepatoblastomas, rhabdomyosarcomas y otros cánceres pediátricos (Fernández-Vega *et al.*, 2013; Kaur & Cummings, 2019). Además, los HSPGs pueden favorecer el crecimiento celular incidiendo directamente en la multiplicación aberrante de las líneas celulares y/o promover procesos de angiogénesis que aseguran el sustrato a dichas células cancerígenas, favoreciendo el remodelamiento de la MEC y alterando ciertas funciones de las células inmunitarias. Aunque aún hay incógnitas por resolver, se sabe que las modificaciones en los patrones de sulfatación y ciertas modificaciones como metilaciones en las cadenas son las responsables de su alteración funcional (Denys & Allain, 2019; Fernández-Vega *et al.*, 2015; García *et al.*, 2016).

#### 1.4.4.3. HS en cerebro

En la EA las lesiones responsables de la destrucción progresiva de los tejidos llevan asociado un componente inflamatorio. Alrededor de las PS y los ONFs se encuentran restos de células de la glía, macrófagos y moléculas mediadoras de la respuesta al daño tisular: reactantes de fase aguda, FGF, citoquinas, interleucinas, HSPGs, etc. Por otro lado, los HSPGs están relacionados directamente con enfermedades neurodegenerativas por

depósito proteico como la EA, en tanto que se asocian con las proteínas responsables de la enfermedad: A $\beta$ , Tau, APP. Las cadenas sacarídicas facilitan y estabilizan la formación de los agregados proteicos en PS y ONFs, y algunos estudios recientes confirman este hecho al demostrar que los depósitos de amiloide se interrumpen al inhibir la biosíntesis del HS. La unión con estos agregados favorece su diseminación e impide su eliminación (Iannuzzi *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2005; Sepulveda-Diaz *et al.*, 2015). Como ya se comentó anteriormente, la formación de las PS y ONFs sucede de modo progresivo. Inicialmente estas moléculas se organizan en estructuras prefibrilares (placas difusas y filamentos helicoidales pareados) que madurarán hasta constituir los agregados característicos. El HS interactúa y participa en todas las fases del proceso, en muchos casos promoviendo la agregación de proteínas formadoras de amiloides como Tau, alfa-sinucleína, el péptido A $\beta$  y priones (Ancsin, 2003; Fernández-Vega *et al.*, 2021; Iannuzzi *et al.*, 2015; Motamedi-Shad *et al.*, 2009).

En relación con los agregados de A $\beta$ , las regiones altamente sulfatadas del HS son más prevalentes en los depósitos que contienen A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42, mientras que los sacáridos con menor grado de sulfatación solo se encuentran en placas que contienen A $\beta$ 40 (Xian Zhang *et al.*, 2014).

En el caso de la proteína Tau, las moléculas de HS altamente sulfatadas parecen favorecer la hiperfosforilación de Tau por quinasas dependientes de sustrato. El GAG se agrega a los ONFs y es necesario para la transformación de los filamentos pareados en agregados fibrilares. Además, juega un papel principal en la internalización de estos agregados de Tau hiperfosforilada utilizando mecanismos de endocitosis y macropinocitosis, similares a los empleados por priones y algunos virus. El HS se une a regiones específicas de Tau y se internaliza en las células sanas, alterando su estructura y funcionamiento (Holmes *et al.*, 2013; Konno *et al.*, 2004; Alan David Snow, Sekiguchi, Nochlin, Kalaria, *et al.*, 1994; J. Zhao *et al.*, 2017). De las enzimas modificadoras de la síntesis cabe destacar el papel que juegan las HPSEs. La HPSE parece que bloquea la formación de fibrillas intracelulares de Tau y descompone los depósitos de A $\beta$ -HS frenando la progresión de la enfermedad. Sin embargo, la HPSE2 podría interferir en la función de la HPSE inhibiéndola e impidiendo, por tanto, la eliminación de ambas proteínas (Lorente-Gea *et al.*, 2017; Maiza *et al.*, 2018).



## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---





## 2.1. HIPÓTESIS

---

Nuestra premisa parte de que la EA se caracteriza por tener depósitos tanto extracelulares como intracelulares de proteínas que son principalmente enucleadas por moléculas entre las que destacan los HSPGs. Por tanto, pensamos que debe existir una alteración tanto en los niveles de expresión de los genes que codifican las proteínas núcleo de los HSPGs, así como de las HPSEs, de manera diferencial entre los grados de EA y las zonas cerebrales afectadas.

## 2.2. OBJETIVOS

---

1. Identificar en pacientes con EA en diferentes grados de afectación ("grados leve, moderado y severo") y pacientes sin EA (clasificados como "grado normal"), las diferencias en la expresión de los genes codificantes de los enzimas encargados de la síntesis de las *HPSE1* y *HPSE2* con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (qRT-PCR).

2. Identificar en pacientes con EA en diferentes grados de afectación ("grados leve, moderado y severo") y pacientes sin EA (clasificados como "grado normal"), las diferencias en la expresión de los genes codificantes de los enzimas encargados de la síntesis de las proteínas núcleo de los HSPGs usando la técnica de qRT-PCR.

3. Analizar las diferencias en la expresión de dichos genes en función de la zona cerebral para cada grado de patología mediante análisis estadístico.

4. Analizar histológicamente la presencia de las proteínas codificadas por los genes alterados con técnicas de IHQ en las diferentes estructuras del cerebro de pacientes con EA.



### 3. MARCO TEÓRICO Y HERRAMIENTAS METODOLÓGICAS

---



### 3.1. MATERIAL Y METODOS

#### 3.1.1. Selección de pacientes y muestras

Las muestras de tejido cerebral fueron cedidas por el Biobanco de cerebros del Hospital Universitario de Araba, donde fueron recogidas en autopsias realizadas entre febrero de 2013 y octubre de 2015, previa aprobación de la Junta de Revisión de Procedimientos Éticos de dicha institución. Además, para la investigación se recibió un consentimiento informado firmado por cada paciente o sus familiares.

El diagnóstico de EA fue realizado en función de criterios inmunohistoquímicos y morfológicos, basados en las recomendaciones para la clasificación de la EA del NIA-RI (National Institute on Aging and Reagan Institute), publicadas por consenso en 1997 («Consensus Recommendations for the Postmortem Diagnosis of Alzheimer's Disease. The National Institute on Aging, and Reagan Institute Working Group on Diagnostic Criteria for the Neuropathological Assessment of Alzheimer's Disease.», 1997). De cada muestra se registró el momento de la autopsia y las características individuales de los pacientes (edad, sexo, y peso cerebral). Se utilizaron 24 muestras de 7 zonas de cerebros procedente de cadáveres. 6 muestras pertenecían a pacientes sanos (sin diagnóstico de EA en el momento de su fallecimiento), que actuaban como control y 18 procedentes de pacientes que habían padecido EA (Tabla 2).

**Tabla 2. Datos de las muestras empleadas para la realización del trabajo.** EA Leve: estadios I y II de Braak y Braak; EA Moderada: estadios III y IV de Braak y Braak; EA Severa: estadios V y VI de Braak y Braak.

CARACTERÍSTICAS / DATOS ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS	PACIENTES				
	Total (N=24)	Control (N=6)	EA Leve (N=6)	EA Moderada (N=6)	EA severa (N=6)
<b>Clasificación Braak y Braak</b>			Estadios I-II	Estadios III-IV	Estadios V-VI
<b>Sexo (%) Hombre</b>	6 (30)	2 (40)	1 (20)	2 (40)	1 (20)
<b>Sexo (%) Mujer</b>	6 (30)	2 (40)	1 (20)	2 (40)	1 (20)
<b>Edad (media ± ds)</b>	84 ± 11	79 ± 16	89 ± 5	89 ± 10	80 ± 12
<b>Peso cerebral (g)</b>	1128 ± 111	1148 ± 57	1177 ± 26	1122 ± 31	967 ± 19
<b>Intervalo post mortem (h)</b>	17 ± 5	18 ± 5	19 ± 5	15 ± 5	20 ± 4
<b>MMSE</b>	-	-	22 ± 3	14 ± 4	7 ± 3

Los 18 pacientes enfermos se agruparon por grados de afectación siguiendo la clasificación en estadios progresivos de afectación de Braak y

Braak, publicada en 1991 (Braak & Braak, 1991), en: cinco pacientes con grado leve (estadios I-II de Braak), cinco pacientes con grado moderado (estadios III-IV) y cinco pacientes con grado severo de enfermedad (estadios V-VI). En todos los pacientes se evaluó el deterioro cognitivo con el cuestionario Mini Examen del Estado Mental (MMSE).

Para la elección de las áreas del cerebro a analizar, también se siguió la clasificación de Braak y Braak (Braak & Braak, 1991) que correlaciona áreas concretas del cerebro en función de la progresión de la enfermedad: zona 1, región transentorrinal (amígdala); zona 2, hipocampo anterior; zona 3, hipocampo posterior; zona 4, Claustrum; zona 5, cisura calcarina; zona 6, globo pálido (parte más medial del núcleo lenticular de los ganglios de la base); zona 7, cerebelo (Tabla 3).

**Tabla 3. Zonas analizadas en las muestras recogidas.**

ZONA	REGIÓN
1	Amígdala con región transentorrinal
2	Hipocampo anterior
3	Hipocampo posterior
4	Claustrum
5	Cisura calcarina
6	Globo pálido
7	Cerebelo

### 3.1.2. Materiales

Para la realización de los procedimientos en el laboratorio se utilizaron los siguientes materiales, comprados a los fabricantes que se indican: RNeasy Kit y RNase-Free DNase de Qiagen (Hilden, Alemania); High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit y PowerSYBR Green PCR Master Mix de Applied Biosystems (Foster City, CA, USA); GenElute PCR clean-up kit y 3-3' diaminobenzidine de Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA); suero fetal bovino Gibco-FBS de Thermo Scientific (Waltham, MA, USA); solución de lavado Tween20® de Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA) .

Para las técnicas de IHQ se utilizaron los siguientes compuestos: el anticuerpo policlonal anti-HPSE1 de cabra (L-19), que reconoce la HPSE altamente activa procesada proteolíticamente (forma activa de 50 kDa de HPSE), se compró a Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA) y anticuerpo policlonal anti-HPSE-2 de conejo, de GeneTex (Atlanta, GA). Ambos anticuerpos primarios fueron debidamente validados como específicos para las proteínas HPSE y HPSE2.

Los anticuerpos secundarios anti-conejo (sc-2004) y anti-cabra (sc-2005) también fueron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Peso molecular de HPA1 altamente activo procesado proteolíticamente: 50 kDa. Además, para detectar las proteínas núcleo se utilizó el anti-sindecán-1 monoclonal de ratón (CD138; Clon MI15. Dako, España), anti-sindecán-4 (H-140; Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.), Anti-glicoproteína-4 (3E2C1; ThermoFisher, Reino Unido), anti-glicoproteína-6 (ab170523; Abcam, Reino Unido), anti-perlecano (H-300; Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.), Anti-neuropilina (ab81321; RabMab, Reino Unido), anti-betaglicano (3E2; sc-100857. Santa Cruz Biotechnology, EE. UU.) y anti-SRGN (ab211515; Abcam, Reino Unido). Todos los anticuerpos primarios se validaron adecuadamente como específicos de sus respectivas proteínas. Como anticuerpo secundario se utilizó polímero-HRP marcado listo para usar (Dako, España).

#### 3.1.2.1. Aislamiento de ARN

Muestras cerebrales de entre 20 y 30 mg de peso fueron homogeneizadas con un polytron PT 2100 (Kinematica Inc.; Bohemia, NY, USA). A continuación, se procedió a la purificación del ARN con el kit RNeasy (Qiagen), como indican las especificaciones del fabricante. Las muestras se trataron con ADNasa libre de ARNasa (Qiagen) durante el proceso de purificación, para eliminar cualquier resto contaminante de ADN.

Mediante espectrofotometría se determinó la concentración obtenida de ARN midiendo la absorbancia con un espectrofotómetro Picodrop Microliter UV/Vis (Picodrop Limited, Hinxton, UK). Las muestras obtenidas se dividieron en alícuotas de 10  $\mu$ l, usándose para la reacción de transcripción inversa, o se almacenaron a -80 °C hasta su uso posterior.

#### 3.1.2.2. Obtención del ADNc: Reacción de transcripción reversa

La síntesis de ADNc se llevó a cabo empleando 2  $\mu$ g del ARN purificado de cada muestra, utilizando el kit "High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit" siguiendo las instrucciones del fabricante. Los componentes de la reacción fueron 2  $\mu$ l de mezcla de nucleótidos, 2  $\mu$ l de tampón, 0,8  $\mu$ l de dNTPs, 0,5  $\mu$ l de RT polimerasa, 2  $\mu$ g de ARN y los  $\mu$ l necesarios en cada caso de H<sub>2</sub>O milliQ, hasta completar 20  $\mu$ l de volumen final.

Una vez preparada, la reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador iCycler IQ (BioRad; Hercules, CA, USA) siguiendo el programa especificado en las instrucciones: 10 minutos a 25 °C, 2 horas a 37 °C, 5 segundos a 85 °C. Los productos resultantes se limpiaron con el kit "PCR Clean-Up GenElute" (Sigma-Aldrich) como recomienda el fabricante. Las muestras con ADNc fueron diluidas 1:20 con agua para la realización de las reacciones de PCR, o se conservaron a -20 °C para su uso posterior.

### 3.1.3. Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa (qRT-PCR)

Los niveles de transcripción de los genes codificantes de las enzimas que participan en la síntesis de las HPSEs y las proteínas núcleo de los HSPGs en las muestras fueron analizados mediante técnicas de amplificación en tiempo real. Para cada gen se emplearon oligonucleótidos específicos (Tabla 4) situados en diferentes exones o uniones de exones (Fernández-Vega *et al.*, 2013).

En todos los casos, el tamaño de los amplicones se situó en el intervalo comprendido entre 70 y 150 pares de bases, y se comprobó que las temperaturas de fusión ( $T_m$ ) superasen los 77 °C; para cada amplicón se determinó la temperatura de fusión teórica utilizando el programa Biomath <https://www.promega.es/Resources/Tools/biomath/?fq=biomath>.

Las reacciones de qRT-PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 10  $\mu$ l, que incluía 1  $\mu$ l de del ADNc, 2  $\mu$ l de mezcla de oligonucleótidos del gen a analizar (directo y reverso) a una concentración final 200 nM, 2  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O milliQ y 5  $\mu$ l de PowerSYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Las reacciones se llevaron a cabo como mínimo por triplicado y se incluyó el gen de la actina en cada placa como un gen de control para comparar la variación de la amplificación y normalizar la expresión de los genes individuales. Una vez preparadas, las muestras fueron ensambladas en placas de microtitulación de 96 pocillos, selladas con película óptica y centrifugadas durante 5 minutos a 2.500 rpm.

La PCR a tiempo real fue llevada a cabo en un dispositivo de termociclación Real-Time HT7900 ABI Prism Detection System (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA), en los Servicios Científico Técnico de la Universidad de Oviedo. El programa utilizado fue: 10 minutos a 95 °C de temperatura, 50 ciclos de 15 segundos a 95 °C seguidos de 60 segundos a 60 °C y, finalmente, 60 segundos a 60 °C. Posteriormente, para evitar artefactos, se comprobó la especificidad de los productos obtenidos por PCR, verificándose para cada muestra un solo valor de  $T_m$  correspondiente al valor teóricamente esperado. Para ello, al fin de la reacción de PCR, se realizó un protocolo de disociación para cada amplicón empleando 95 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min, y luego incrementando 0.5 °C por ciclo, durante 80 ciclos de 10 segundos cada uno.



**Tabla 4. Oligonucleótidos directos y reversos utilizados y características de los amplicones obtenidos.**

Nº GEN	GEN ID		SECUENCIA
<b>PROTEÍNAS NÚCLEO</b>			
1	HPSE	(Gene ID 10855)	D5'→3' ATGCTCAGTTGCTCCTGGAC R5'→3' CTCCTAACTGCGACCCATTG
2	HPSE2	(Gene ID 60495)	D5'→3' CACCCTGATGTTATGCTGGAG R5'→3' TCCAGAGCAATCAGCAAAGTTA
3	SDC1	(Gene ID 6382)	D5'→3' CTCAGGTGCAGGTGCTTTG R5'→3' CTGCGTGTCTTCCAAGTG
4	SDC2	(Gen ID 6383)	D5'→3' GATGACGATGACTACGCTTCTG R5'→3' TGGAAGTGGTCGAGATGTTG
5	SDC3	(Gene ID 9672)	D5'→3' CTCCTTTCCCGATGATGAAC R5'→3' CGACTCTGCTCGAAGTAGC
6	SDC4	(Gene ID 6385)	D5'→3' GGCAGGAATCTGACTTTG R5'→3' TCTAGAGGCACCAAGGGATG
7	GPC1	(Gene ID 2817)	D5'→3' CATCGGGTGTGGAGAGTG R5'→3' TGAGCGTGTCCCTGTTGTC 3
8	GPC2	(Gene ID 221914)	D5'→3' CTGGGACACGACCTGGAC R5'→3' GCCATCCAGTCATCTGCATAC
9	GPC3	(Gene ID 2719)	D5'→3' CTGCTTCAGTCTGCAAGTATGG R5'→3' GTGGAGTCAGGCTTGGGTAG
10	GPC4	(ID de gen 2239)	D5'→3' AGTGTGGTCAGCGAACAGTG R5'→3' CAAACATATCATTACAGGATTTCTC
11	GPC5	(Gene ID 2262)	D5'→3' GCCGCCCTGTAAGAACAC R5'→3' TCATTCCATGCTTCTCTTTGC
12	GPC6	(Gene ID 10082)	D5'→3' CCAGGCATAAGAAATTTGACG R5'→3' CATGTACAGCATGCCATAGGTC
13	AGRN	(Gene ID 375790)	D5'→3' ACTGTGTCTGCCCCGATGC R5'→3' GACTCTGTTGCCGTATGTG
14	COL18A1	(Gene ID 80781)	D5'→3' GTACAAGGGAGAGATTGGCTTTC R5'→3' TTTCTCTCCTTTCAATCCGTTT
15	PRCAN	(Gene ID 3339)	D5'→3' TGGACACATTCGTACCTTTCTG R5'→3' CACTGCCAGGTCGTCTC
16	NRP1	(Gene ID 8829)	D5'→3' CAACGGGGAAGACTGGATCAC R5'→3' AGTTGCAGGCTTGATTGCGGA
17	SRGN	(Gene ID 5552)	D5'→3' TCCTGGTTCTGGAATCCTCA R5'→3' TCTTGTGGATTACCTGGAA
18	TGFBR3	(Gene ID 7049)	D5'→3' AGTGTGAGCTGACGCTGTGTA R5'→3' GGGCTTAGTGAACTCTTCTTATTC
<b>GENES CONTROL</b>			
¥	Actina	ACT	R5'→3' GGCCAACCGCGAGAAGATGACC
			D5'→3' GTACAGGGATAGCACAGCCTGG

#### 3.1.4. Análisis de los datos

Para calcular las eficiencias de amplificación para cada gen utilizamos el programa LinRegPCR (<http://www.gene-quantification.de/download.html>), tomando el mejor coeficiente de correlación (después de considerar un mínimo de 3 puntos dentro de la ventana de linealidad) y estableciendo el promedio de todas las amplificaciones positivas. Los valores de expresión de los genes de interés se calcularon como  $(1 + \text{eficiencia})^{-\Delta\text{Ct}}$  (en relación con la actina como gen de mantenimiento). Los datos proporcionados por la qRT-PCR se analizaron con el programa SDS 2.3 y RQ Manager 1.2 de AppliedBiosystems. El análisis estadístico se realizó con el test no paramétrico U de Mann-Whitney-Wilcoxon, comparando los resultados, de cada gen y cada zona, de pacientes controles y con grados leve, moderado y severo de EA. Se aceptaron como significativos los valores que cumplieran  $p < 0,05$ . Para estos cálculos se utilizó el programa Statistica para Windows (Statsoft Inc.; Tulsa, OK, USA).

#### 3.1.5. Inmunohistoquímica

Las secciones de tejido incluidas en parafina se trataron con xileno para hacerlas diáfanos (la parafina se eliminó más tarde pasándola a través de concentraciones de alcohol decrecientes hasta que se alcanzó el 100% de agua). Las secciones rehidratadas se enjuagaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía Tween-20 al 1%. Para la detección de HPSE2, las secciones se calentaron en solución de recuperación de diana Envision FLEX de alto pH a 65°C durante 20 min y luego se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente en la misma solución. Para la detección de HPSE, se omitió el paso final. Se bloquearon la actividad peroxidasa endógena (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y la unión inespecífica (33% suero de ternero fetal) y las secciones se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpos primarios para HPSE 1 y 2 usando una dilución 1: 100. Para las proteínas núcleo de describen las siguientes concentraciones experimentales: SDC1 a dilución 1: 100; SDC4 a una dilución 1: 100; GPC4 a una dilución 1: 100; GPC6 a una dilución 1:50; NRP1 a una dilución 1:50 y SRGN a una dilución 1: 200. Se utilizó polímero-HRP marcado listo para usar (Dako, España) como anticuerpo secundario, y se empleó diaminobencidina 3-3 'como cromógeno. Finalmente, las muestras fueron contrateñidas con hematoxilina, deshidratadas y montadas en Entellan® (Merck, Alemania). Las secciones se estudiaron y fotografiaron con un microscopio óptico (Nikon - Eclipse 80i).

##### 3.1.1. Evaluación de inmunohistoquímica

Los niveles de expresión de proteínas y su localización fueron evaluados por dos expertos independientes y en caso de desacuerdo, un tercero.

## 4. CAPITULO I

---

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LAS HEPARANASAS EN  
CEREBROS CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER



## 4.1. INTRODUCCIÓN

---

La complejidad estructural del HS no se alcanza únicamente a través del procedimiento biosintético, sino que las cadenas polisacáridicas pueden experimentar también modificaciones selectivas a nivel extracelular por diversos mecanismos enzimáticos, entre los que destacamos a la HPSE. Las cadenas de HS pueden ser fragmentadas por la acción de un enzima denominado HPSE (Vlodavsky *et al.*, 2002), una endo- $\beta$ -D-glucuronidasa que hidroliza enlaces concretos dentro las cadenas de HS, originando fragmentos de tamaño comprendido entre 10 y 20 unidades sacarídicas. Los fragmentos poseen pesos moleculares situados entre 5 a 7 KDa y son capaces de contener distintas actividades biológicas (Freeman & Parish, 1998). McKenzie *et al.* publicaron en el año 2000 la clonación de cADN humano con un 40% de homología con la HPSE. La expresión de este clon llamado HPSE2, resultó en una proteína sin actividad catalítica y cuya función es aún poco conocida (McKenzie, 2007). A pesar de la existencia de distintas HPSEs de mamíferos, la HPSE1 es la única enzima capaz de degradar el HS (Nasser *et al.*, 2007).

En relación con la neurodegeneración, se han descrito varios trabajos donde se afirma que la HPSE puede tener un papel relevante tanto en las enfermedades por amiloide como es la EA como en la propia neuroinflamación (Li & Zhang, 2020; Xiao Zhang *et al.*, 2014). Se ha visto que la HPSE podría tener una participación activa en el desarrollo de infartos cerebrales, tumores cerebrales y diferentes enfermedades neurodegenerativas a destacar la EA y la esclerosis múltiple (Changyaleket *et al.*, 2017). Así, entre otros trabajos, destacamos uno publicado recientemente y que usando modelos animales afirma que la HPSE podría impedir el aclaramiento de  $A\beta$  de las paredes vasculares cerebrales a través de la fragmentación del HS de la Barrera hematoencefálica facilitando el desarrollo de la EA (Xiao Zhang *et al.*, 2021). No obstante, en lo referido a la EA, existen funciones potencialmente contradictorias atribuidas a la HPSE. Por un lado, la HPSE podría bloquear la internalización y propagación de la proteína tau hiperfosforilada por todo el cerebro; y por otro lado, la HPSE podría afectar la respuesta inflamatoria y el aclaramiento de  $A\beta$  mediado por macrófagos favoreciendo la progresión de la EA (G. L. Zhang *et al.*, 2014). En este sentido, pretendemos describir las alteraciones en los niveles de expresión de los genes *HPSE1* y *HPSE2* en pacientes con EA y localizar las enzimas a nivel tisular para tratar de dilucidar el papel de estas proteínas en la patogénesis de la EA.

## 4.2. RESULTADOS

---

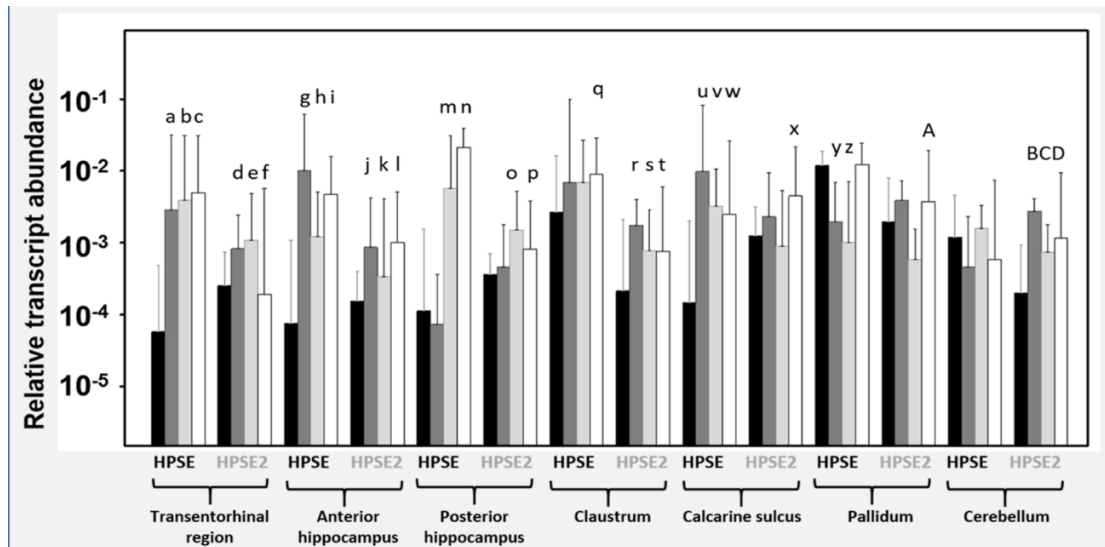
### 4.2.1. Análisis de la expresión diferencial de los genes

Se ha desarrollado un estudio para determinar diferencias en la expresión de los genes que codifican la HPSE y HPSE 2 en pacientes con EA. Los pacientes fueron clasificados en tres categorías según el grado de afectación: leve, moderado y severo. Se introdujo un grupo control de pacientes sanos, sin EA en el momento de la autopsia. Se incluyeron enfermos de ambos sexos, con edades comprendidas entre 52 y 103 años. Se registró también el intervalo de tiempo (entre 10 y 24 horas) transcurrido desde el fallecimiento hasta la realización de la autopsia, así como el peso en gramos de los cerebros analizados. De cada paciente se obtuvo una muestra de 6 zonas de cerebro y una zona de cerebelo como se describió en el apartado de material y métodos. La cuantificación de los resultados obtenidos tras la técnica de qRT-PCR, así como su localización e identificación por técnicas IHQs se describen a continuación en los siguientes apartados.

#### 4.2.1.1. Expresión diferencial del gen que codifica a la HPSE

El análisis de los niveles de transcripción del gen *HPSE* mediante qRT-PCR detectó niveles de expresión en todas las muestras estudiadas. Hubo diferencias estadísticamente significativas en las alteraciones entre los estadios de EA según la definición de estadios de Braak y Braak. Además, se observó una sobreexpresión significativa de *HPSE* en áreas neurodegeneradas de cerebros con EA. La región transentorrinal, el hipocampo anterior y posterior y la cisura calcarina fueron las áreas donde más se sobreexpresó la *HPSE* observando niveles de expresión superiores a dos órdenes de magnitud a nivel del hipocampo posterior en cerebros con EA severo en comparación con el tejido sano. Además, se observó una subexpresión significativa de *HPSE* en el pallidum en cerebros con EA leve y moderada.

El cerebelo de los cerebros en diferentes etapas de la EA no mostró alteraciones significativas para los niveles de transcripción de *HPSE* (Figura 14).



**Figura 14. Transcripción diferencial de *HPSE* y *HPSE 2* en la EA.** La abundancia relativa para controles (barras negras), EA leve (barras de color gris oscuro), EA moderada (barras de color gris claro) y la EA grave (barras blancas) se representan en una escala logarítmica para cada gen analizado. Los diferenciales representan desviaciones estándar. Se destacan los genes y las zonas que muestran diferencias significativas en sus niveles de transcripción. a:  $p = 0.000011$ ; b:  $p = 0.000001$ ; c:  $p = 0.000000$ ; d:  $p = 0.013545$ ; e:  $p = 0.01817$ ; f:  $p = 0.026365$ ; g:  $p = 0.000005$ ; h:  $p = 0.002675$ ; i:  $p = 0.000021$ ; j:  $p = 0.043012$ ; k:  $p = 0.013804$ ; l:  $p = 0.000149$ ; m:  $p = 0.000079$ ; n:  $p = 0.000000$ ; o:  $p = 0.025297$ ; p:  $p = 0.048391$ ; q:  $p = 0.024351$ ; r:  $p = 0.001165$ ; s:  $p = 0.041894$ ; t:  $p = 0.037990$ ; u:  $p = 0.000007$ ; v:  $p = 0.000063$ ; w:  $p = 0.005458$ ; x:  $p = 0.005616$ ; y:  $p = 0.000002$ ; z:  $p = 0.000009$ ; A:  $p = 0.012136$ ; B:  $p = 0.001540$ ; C:  $p = 0.004565$ ; D:  $p = 0.007672$ . Los valores en el eje Y se representan en escala logarítmica.

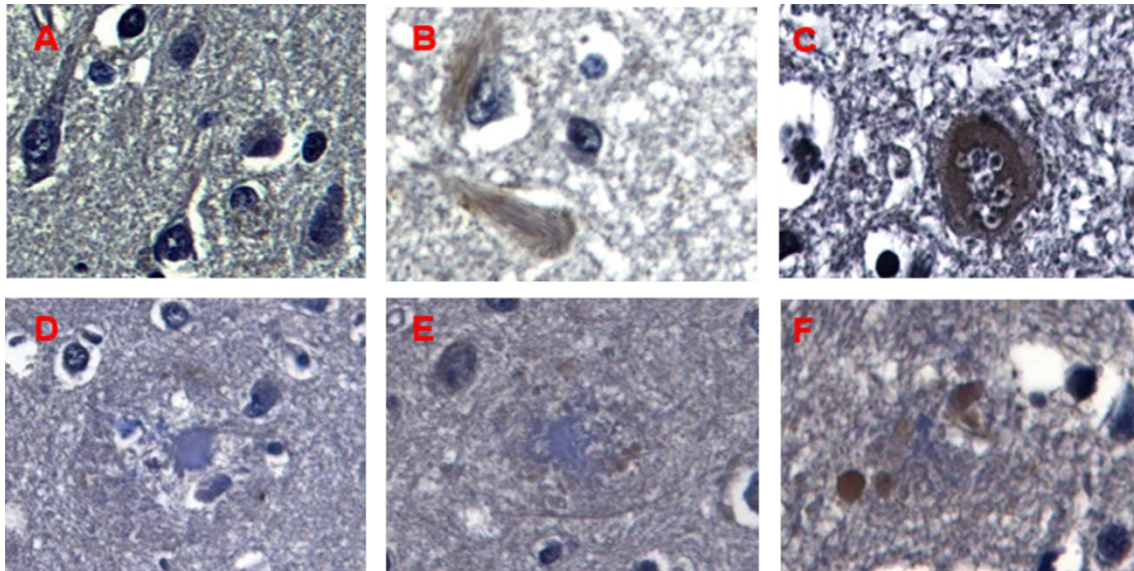
En comparación con el tejido sano, la IHQ mostró la presencia de depósitos intracelulares de HPSE en neuronas atroficas con ONFs.

A nivel extracelular, la HPSE se observó principalmente en PN con núcleo fragmentado en lugar de aquellos con un gran núcleo denso, lo que apunta a la existencia de un gradiente de expresión de HPSE. Los ganglios basales y el cerebelo fueron en su mayoría negativos (Figura 14).

#### 4.2.1.2. Expresión diferencial del gen que codifica la HPSE 2

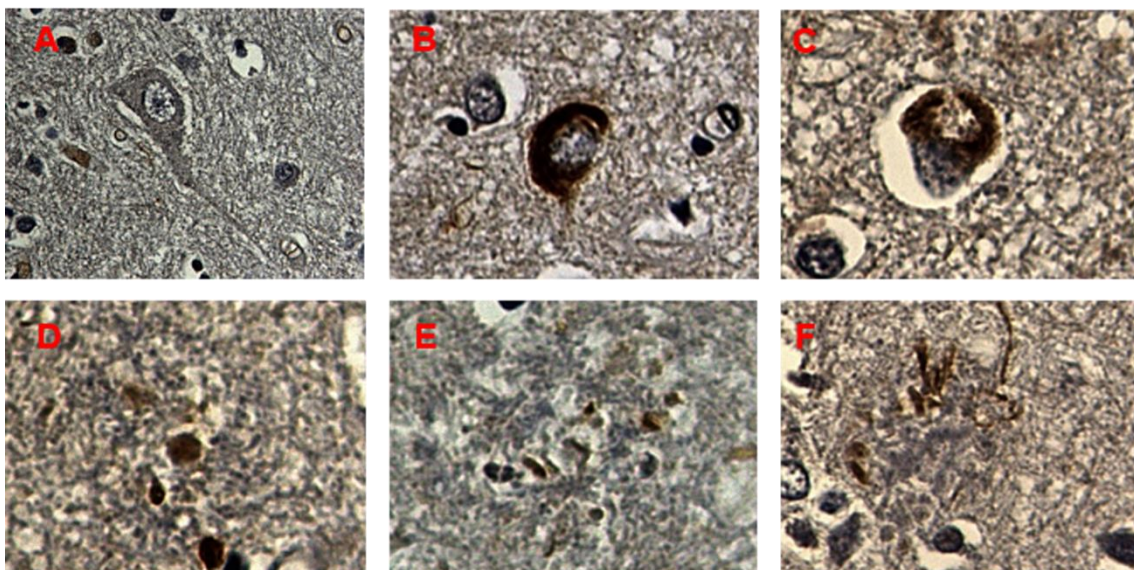
Analizamos los niveles de transcripción de *HPSE2* en tejido cerebral observando una expresión en todas las muestras estudiadas. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas dependientes del estadio (Basadas en Braak & Braak, 1991) en los cerebros con EA. Además, se observó una sobreexpresión significativa de *HPSE2* principalmente en áreas neurodegeneradas de cerebros con EA y en el cerebelo en todos los casos de EA. A nivel del pallidum, por otro lado, no se observaron alteraciones significativas de los niveles de transcripción de *HPSE2* (Figura 15).





**Figura 15. Tinción IHQ de HPSE en la EA.** A) Expresión negativa de HPSE en neuronas y células gliales en muestras de cerebro control. B, C) Sobreexpresión de HPSE en neuronas con ONFs (B) y degeneración granulovacuolar (C). D-F) NP que muestran diferentes tamaños de núcleo, de grandes a medianos y pequeños (flechas blancas); en correlación inversa con los depósitos de HPSE desde niveles leves (D) a moderados (E) y altos (F). Ampliación 600X.

La expresión de la proteína HPSE2 se analizó mediante IHQ, mostrando la presencia de depósitos intracelulares de HPSE2 en neuronas atroficas con degeneración neurofibrilar. A nivel extracelular, se observó HPSE2 en casi todas las PN. HPSE2 fue indetectable en el pallidum y cerebelo, aunque este último mostró una positividad difusa muy leve (Figura 16).



**Figura 16. Tinción IHQ de HPSE 2 en la EA.** (A) Expresión negativa de HPSE2 en neuronas y células gliales en muestras de cerebro de control. (B, C) Sobreexpresión de HPSE2 en neuronas con ONFs (B) y degeneración granulovacuolar (C). (D, E, F) NP que muestran diferentes formas de depósitos HPSE 2. Los depósitos concentrados



en el núcleo no fragmentado de NP (D), los depósitos dispersos (E) y los depósitos filamentosos se indican (F). Ampliación 600X.

### 4.3. DISCUSIÓN

---

La EA es un trastorno neurodegenerativo progresivo mortal causado principalmente por la acumulación extracelular de proteína A $\beta$  en placas, que se cree que explica el inicio de la neurodegeneración. Varios estudios *in vitro* han demostrado la interacción de A $\beta$  con HS (Bame *et al.*, 1997; Leveugle *et al.*, 1994). Además, trabajos previos han demostrado que las moléculas de HS se colocan preferentemente con A $\beta$  alrededor de los núcleos densos de las placas seniles (Jendresen *et al.*, 2015; O'Callaghan *et al.*, 2008) y se ha propuesto que la interacción A $\beta$ -HS es mutuamente protectora, ya que A $\beta$  está protegido de la degradación de proteasas y HS está protegido de la degradación de la HPSE (Bame *et al.*, 1997; Gupta-Bansal *et al.*, 1995). La HPSE es una proteína multitarea caracterizada por su participación en actividades enzimáticas y no enzimáticas. La primera actividad da lugar a fragmentos de cadenas de HS que participan biológicamente en múltiples funciones fisiológicas y patológicas (Vlodavsky *et al.*, 2002). Gracias a la escisión de HS, la HPSE también promueve la liberación y difusión de varias moléculas unidas al HS, como factores de crecimiento, citocinas y enzimas. Además de degradar las moléculas de HS, la HPSE tiene funciones no enzimáticas que desencadenan diferentes vías de señalización intracelular (Moretti *et al.*, 2006). En el presente capítulo de investigación nos hemos centrado en el estudio de los niveles de expresión de 2 genes que codifican las HPSEs en diferentes etapas de la EA mediante qRT-PCR y, posteriormente hemos localizado a nivel tisular las proteínas mediante técnicas de IHQ.

Con respecto a la *HPSE*, se observó una sobreexpresión significativa en áreas neurodegeneradas de cerebros con EA que en su mayoría se correlacionaron bien con los estadios de Braak & Braak para cada caso. Especulamos que la sobreexpresión de *HPSE* en la EA podría ser una consecuencia de la enfermedad en sí misma, en lugar de ser parte de la causa. Bajo este escenario, diferentes tipos de células liberarían HPSE para reducir la patología existente de la EA al degradar las cadenas de HS, exponiendo los depósitos de A $\beta$  a la degradación (Lorente-Gea *et al.*, 2017). Estudios recientes mediante análisis bioinformáticos potentes han observado la alteración de decenas de genes en la EA, destacando una sobreexpresión de la *HPSE* vinculada preferentemente a rutas relacionadas con el sistema inmune (Yan *et al.*, 2019).

Diferentes enfoques de tratamiento han intentado centrarse en inhibir la agregación de tau o bien de reducir los depósitos de A $\beta$  mediante la disminución de la producción, la prevención de la agregación o el aumento de la eliminación (Serenó *et al.*, 2009; Wischik *et al.*, 1996). Se han realizado

múltiples ensayos clínicos para los tratamientos de la EA y, aunque la mayoría no han resultado concluyentes (Honig *et al.*, 2018; Mangialasche *et al.*, 2010; Mintun *et al.*, 2021; Schneider *et al.*, 2014; Sperling, Jack, *et al.*, 2011; Vellas *et al.*, 2007; Wessels *et al.*, 2020; Winblad *et al.*, 2012) se siguen buscando otras opciones de tratamiento. Sin embargo, en nuestra opinión, la falta de progreso en el tratamiento de la EA se debe a que la mayoría de los estudios han subestimado las propiedades funcionales o estructurales de las moléculas de HS en la EA (Aprahamian *et al.*, 2013). Datos publicados indican que se requieren cadenas de HS intactas en múltiples sitios para mediar en la neurodegeneración, lo que respalda aún más la idea de que la HPSE es posiblemente un elemento crucial que puede tener implicaciones potenciales en el tratamiento de la EA (Xiao Zhang *et al.*, 2014). Además, la evidencia experimental reciente sugiere que la propagación transcelular de agregados de proteínas fibrilares impulsaría la progresión de enfermedades neurodegenerativas de una manera priónica (Brundin *et al.*, 2010). Asimismo, el mecanismo por el cual las proteínas extracelulares agregadas, como la tau, se unen y entran en las células para desencadenar la formación de fibrillas intracelulares se produce a través de la unión a los HSPGs (Holmes *et al.*, 2013). La HPSE podría, por tanto, actuar para modular o impedir este proceso, como lo hace la heparinasa III *in vitro* para ralentizar la neurodegeneración (Holmes *et al.*, 2013). Sin embargo, existen funciones potencialmente contradictorias que se pueden atribuir a la HPSE en la EA. Por un lado, la HPSE podría afectar la respuesta inflamatoria y el aclaramiento de A $\beta$  mediado por macrófagos favoreciendo la progresión de la EA (Xiao Zhang *et al.*, 2021). Por otro lado, la HPSE podría bloquear la internalización y propagación de la tau patológica por todo el cerebro (Holmes *et al.*, 2013; Xiao Zhang *et al.*, 2012). La sobreexpresión significativa de la HPSE en el surco calcarino (neocorteza) en las primeras etapas de la EA podría explicarse por la existencia de depósitos extracelulares relacionados con PNs fragmentadas. Asimismo, la subexpresión significativa de la HPSE en el pallidum podría ser el resultado de una fuerte difusión de la HPSE a las áreas con neurodegeneración, incluso en las primeras etapas de la enfermedad. Y finalmente, hemos encontrado la presencia de HPSE principalmente en aquellas PNs con un núcleo fragmentado, lo que posiblemente contribuya a romper dichas placas y exponer A $\beta$  a la degradación (Reilly, 2000; Shimizu *et al.*, 2009; Alan David Snow, Sekiguchi, Nochlin, Fraser, *et al.*, 1994).

En nuestro trabajo hemos observado que la HPSE2 se sobreexpresó significativamente en los casos de EA, al igual que la HPSE, aunque con niveles más bajos de ARNm. De manera similar a los hallazgos para la HPSE, los cambios significativos en la HPSE2 fueron en su mayoría dependientes de la etapa de EA. Histológicamente, se encontró que la HPSE2 estaba asociado con PNs y ONFs. Además, se observó una inmunotinción neuropílica difusa leve en áreas relacionadas con la EA y en el cerebelo. En este sentido, la HPSE2 se une a los HSPGs pero, a diferencia de la HPSE, no se internaliza y

permanece en la superficie celular durante un período de tiempo relativamente largo (Levy-Adam *et al.*, 2010). Hasta la fecha no se dispone de una caracterización detallada de la HPSE2 a nivel bioquímico, celular y clínico, y su función en la fisiología normal y en los trastornos patológicos no está clara. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la HPSE2 es un inhibidor endógeno de la actividad de la HPSE, probablemente debido a su alta afinidad por el HS y su capacidad para asociarse físicamente con la HPSE (Levy-Adam *et al.*, 2010). En este sentido, la HPSE2 podría inhibir la actividad de la HPSE, facilitando la progresión de la patología de la EA al impedir la eliminación de los depósitos de  $A\beta$  y dar lugar a una mayor internalización y propagación de la proteína tau patológica por todo el cerebro (Lorente-Gea *et al.*, 2017).

En conclusión, nuestro estudio revela detalles del comportamiento de ambas HPSEs en la EA, apuntando a la sobreexpresión combinada de la *HPSE* y la *HPSE2*, mayoritariamente relacionada con la patología de la EA. Mientras que la actividad de la HPSE parecería liberar depósitos de  $A\beta$  o bloquear la formación y propagación de fibrillas intracelulares de tau, la HPSE2 parece actuar como un inhibidor de la HPSE. Finalmente, la relevancia, tanto biológica como clínica, para el estudio de ambas HPSEs se basa en el hecho de que ninguna otra molécula es capaz de realizar la misma función, lo que convierte a ambas enzimas en un objetivo potencial atractivo para el tratamiento médico. En este sentido, considerando que la interacción HS- $A\beta$  contribuye a todas las etapas de la patogénesis de  $A\beta$  en la EA, incluida la producción, aclaramiento, acumulación, agregación y toxicidad, es lógico plantear la hipótesis de que la interferencia en la interacción HS- $A\beta$  puede tener múltiples efectos beneficiosos.

## 4.4. PERSPECTIVA

NEURAL REGENERATION RESEARCH  
June 2017, Volume 12, Issue 6

www.nrronline.org



### ● PERSPECTIVE

#### Heparan sulfate proteoglycans and heparanases in Alzheimer's disease: current outlook and potential therapeutic targets

**Relevance of Alzheimer's disease (AD):** AD is one of the greatest health-care challenges of the 21<sup>st</sup> century. It is known to be the most common neurodegenerative disease and, in the United States, the sixth most common cause of death. It is estimated that 40 million people in the world suffer from dementia, mostly people older than 60 years. With the increase of the survival, this incidence is projected to be doubled every 20 years (Scheltens et al., 2016). Between 1997 and 2050, the elderly population, defined as subjects 65 years of age and older, will increase from 63 to 137 million in the Americas, from 18 to 38 million in Africa, from 113 to 170 million in Europe, and from 172 to 435 million in Asia, so we are looking straight to a public health problem.

There is evidence enough to say that AD pathology starts depositing in the brain in midlife although clinical symptoms remain silent until 65 years and older. The greatest risk factor for the development of AD is old age, but by itself is not enough to cause the disease. Other major risk factors include the presence of one or more apolipoprotein gene E4 alleles, low educational and occupational attainment, family history of AD, moderate or severe traumatic brain injuries, and cardiovascular risk factors (Apostolova, 2016)

A lot of researches have been done since the discovering of amyloid  $\beta$  peptide ( $A\beta$ ) and Tau, the main components of plaques and tangles respectively, but there is a lack of knowledge about its etiopathogenesis and despite decades of study, there is no disease-modifying therapy so far. We should assume it is time to change the focus towards new therapeutic targets and molecular pathways.

**Understanding the pathogenesis:** The principal pathological lesions in AD are described by "the amyloid hypothesis of AD": neuritic plaques (NPs), neurofibrillary tangles (NFTs) and cerebral amyloid angiopathy, which are associated with both neuronal and vascular degeneration. AD is broadly recognized as a proteinopathy-driven disease, essentially by two types of abnormal protein deposition in the human brain:  $A\beta$  in neuritic plaques, which is an extracellular deposit that produces neurotoxicity; and intracellular store of hyperphosphorylated forms of a microtubule associated protein Tau, in NFTs (Selkoe and Hardy, 2016) that triggers neuronal death. However, at present, basic research has sentenced that AD is in fact, a multifactorial disease, leading to novel approaches moving from old therapies to multi-target treatments, which allow us to achieve a successful understanding of this condition.

On the basis of previous studies and considering the drugs already used in therapy, the most investigated targets are inhibition of acetylcholinesterase, chelation of copper, iron and/or zinc cations, antioxidant activity, inhibition of  $A\beta$  amyloid plaques aggregation, monoamine oxidase enzymes inhibition, and NMDA receptor antagonism. The reduction of chronic inflammation by peroxisome proliferator-activated receptor agonists may represent a strategy to protect neuronal cells that

are compromised in these diseases (Lacey and Evans, 2014). However, further studies are needed to find a curative and/or prophylactic treatment.

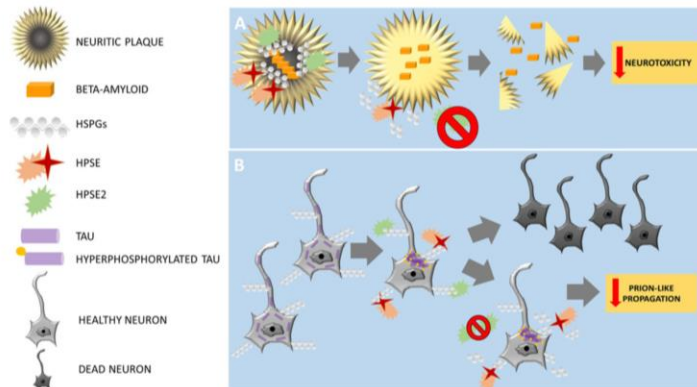
**Heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) family:** HSPGs constitute a heterogeneous family of complex biological macromolecules composed of heavily glycosylated molecules, in which several heparan sulfate (HS) glycosaminoglycan (GAG) chains are covalently attached to a core protein. Cell surface HSPGs are membrane-spanning syndecans and lipid-anchored glypicans. Secreted HSPGs are agrin, collagen type XVIII, and perlecan (Zhang et al., 2014). The pathological mechanism of these macromolecules is thought to be promoting  $A\beta$  fibrillation giving rise NPs and providing resistance against proteolytic breakdown (Figure 1A). In addition, previous data have pointed out that the HS- $A\beta$  interaction contributes to every stage of pathogenesis in AD, including production, clearance, accumulation, aggregation, and toxicity of  $A\beta$  (van Horsen et al., 2002; Cui et al., 2013). Moreover, work over the last decade indicates that Taupathology can propagate between cells in a prion-like manner mediated by HSPGs (Holmes and Diamond, 2014).

**Heparanase (HPSE) and HPSE2:** HPSE is an endo-D-glucuronidase that cleaves specific linkages in the structure of HS, yielding biologically active fragments. By altering HSPGs on the cell surface, HPSE is thought to regulate the cellular response to external stimuli. HPSE takes part in multiple functions in cancer, inflammation, infections, diabetes, and atherosclerosis, and in terms of neurodegeneration (Garcia et al., 2016). In fact, recent studies have shown that overexpression of HPSE lowers the amyloid burden in transgenic mouse models of AD (Jendresen et al., 2015). HPSE2 is a homologue of HPSE that lacks HS-degrading activity, although it is able to interact with HS with high affinity (Levy-Adam et al., 2010). HPSE2 may act as a natural competitive inhibitor of HPSE due to its ability to associate with HPSE. Moreover, it seems to modulate its enzymatic activity and signaling properties.

**HPSE2 as a potential therapeutic target:** A recent work by Garcia et al. (2017) studied the expression of HPSE and HPSE2 in AD brains. The results from HPSE showed overexpression in neurodegenerated areas of AD brains and the amount of expression was well correlated with Braak & Braak stage. As we know that HS- $A\beta$  joint may be useful for impeding  $A\beta$  degradation, this increase of expression may be a response from brain cells to reduce the existing AD pathogenesis by HS chains degradation. According to this hypothesis, the HPSE overexpression in this entity may be a consequence of the disease itself, rather than part of the cause. However, concerning HPSE2, the results were similar to HPSE. In addition, HPSE2 was also overexpressed in AD brains, mostly AD-stage-dependent. Histologically, both HPSE and HPSE2 were found to be associated with NPs and degenerated neurons with neurofibrillary tangles. Accordingly, HPSE2 may inhibit HPSE activity and, in consequence, may favour the progression of AD pathogenesis (Figure 1B). Consequently, blocking at different levels HPSE2 using target drugs should increase HPSE activity facilitating NPs degradation and thus decreasing neurotoxicity; and reducing prion-like propagation of hyperphosphorylated Tau in AD (Figure 1A and B).

**Conclusions:** HSPGs and HPSEs play a crucial role in AD pathogenesis. While HPSE activity may help to cease the progression of the disease by breaking down  $A\beta$ -HS deposits or blocking Tau intracellular fibril formation and propagation,





**Figure 1** Schematic representation of main Alzheimer's disease pathology and their proposed results after blocking HPSE2 at neuritic plaques (A) and neurons with neurofibrillary tangles (B). HPSE: Heparanase; HSPGs: Heparan sulfate proteoglycans.

HPSE2 appears to act as an inhibitor of HPSE. Thus, the blockade of HPSE by HPSE2 may interfere with its potential beneficial role in stopping AD pathogenesis. Furthermore, the lack of progress in AD investigation may be a consequence of the underestimation of the structural and molecular roles of HS molecules in AD pathogenesis. Preliminary studies are currently ongoing in our laboratory concerning HSPGs in order to better understand their roles in AD pathogenesis. Remarkably, no other molecules are capable of performing the same function, so both enzymes (HPSE and HPSE2) may become a potential target for therapeutic research. Although further research is needed in this field, the questions exposed before may open novel insights to AD pathogenesis and may lead to the development of innovative therapeutic strategies.

**Laura Lorente-Gea, Beatriz García, Carla Martín, Luis M. Quirós, Iván Fernández-Vega\***

Department of Pathology, Hospital Universitario de Araba-Txagorritxu, Vitoria-Gasteiz, Spain (Lorente-Gea L, Fernández-Vega I)

Department of Functional Biology, University of Oviedo, Oviedo, Spain (García B, Martín C, Quirós LM)

Instituto Universitario Fernández-Vega, Oviedo, Spain (García B, Martín C, Quirós LM, Fernández-Vega I)

Department of Pathology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain (Fernández-Vega I)  
BiobancoVasco para la Investigación (O+eHun), Brain Bank, Hospital Universitario Araba, Vitoria-Gasteiz, Spain (Fernández-Vega I)

\*Correspondence to: Iván Fernández-Vega, M.D., Ph.D., [ivan\\_fernandez\\_vega@hotmail.com](mailto:ivan_fernandez_vega@hotmail.com).

Accepted: 2017-06-12

orcid: 0000-0002-3141-6493 (Iván Fernández-Vega)

doi: 10.4103/1673-5374.208571

**How to cite this article:** Lorente-Gea L, García B, Martín C, Quirós LM, Fernández-Vega I (2017) Heparan sulfate proteoglycans and heparanases in Alzheimer's disease: current outlook and potential therapeutic targets. *Neural Regen Res* 12(6):914-915.

**Open access statement:** This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as the author is credited and the new creations are licensed under the identical terms.

**Contributor agreement:** A statement of "Publishing Agreement" has been signed by an authorized author on behalf of all authors prior to publication.

**Plagiarism check:** This paper has been checked twice with duplication-checking software iThenticate.

**Peer review:** A double-blind and stringent peer review process has been performed to ensure the integrity, quality and significance of this paper.

## References

- Apostolova LG (2016) Alzheimer disease. *Continuum (Minneapolis)* 22:419-434.
- Cui H, Freeman C, Jacobson GA, Small DH (2013) Proteoglycans in the central nervous system: role in development, neural repair, and Alzheimer's disease. *IUBMB Life* 65:108-120.
- García B, García-Suarez O, Fernández-Vega I, Vallina A, Astudillo A, Quiros LM (2016) Heparanase and heparanase 2 display differently deregulation in neuroendocrine tumors, depending on their differentiation grade. *Histol Histopathol* 31:73-81.
- García B, Martín C, García-Suarez O, Muniz-Alonso B, Ordiales H, Fernández-Menendez S, Santos-Juanes J, Lorente-Gea L, Castanon S, Vicente-Etxenautia I, Pina Batista KM, Ruiz-Diaz I, Caballero-Martinez MC, Merayo-Lloves J, Guerra-Merino I, Quiros LM, Fernández-Vega I (2017) Upregulated expression of heparanase and heparanase 2 in the brains of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 58:185-192.
- Holmes BB, Diamond MI (2014) Prion-like properties of Tau protein: the importance of extracellular Tau as a therapeutic target. *J Biol Chem* 289:19855-19861.
- Jendresen CB, Cui H, Zhang X, Vlodaysky I, Nilsson LN, Li JP (2015) Overexpression of heparanase lowers the amyloid burden in amyloid-beta precursor protein transgenic mice. *J Biol Chem* 290:5053-5064.
- Lacey R, Evans A (2014) An unusual cause of jaundice in a patient with breast cancer. *BMJ Case Rep* 2014:bcr2014205764.
- Levy-Adam F, Feld S, Cohen-Kaplan V, Shteingauz A, Gross M, Arvatz G, Naroditsky I, Ilan N, Doweck I, Vlodaysky I (2010) Heparanase 2 interacts with heparan sulfate with high affinity and inhibits heparanase activity. *J Biol Chem* 285:28010-28019.
- Scheltens P, Blennow K, Breteler MM, de Strooper B, Frisoni GB, Salloway S, Van der Flier WM (2016) Alzheimer's disease. *Lancet* 388:505-517.
- Selkoe DJ, Hardy J (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 8:595-608.
- van Horssen J, Kleinnijenhuis J, Maass CN, Rensink AA, Otte-Holler I, David G, van den Heuvel LP, Wesseling P, de Waal RM, Verbeek MM (2002) Accumulation of heparan sulfate proteoglycans in cerebellar senile plaques. *Neurobiol Aging* 23:537-545.
- Zhang GL, Zhang X, Wang XM, Li JP (2014) Towards understanding the roles of heparan sulfate proteoglycans in Alzheimer's disease. *BioMed Res Int* 2014:516028.



## 5. CAPITULO II

---

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LOS PROTEOGLICANOS DE  
HEPARÁN SULFATO EN CEREBROS CON ENFERMEDAD DE  
ALZHEIMER





## 5.1. INTRODUCCIÓN

---

Los HSPGs se encuentra en la superficie de todas las células y también en la MEC que las rodea, y participan muy directamente en múltiples procesos patológicos. Sus funciones vienen principalmente determinadas por la información biológica incluida en las cadenas de HS que se generan a través de modificaciones enzimáticas y cuyo resultado es un código molecular de información biológica transcendental (Bernfield *et al.*, 1992; Ori *et al.*, 2008; Ricard-Blum & Lisacek, 2017).

Los HSPGs están principalmente constituidos por cadenas de HS y algunos de ellos también pueden contener cadenas de CS, lo que incrementa su diversidad. Únicamente 13 proteínas aparecen habitualmente como HSPGs en el ser humano. Diez de ellas corresponden a dos familias de PGs de superficie celular, los SDC y los GPCs, aunque pueden ser liberados por proteólisis a la MEC (Hassan *et al.*, 2021). Los otros 3 HSPGs incluyen al PRCAN, la agrina (AGRN) y colágeno XVIII (COL18A1) (Iozzo & Schaefer, 2015; Sarrazin *et al.*, 2011). El primero se localiza en la membrana basal, pero como la AGRN y el COL18A1, también pueden localizarse en la MEC. Además, recientemente se ha descrito que el PRCAN puede encontrarse a nivel del núcleo celular y en zonas perinucleares (Smith & Melrose, 2015). Existe finalmente un grupo de HSPGs denominado "a tiempo parcial" y es un grupo heterogéneo de proteínas entre las que se encuentran la SRGN, el receptor CD44v3, el TGFBR3 y la neuropilina (NRP1) que pueden tener unidas o no moléculas de GAGs sulfatados (N. Watanabe *et al.*, 2004).

### 5.1.1. HSPG de superficie celular

#### 5.1.1.1. Sindecanos

Los SDCs constituyen una familia de PGs integrada por 4 miembros, denominados con los ordinales del 1 al 4. Son proteínas transmembrana constituidas por un dominio citoplasmático corto, un dominio transmembrana y un dominio extracelular o ectodominio al que se le pueden unir varias cadenas de GAGs. Los SDCs llevan ancladas cadenas de HS cerca de la región N-terminal y en algunas ocasiones pueden tener 1 o 2 cadenas de CS/DS situadas en proximidad a la superficie celular (Gondelaud & Ricard-Blum, 2019). Los SDCs se localizan preferentemente en la superficie externa de las células epiteliales. No obstante, se han descrito particulares excepciones en células con ascendencia mesodérmica y neuroectodérmica. Por ejemplo, el SDC1 ha sido identificado en el músculo esquelético (Liu *et al.*, 2004), el SDC2 en fibroblastos y hepatocitos (David, 1993) y el SDC3 en el tejido neural, muscular y células satélite miogénicas (Cornelison *et al.*, 2001). El SDC4 es el que tiene una expresión menos selectiva, habiéndose identificado en células epiteliales,

endoteliales, fibroblastos, células musculares, condrocitos y tejido neural (Cornelison *et al.*, 2001). En relación con la EA se ha descrito que los SDCs aumentan su expresión en esta enfermedad y participan preferentemente en la formación de las placas neuríticas a diferentes niveles del procesamiento de A $\beta$  (Hudák *et al.*, 2021).

#### 5.1.1.2. Glipicanos

La familia de los GPCs está compuesta por 6 miembros denominados con los ordinales del 1 al 6. A diferencia de los SDCs se caracterizan por estar únicamente constituidos por cadenas de HS y estar anclados a la superficie externa celular mediante un grupo glicosilfosfatidilinositol (GPI), careciendo así de un dominio transmembrana. La proteína núcleo está constituida por un ectodominio globular con múltiples residuos de cisteína formando puentes disulfuro, una región que se extiende próxima a la membrana plasmática con 3 sitios de unión a HS y una región hidrofóbica C-terminal implicada en el anclaje de GPI. Los GPCs tienden a localizarse en áreas de membrana ricas en colesterol o lípidos y en la superficie de células polarizadas (Filmus *et al.*, 2009). La localización de cada GPC está preferentemente restringida durante el desarrollo a determinados órganos. El GPC1 se encuentra preferentemente en el cerebro, riñón y músculo esquelético (Liu *et al.*, 2004). El GPC2 se expresa principalmente en el sistema nervioso (Kurosawa *et al.*, 2001). El GPC3 aparece en los tejidos mesodérmicos y durante el desarrollo del intestino (Pellegrini *et al.*, 1998). El GPC4 aparece en los vasos sanguíneos, riñón, cerebro y córtex adrenal (K. Watanabe *et al.*, 1995). El GPC5 es relevante para el desarrollo del riñón, extremidades y cerebro (Veugelers *et al.*, 1997). El GPC6 muestra una expresión menos específica, aunque predomina en el riñón fetal humano. La expresión también ha sido detectada en células del músculo liso de la aorta, células mesenquimales del intestino, riñones, pulmón, dientes y gónadas (Veugelers *et al.*, 1999).

Desde el punto de vista de la implicación de los GPCs en la neurodegeneración se ha descrito al GPC1 como el principal miembro implicado en la patogénesis de la EA a través preferentemente de la formación de placas de A $\beta$  (N. Watanabe *et al.*, 2004).

#### 5.1.2. HSPG de MEC

##### 5.1.2.1. Perlecano

El PRCAN es un HSPG situado preferentemente en las membranas basales (Bonche *et al.*, 2021). La proteína núcleo del PRCAN es de aproximadamente 400 kDa con 5 regiones únicas. El dominio I contiene 3 cadenas de HS además de una estructura semejante a enterocinasa (Melrose *et al.*, 2006). El dominio II contiene un receptor de lipoproteínas de baja densidad y una repetición de

estructuras tipo IgG; el dominio III es similar al brazo corto de la cadena de laminina A conectada por repeticiones tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF) de la laminina 1; el dominio IV contiene repeticiones tipo IgG de moléculas de adhesión neural (Hopf *et al.*, 1999); por último, el dominio V tiene tres dominios globulares con homología a la laminina 1 conectados por repeticiones tipo factor de crecimiento epidérmico (Brown *et al.*, 1997). Entre las principales funciones del PRCAN destacan la participación en procesos de organogénesis, cicatrización de heridas y angiogénesis. Además, se ha descrito que la degradación del PRCAN genera fragmentos bioactivos como la endorrepelina con actividades completamente diferentes a las de los HSPGs, fundamentalmente angioestáticas (Melrose, 2020).

En relación con los procesos de neurodegeneración se ha descrito al PRCAN como una molécula presente principalmente en placas difusas de amiloide pero también en placas neuríticas de la EA (Alan D. Snow *et al.*, 1996; Alan David Snow, Sekiguchi, Nochlin, Kalara, *et al.*, 1994). Se han realizado estudios donde se ha observado un incremento en los niveles de expresión de PRCAN en la EA (Lepelletier *et al.*, 2017). Además, recientemente se ha descrito varios factores de riesgo vascular en demencia directamente asociados con alteraciones en el PRCAN (Trout *et al.*, 2020).

#### 5.1.2.2. Agrina

La AGRN, al igual que el PRCAN y otras proteínas de membrana basal, presenta una composición en dominios estructurales con regiones comunes. La región N-terminal presenta 9 dominios tipo folistatina. La región C-terminal contiene tres módulos de laminina G y tres repeticiones tipo EGF. La AGRN contiene dos regiones particularmente favorables para el anclaje de HS, ambas localizadas en la parte central de la molécula y en la región N-terminal (Groffen *et al.*, 1998). Esta molécula se distribuye por membranas basales, pero particularmente en uniones neuromusculares y sinapsis, desempeñando fundamentalmente una función de organización y mantenimiento de dichas estructuras (Bezakova & Lømo, 2001; Nicole *et al.*, 2014).

En relación con las enfermedades neurodegenerativas y más en particular con la EA, se ha descrito ya desde hace más de dos décadas que la AGRN es uno de los principales HSPGs que se acumulan en cerebros con EA y en relación con la patología típica de la enfermedad (Verbeek *et al.*, 1999).

#### 5.1.2.3. Colágeno XVIII

El COL18A1 está codificado por el gen *COL18A1*. Esta molécula se sitúa preferentemente en membranas basales epiteliales y endoteliales (Dong *et al.*, 2003). Esta molécula forma parte de la subfamilia de las multiplexinas y es un HSPG caracterizado por tener 10 dominios centrales colagenosos (triple hélice)

interrumpidos y flanqueados por extensiones amino y carboxilo terminales no colagenosos. Estas regiones sin conformación en triple hélice son las que contienen 8 sitios de glicosilación responsables del anclaje de las cadenas de HS. El extremo C-terminal del COL18A1 se conoce como endostatina y se le han atribuido funciones anti-angiogénicas y antitumorogénicas (Lakshmanachetty & Koster, 2016; Pollheimer *et al.*, 2004).

En relación con la neurodegeneración, se han descrito estudios que describen la participación de COL18A1 en los depósitos de amiloide en paredes vasculares y en placas en la EA, así como el depósito aberrante de endostatina a nivel neuronal y paracelular (Deininger *et al.*, 2002; Jack Van Horssen *et al.*, 2002).

### 5.1.3. HSPGs "a tiempo parcial"

Los HSPGs "a tiempo parcial" son un grupo heterogéneo de proteínas entre las que se encuentran la SRGN, el receptor CD44v3, el TGFBR3 y la neuropilina (NRP1) y que pueden tener unidas o no moléculas de GAGs sulfatados (Smith & Melrose, 2015).

#### 5.1.3.1. Serglicina

La Serglicina (SRGN) es un PG intracelular que posee zonas con repeticiones del dipéptido Ser-Gly. Está constituido por cadenas de GAGs que poseen una gran carga negativa debido a que están constituidas fundamentalmente por CS de tipo E o por heparina, una forma altamente sulfatada de HS. Se encuentran fundamentalmente en determinadas células hematopoyéticas y en células endoteliales. Sus principales funciones están relacionadas con la regulación y el almacenamiento en gránulos de determinadas sustancias bioactivas muy relevantes sobre todo en los procesos de inflamación (Sawesi *et al.*, 2010). En este sentido, dependiendo de la célula la SRGN interaccionará con diferentes sustancias. Por ejemplo, en los mastocitos o células cebadas interacciona fundamentalmente con la histamina, triptasa y carboxipeptidasa; en los neutrófilos interacciona fundamentalmente con la elastasa; en los linfocitos T citotóxicos con la granzima B y la perforina (Grujic *et al.*, 2005); en las plaquetas con el factor de crecimiento derivado de las plaquetas; en las células endoteliales con el activador tisular del plasminógeno y en los macrófagos con el factor de necrosis tumoral alfa (Kolset & Pejler, 2011).

Con respecto a la relación de SRGN con las enfermedades neurodegenerativas, existen muy escasos trabajos publicados en la literatura. Cabe destacar la presencia de mastocitos en la neuroinflamación y como un incremento y activación excesiva de los mismo puede ser deletéreo para el cerebro y promover en parte la neurodegeneración (Kempuraj *et al.*, 2017).

#### 5.1.3.2. CD44

El CD44 es una glicoproteína transmembrana codificada por un gen compuesto por 20 exones de los cuales 10 son variables dando lugar a distintas isoformas de la proteína (Isacke & Yarwood, 2002). La variante 3 (v3) es una variante de CD44 modificada con cadenas de HS y capaz de unir factores de crecimiento de unión a heparina y quimiocinas. Se han detectado transcritos de CD44 de alto peso molecular en diferentes tipos de tumores con funciones tan variadas como adhesión, invasión y expresión de determinados genes del degradoma (S. J. Wang *et al.*, 2007).

En relación con la EA, se han observado niveles incrementados de CD44 en general y de CD44v3 en particular contribuyendo a la patogénesis de la EA. Además, mediante IHQ se detectó la presencia de CD44v3 principalmente a nivel neuronal (Pinner *et al.*, 2017).

#### 5.1.3.3. TGFBR3 o Betaglicano

El Betaglicano (BGCAN) es un PG anclado a la membrana celular que actúa como co-recetor de la superfamilia del TGF- $\beta$  (Todorović-Raković *et al.*, 2011). Estructuralmente se caracteriza por tener un gran dominio extracelular con cadenas de HS y de CS capaces de unir determinados ligandos; y un dominio citoplasmático corto (Mendoza *et al.*, 2009). Ratones mutados para este gen mueren durante el periodo embrionario como consecuencia de alteraciones cardiacas, renales y defectos hepáticos (Walker *et al.*, 2011). Desde el punto de vista de la neurodegeneración

Existen muy escasos datos en la literatura que describan las alteraciones de BGCAN en la EA. Hemos identificado un trabajo que, utilizando bases de datos y tras un análisis bioinformático complejo, destaca al BGCAN como un gen candidato para posteriores estudios moleculares en la EA por su potencial vinculación con la patogénesis de dicha enfermedad (Quan *et al.*, 2020). Otros estudios han mostrado una disminución de los niveles de expresión de BGCAN en fibroblastos de la piel de pacientes con EA esporádica (Bellucci *et al.*, 2007).

#### 5.1.3.4. Neuropilina

Las neuropilinas son receptores de superficie celular con funciones esenciales en la salud humana y que participan en muchos procesos biológicos clave, incluidos los sistemas cardiovascular, neuronal e inmunológico (Parker *et al.*, 2012). Los dos miembros de la familia NRP son proteínas transmembrana de tipo I que se conservan en todos los vertebrados y son aproximadamente un 40% idénticas a nivel de aminoácidos con una estructura de dominio conservada. La región extracelular posee cinco dominios estructurados que son esenciales para la unión del ligando, un dominio transmembrana único y un

dominio intracelular corto con motivo de unión de gran interés biológico (Parker *et al.*, 2012). Además, este receptor se expresa en la superficie de muchos tipos de células, incluidas las células endoteliales, neumocitos, las células T reguladoras, los osteoblastos, adipocitos, queratinocitos y fibroblastos de la médula ósea. Así, se ha descrito recientemente que NRP1 podría ser otra puerta de entrada del SARS-CoV-2a en las células además del receptor ACE2 (Gudowska-Sawczuk & Mroczko, 2021).

La pérdida de NRP1 da como resultado fenotipos cardiovasculares y neuronales significativos. Así, en experimentos realizados en modelos animales mostraron que tanto la eliminación del gen como su sobreexpresión resultan letales a nivel embrionario por defectos vasculares mayores y en el sistema nervioso (Kitsukawa *et al.*, 1995). En relación con los procesos neurodegenerativos, se ha estudiado NRP1 principalmente con la enfermedad de Parkinson de manera directa (Daneshvar Kakhaki *et al.*, 2020); o bien de forma indirecta a través del estudio del receptor del VEGF o bien de las semaforinas, unas proteínas secretadas pero que también se pueden encontrar en forma de receptores transmembrana, capaces de unirse a NRPs, que destacan por servir de guías de señalización para los axones y construir la red neuronal (Delloye-Bourgeois *et al.*, 2017). Estudios recientes han mostrado como NRP1 es un factor de riesgo en pacientes con EA para desarrollar una infección severa por COVID-19 (Xiong *et al.*, 2021). Además, se ha descubierto recientemente el papel fundamental de NRP1, a nivel de las células endoteliales, en la regulación de la función mitocondrial y la homeostasis del hierro en las enfermedades neurodegenerativas (Bosseboeuf & Raimondi, 2020).

## 5.2. RESULTADOS

---

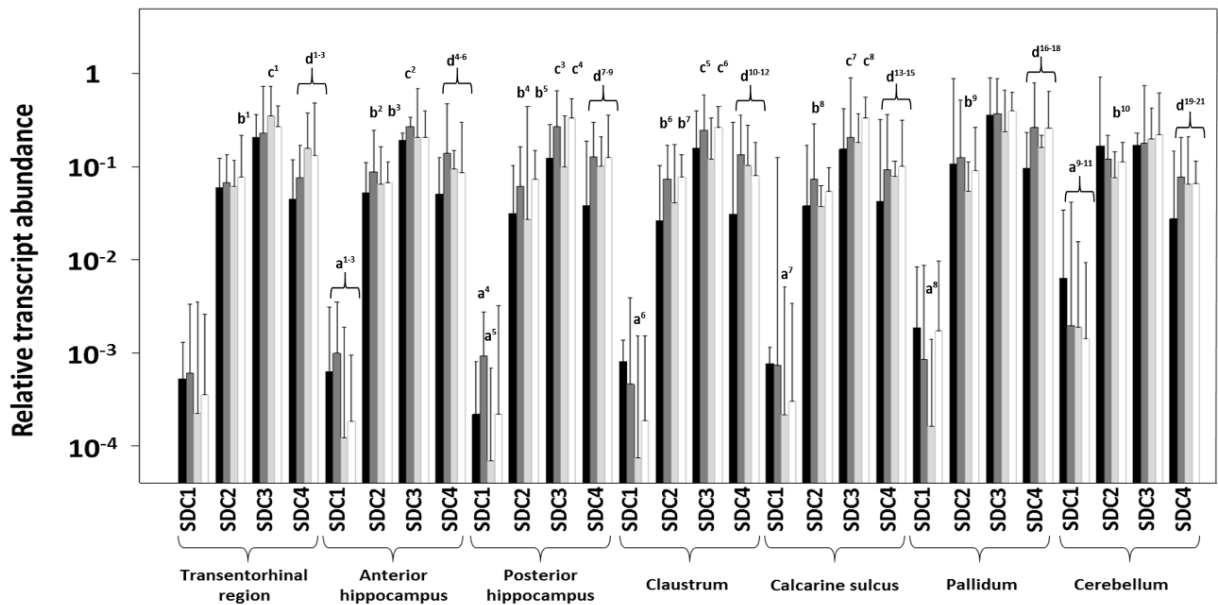
### 5.2.1. Análisis de la expresión diferencial de los genes

Inicialmente hemos usado la técnica de qRT-PCR para realizar un análisis cuantitativo de la transcripción diferencial de los genes codificantes utilizando muestras de 7 tipos de tejidos diferentes de diversas áreas encefálicas. Casos de EA leve (clasificación I-II Braak & Braak); casos moderados de EA (clasificación III-IV de Braak & Braak); y los casos graves de EA (clasificación V-VI Braak & Braak) se analizaron y compararon con controles sanos (clasificación 0 Braak & Braak). Las muestras correspondieron a pacientes de ambos sexos con edades comprendidas entre 52 y 103 años. La determinación de la presencia y localización de syndecan-1, syndecan-4, glypican-4, glypican-6, perlecan, neuropilin, betaglycan y serglycin en hipocampo y neocorteza de cerebros con EA se realizó mediante técnicas de IHQ. Los hallazgos estuvieron fuertemente relacionados con la patología tau y/o amiloide- $\beta$ , en su mayoría colocalizando con PN<sub>s</sub>, ONF<sub>s</sub> y AAC en todas las regiones estudiadas. Los

resultados histológicos se muestran de la neocorteza cerebral del lóbulo temporal.

### 5.2.1.1. Expresión diferencial de los genes de la familia de los SDCs

El análisis de los niveles de transcripción de los genes de la familia de los SDCs mediante qRT-PCR detectó la expresión de las 4 isoformas. Sin embargo, los niveles variaron ampliamente dependiendo de la especie particular examinada y los niveles de transcripción de *SDC1* tanto en los cerebros de control como en los de EA fueron entre uno y dos órdenes de magnitud más bajos que el resto (Figura 17).

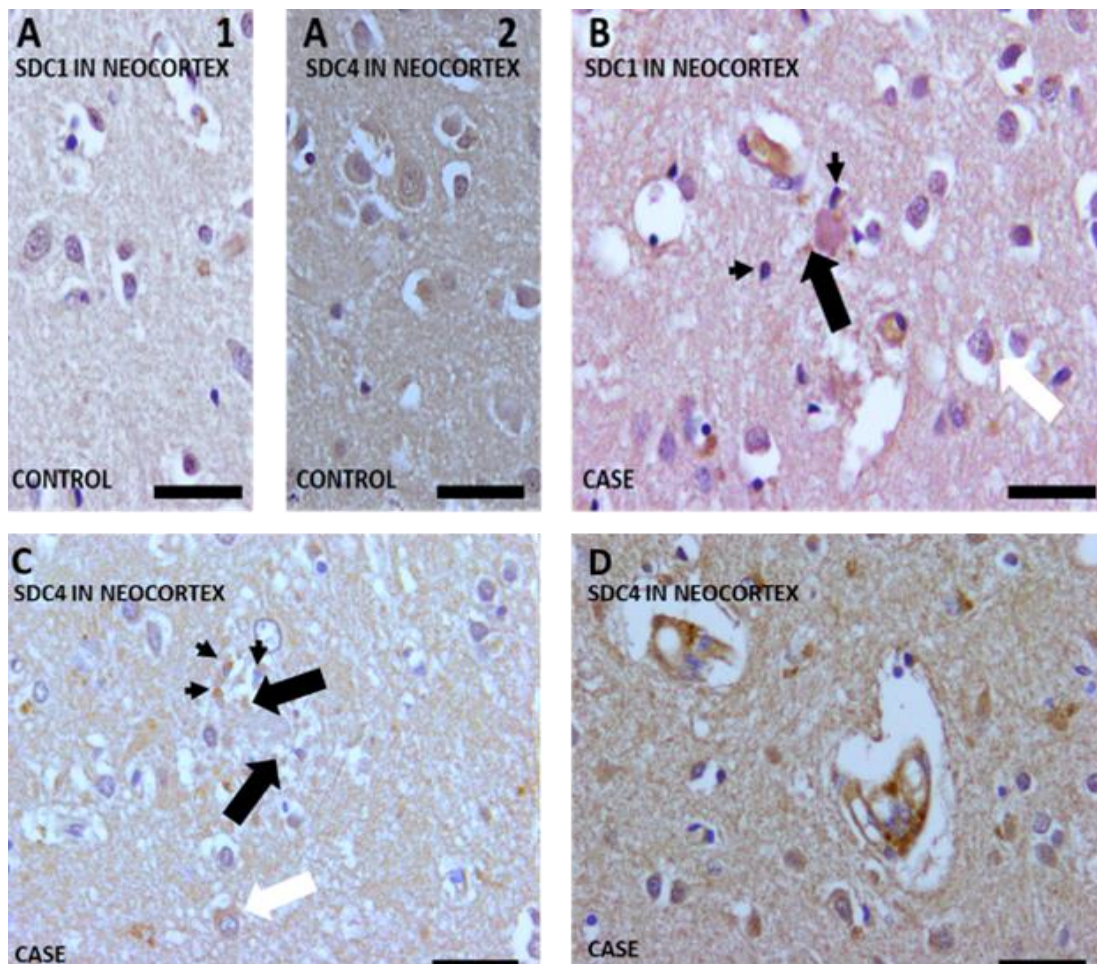


**Figura 17. Transcripción diferencial de SDCs (1-4) en casos de EA.** La abundancia relativa para los controles (barras negras), EA leve (barras gris oscuro), EA moderada (barras gris claro) y EA severa (barras blancas) se representan en una escala logarítmica para cada gen analizado y las extensiones representan desviaciones estándar (límite superior mostrado). Se destacan los genes y las zonas que muestran diferencias significativas en sus niveles de transcripción. a1:  $p= 0.013871$ ; a2:  $p= 0.004970$ ; a3:  $p= 0.017621$ ; a4:  $p=0.000196$ ; a5:  $p= 0.000386$ ; a6:  $p= 0.000738$ ; a7:  $p= 0.038580$ ; a8:  $p= 0.000233$ ; a9:  $p= 0.042859$ ; a10:  $p=0.038580$ ; a11:  $p= 0.002853$ ; b1:  $p= 0.003779$ ; b2:  $p= 0.006491$ ; b3:  $p= 0.003090$ ; b4:  $p= 0.000536$ ; b5:  $p= 0.001370$ ; b6:  $p= 0.000196$ ; b7:  $p= 0.000655$ ; b8:  $p= 0.037990$ ; b9:  $p= 0.012275$ ; b10:  $p= 0.000536$ ; c1:  $p= 0.001177$ ; c2:  $p= 0.000233$ ; c3:  $p= 0.000196$ ; c4:  $p= 0.000536$ ; c5:  $p= 0.047531$ ; c6:  $p= 0.003286$ ; c7:  $p= 0.003143$ ; c8:  $p= 0.001177$ ; d1:  $p= 0.015648$ ; d2:  $p= 0.000196$ ; d3:  $p= 0.000276$ ; d4:  $p= 0.001002$ ; d5:  $p= 0.000713$ ; d6:  $p= 0.019118$ ; d7:  $p= 0.000536$ ; d8:  $p= 0.005685$ ; d9:  $p= 0.000629$ ; d10:  $p= 0.001184$ ; d11:  $p= 0.003600$ ; d12:  $p= 0.002264$ ; d13:  $p= 0.003772$ ; d14:  $p= 0.015648$ ; d15:  $p= 0.005685$ ; d16:  $p= 0.000196$ ; d17:  $p= 0.001847$ ; d18:  $p= 0.000327$ ; d19:  $p= 0.000864$ ; d20:  $p= 0.000738$ ; d21:  $p= 0.022232$ . Los valores del eje Y se representan en escala logarítmica.



Hubo además una serie de diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de los genes y las etapas de la EA según lo definido por la clasificación de Braak y Braak. Para el caso del *SDC4* se sobreexpresó de manera constante en todas las áreas del cerebro estudiadas y en todas las etapas de la EA. Los niveles de transcripción del *SDC3* mostraron una sobreexpresión principalmente en etapas leves y severas. El *SDC2* se comportó de manera similar al *SDC3* en la mayoría de las áreas del cerebro, con la excepción del pálido y el cerebelo, donde *SDC2* se subexpresó significativamente en casos moderados de EA. Los niveles de transcripción del *SDC1* tendieron a estar subexpresados, pero la diferencia sólo fue estadísticamente significativa principalmente en casos moderados de EA.

Al comparar el tejido enfermo y el sano, la IHQ mostró la presencia de depósitos dispersos de SDC1 en algunos núcleos no fragmentados de PN y una inmunexpresión principalmente débil en algunas neuronas en muestras de corteza con ONFs. Además, SDC4 mostró una inmunexpresión débil a moderada en el neurópilo y los tres tipos de lesiones de EA que incluyen PN, ONFs y AAC (Figura 18).



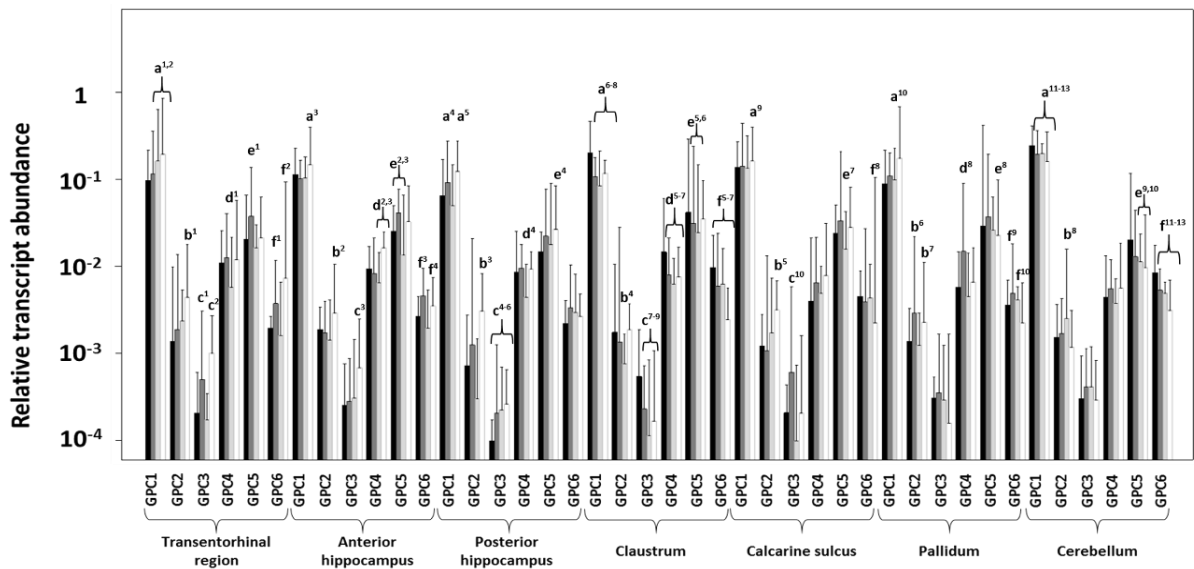
**Figura 18. Tinción IHQ de los SDCs 1 y 4 en neocórtex (lóbulo temporal) en casos de EA.** (A) No hay expresión relevante de syndecan-1 (A1) o syndecan-4 (A2)



en neuronas y células gliales en muestras de cerebro de control. (B) Depósitos dispersos de syndecan-1 alrededor de los núcleos densos de NP (flecha negra). Presencia de syndecan-1 en algunas neuronas de la corteza con ONFs (flecha blanca) en comparación con los controles. Aumento moderado de syndecan-1 en células gliales que rodean NP (puntas de flecha) (C) Aumento de débil a moderado de syndecan-4 en el neurópilo y en neuronas degeneradas en la corteza con ONFs (flecha blanca). Los NP muestran algunos depósitos de syndecan-4 en la periferia del núcleo denso (flechas negras). Aumento moderado de syndecan-4 en las células gliales que rodean las NP (puntas de flecha). (D) Syndecan-4 en paredes de arteriolas en AAC. Barra en A-E = 20  $\mu$ m.

### 5.2.1.2. Expresión diferencial de los genes de la familia de los GPCs

Los niveles de ARNm para las seis diferentes isoformas de GPCs se detectaron mediante qRT-PCR (Figura 19). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la expresión de los GPCs dependiendo del estadio de EA según lo definido por Braak & Braak. En particular, todos los GPCs se subexpresaron significativamente en el claustrum y, el GPC1, GPC5 y GPC6 lo hicieron también a nivel del cerebelo. Curiosamente, el GPC1, el GPC2 y el GPC3 se sobreexpresaron en áreas límbicas del cerebro, más notablemente en las etapas severas de la EA. Por otra parte, el GPC2 y el GPC4 mostraron menos alteraciones significativas en sus niveles de transcripción en la EA que otros miembros de la familia.

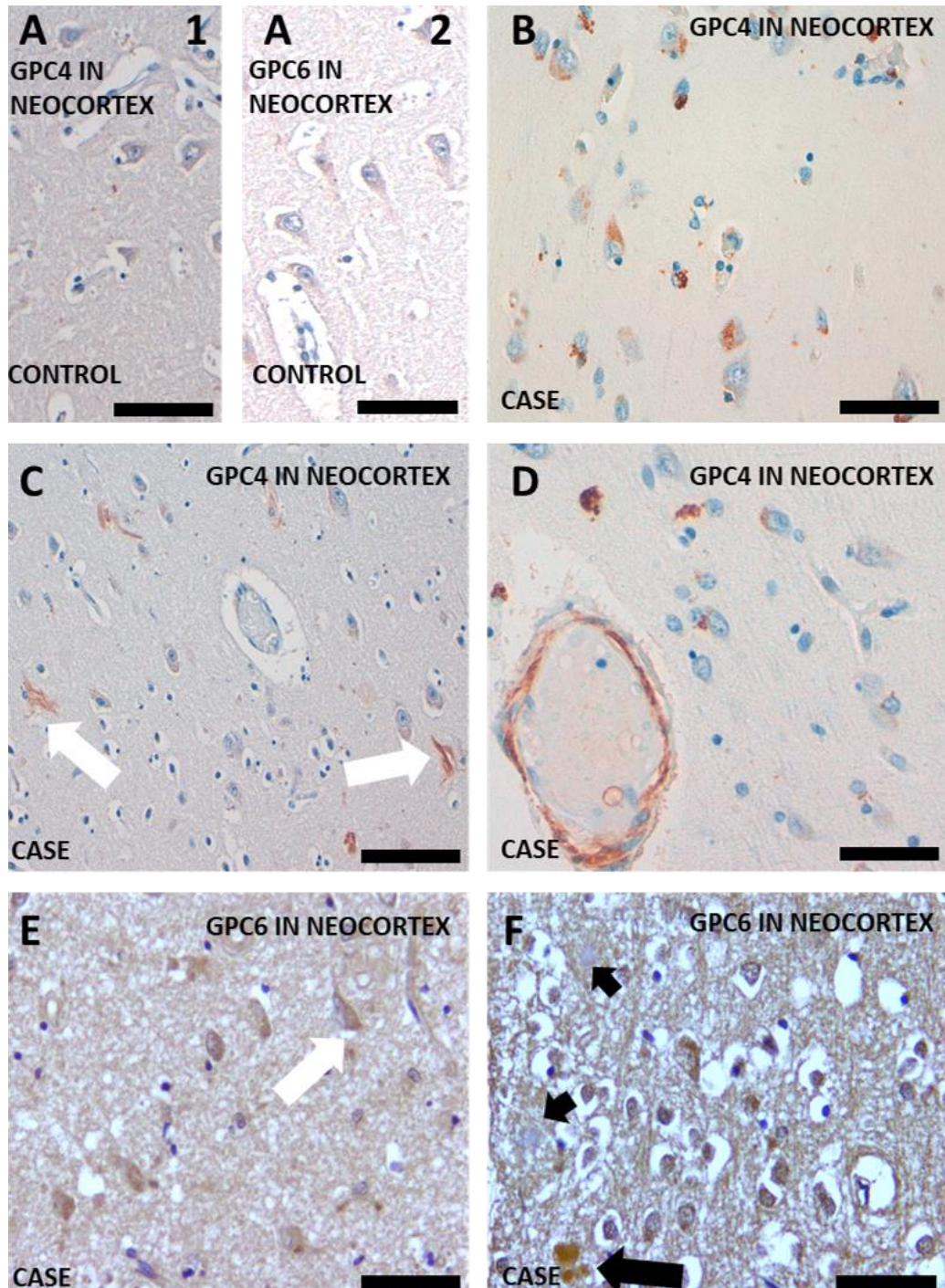


**Figura 19. Transcripción diferencial de GPCs (1-6) en casos de EA.** La abundancia relativa para los controles (barras negras), EA leve (barras gris oscuro), EA moderada (barras gris claro) y EA severa (barras blancas) se representan en una escala logarítmica para cada gen analizado y las extensiones representan desviaciones estándar (límite superior mostrado). Se destacan los genes y las zonas que muestran diferencias significativas en sus niveles de transcripción. a1: p = 0,002472; a2: p = 0,000455; a3: p = 0,047531; a4: p = 0,042859; a5: p = 0,003779; a6: p = 0,000196; a7: p = 0,007399; a8: p = 0,001847; a9: p = 0,042859; a10: p = 0,005685; a11: p = 0,045672; a12: p = 0,022232; a13: p = 0,034671; b1: p = 0,000536; b2: p = 0,008419; b3: p = 0,001009; b4: p = 0,012275; b5: p = 0,000276; b6: p = 0,013871; b7: p = 0,003286; b8: p = 0,022232; c1: p = 0,001009; c2: p = 0,000196; c3: p =

0,000233; c4: p = 0,031105; c5: p = 0,022232; c6: p = 0,003779; c7: p = 0,000196; c8: p = 0,002472; c9: p = 0,002139; c10: p = 0,005685; d1: p = 0,006491; d2: p = 0,042859; d3: p = 0,000738; d4: p = 0,019810; d5: p = 0,009563; d6: p = 0,000629; d7: p = 0,009563; d8: p = 0,014773; e1: p = 0,000629; e2: p = 0,003286; e3: p = 0,027858; e4: p = 0,001847; e5: p = 0,012275; e6: p = 0,001847; e7: p = 0,006491; e8: p = 0,001177; e9: p = 0,001931; e10: p = 0,004337; f1: p = 0,001592; f2: p = 0,000196; f3: p = 0,000864; f4: p = 0,012275; f5: p = 0,002472; f6: p = 0,002853; f7: p = 0,000196; f8: p = 0,003779; f9: p = 0,031105; f10: p = 0,005685; f11: p = 0,015648; f12: p = 0,007399; f13: p = 0,000386. Los valores del eje Y se representan en una escala logarítmica.

A nivel histológico, se observó una inmunexpresión débil a moderada de GPC4 en algunas neuronas en la corteza de los casos de EA, principalmente en relación con pre-ONFs y ONFs.

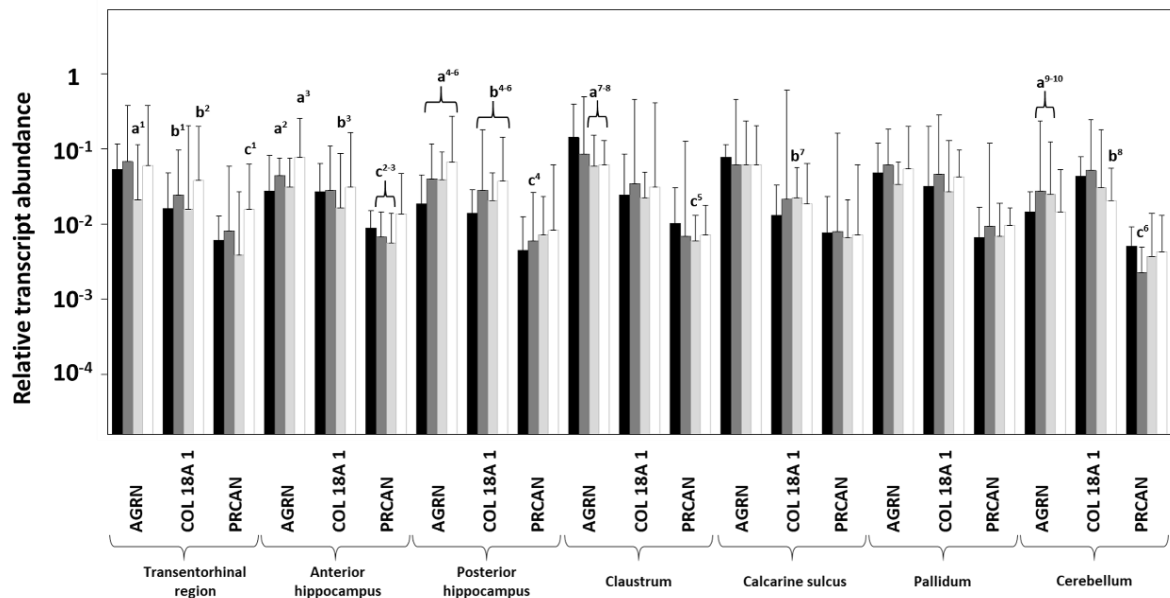
También hemos identificado depósitos de GPC4 en las paredes de las arteriolas con AAC. Además, observamos una inmunexpresión débil y difusa de GPC6 en el neurópilo y una inmunexpresión mayoritariamente moderada en algunas neuronas de la corteza con pre-ONFs y ONFs. También se detectó una inmunexpresión variable de GPC6 en las PNs (Figura 20).



**Figura 20. Tinción IHQ de GPCs 4 y 6 en el neocórtex (lóbulo temporal) en casos de EA.** (A) No hay expresión relevante de glypican-4 (A1) o glypican-6 (A2) en neuronas y células gliales en muestras de cerebro de control. (B, C) Aumento de débil a moderado de GPC-4 en algunas neuronas de la corteza con preenredos neurofibrilares (B) y ovillos (flecha blanca) en comparación con los controles (C). (D) Glypican-4 se deposita en las paredes de las arteriolas en AAC. (E) Débil aumento de GPC-6 en algunas neuronas de la corteza con enredos y enredos neurofibrilares (flecha blanca). (F) Inmunoexpresión variable de glypican-6 en NP. La flecha negra indica fuertes depósitos de GPC-6 en un NP. Las puntas de flecha indican dos NP sin depósitos de GPC-6. Bar en A-B = 20  $\mu$ m; C = 40  $\mu$ m; D-F = 20  $\mu$ m.

### 5.2.1.3. Expresión diferencial de los genes *argina*, *colágeno XVIII* y *perlecano*.

El examen de los niveles de transcripción de las moléculas de MEC mediante qRT-PCR identificó diversos niveles de expresión para cada una de ellas. En general, estos genes estaban menos alterados que los que codifican los HSPGs de la superficie celular (Figura 21). Los niveles de expresión de *COL18A1* se incrementaron significativamente en la región transentorrinal y en el hipocampo en casos graves de EA. Al igual que con los GPCs, la mayoría de los genes de los HSPGs de MEC tendieron a estar subexpresados en el claustrum y el cerebelo.

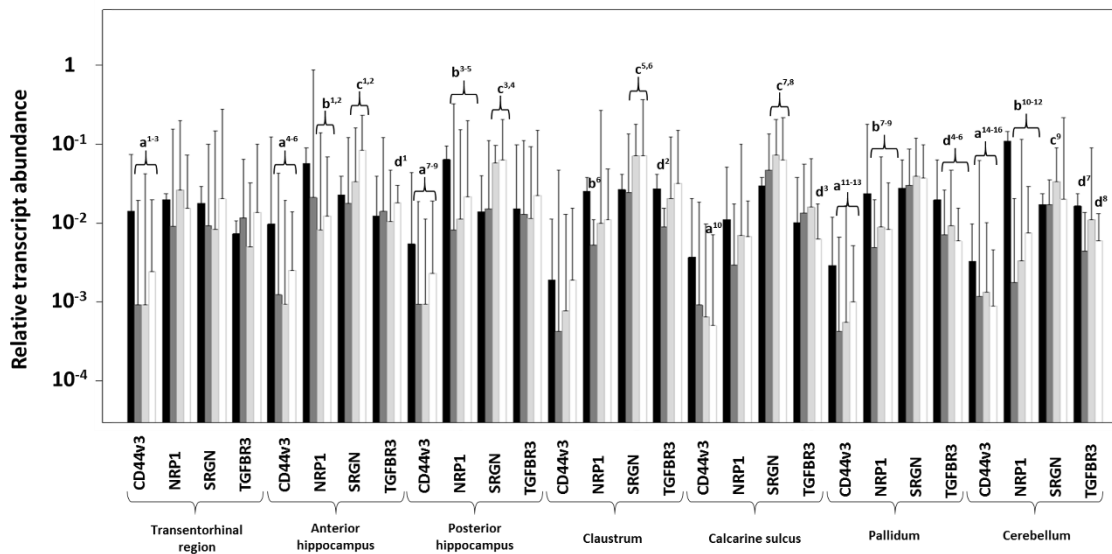


**Figura 21. Transcripción diferencial de agrina, colágeno XVIII y PRCAN en casos de EA.** La abundancia relativa para los controles (barras negras), EA leve (barras gris oscuro), EA moderada (barras gris claro) y EA severa (barras blancas) se representan en una escala logarítmica para cada gen analizado y las extensiones representan desviaciones estándar (límite superior mostrado). Se destacan los genes y las zonas que muestran diferencias significativas en sus niveles de transcripción. a1:  $p = 0,004970$ ; a2:  $p = 0,002139$ ; a3:  $p = 0,000276$ ; a4:  $p = 0,000233$ ; a5:  $p = 0,002139$ ; a6:  $p = 0,001177$ ; a7:  $p = 0,000713$ ; a8:  $p = 0,000196$ ; a9:  $p = 0,047625$ ; a10:  $p = 0,006491$ ; b1:  $p = 0,013871$ ; b2:  $p = 0,004645$ ; b3:  $p = 0,031105$ ; b4:  $p = 0,001177$ ; b5:  $p = 0,042859$ ; b6:  $p = 0,004970$ ; b7:  $p = 0,017621$ ; b8:  $p = 0,000276$ ; c1:  $p = 0,001177$ ; c2:  $p = 0,010844$ ; c3:  $p = 0,000327$ ; c4:  $p = 0,001370$ ; c5:  $p = 0,034671$ ; c6:  $p = 0,001397$ . Los valores del eje Y se representan en una escala logarítmica.

El estudio inmunohistoquímico del PRCAN no mostró cambios en los casos de EA en comparación con el tejido cerebral sano (datos no mostrados).

### 5.2.1.4. Expresión diferencial de los genes CD44v3, neuropilina, SRGN y TGFBR3

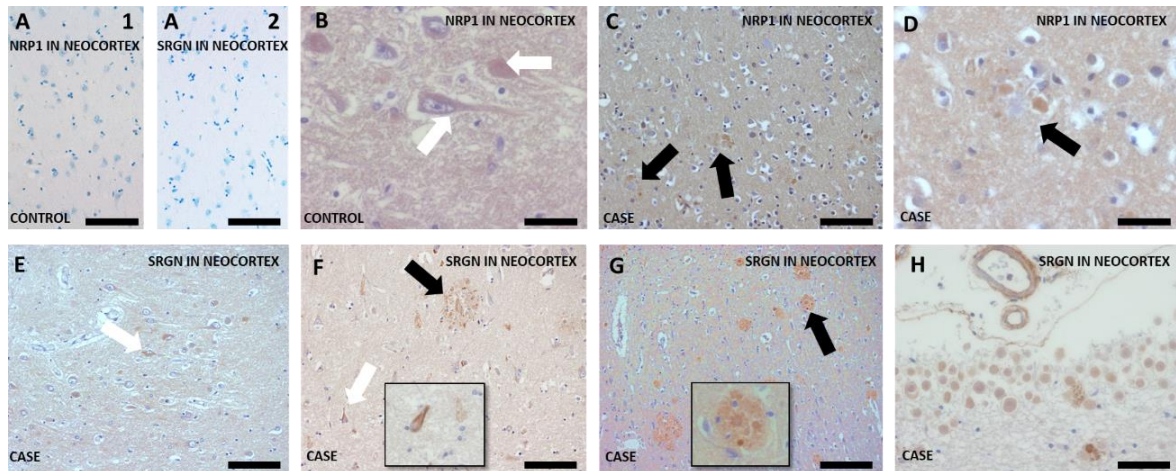
El estudio de los niveles de transcripción de los genes codificantes de los HSPGs a tiempo parcial o "part time" HSPGs y de la *SRGN* mediante qRT-PCR mostró que todos ellos se expresaban en el tejido, pero con algunas variaciones relevantes. Las alteraciones que fueron estadísticamente significativas se muestran en la (Figura 22). Los genes *CD44v3* y *NRP1* se subexpresaron de manera significativa en la mayoría de las áreas analizadas del cerebro y para casi todas las etapas de la EA. Además, el gen *TGFBR3* mostró una regulación significativamente negativa a nivel del pálido y el cerebelo para todas las etapas de la EA. Por el contrario, hemos identificado una sobreexpresión significativa y consistente de *SRGN* en casi todas las áreas analizadas para cerebros con EA moderada y severa.



**Figura 22. Transcripción diferencial de CD44v3, neuropilina, serglicina y TGFBR3 en casos de EA.** La abundancia relativa para los controles (barras negras), EA leve (barras gris oscuro), EA moderada (barras gris claro) y EA severa (barras blancas) se representan en una escala logarítmica para cada gen analizado y las extensiones representan desviaciones estándar (límite superior mostrado). Se destacan los genes y las zonas que muestran diferencias significativas en sus niveles de transcripción. a1:  $p = 0,001592$ ; a2:  $p = 0,002853$ ; a3:  $p = 0,007399$ ; a4:  $p = 0,002853$ ; a5:  $p = 0,000536$ ; a6:  $p = 0,010844$ ; a7:  $p = 0,004337$ ; a8:  $p = 0,041627$ ; a9:  $p = 0,047531$ ; a10:  $p = 0,022232$ ; a11:  $p = 0,000629$ ; a12:  $p = 0,012275$ ; a13:  $p = 0,009563$ ; a14:  $p = 0,039186$ ; a15:  $p = 0,010844$ ; a16:  $p = 0,000196$ ; b1:  $p = 0,002162$ ; b2:  $p = 0,000655$ ; b3:  $p = 0,008972$ ; b4:  $p = 0,009844$ ; b5:  $p = 0,023096$ ; b6:  $p = 0,000805$ ; b7:  $p = 0,002611$ ; b8:  $p = 0,007599$ ; b9:  $p = 0,002162$ ; b10:  $p = 0,000655$ ; b11:  $p = 0,002162$ ; b12:  $p = 0,000655$ ; c1:  $p = 0,017621$ ; c2:  $p = 0,000536$ ; c3:  $p = 0,000455$ ; c4:  $p = 0,000536$ ; c5:  $p = 0,000327$ ; c6:  $p = 0,000536$ ; c7:  $p = 0,000536$ ; c8:  $p = 0,006491$ ; c9:  $p = 0,000233$ ; d1:  $p = 0,001177$ ; d2:  $p = 0,000196$ ; d3:  $p = 0,004970$ ; d4:  $p = 0,001592$ ; d5:  $p = 0,024908$ ; d6:  $p = 0,001370$ ; d7:  $p = 0,004566$ ; d8:  $p = 0,002254$ . Los valores del eje Y se representan en una escala logarítmica.



La IHQ mostró la presencia de una inmunoexpresión débil a moderada de *NRP1* en el neurópilo y en algunas neuronas de la neocorteza con pre-ONFs y con ONFs, así como en PNs. La IHQ contra SRGN mostró una inmunoexpresión de moderada a fuerte en los tres tipos de lesiones de la EA (Figura 23). La IHQ realizada contra la proteína TGFBR3 no identificó cambios en los casos de EA en comparación con el tejido cerebral sano (datos no mostrados).



**Figura 23. Tinción IHQ de neuropilina y SRGN en la neocorteza cerebral (lóbulo temporal) en casos de EA.** (A) No hay expresión relevante de neuropilina (A1) o SRGN (A2) en neuronas y células gliales en muestras de cerebro de control. (B) Aumento de débil a moderado de neuropilina en el neurópilo y en algunas neuronas de la corteza con enredos y enredos neurofibrilares (flechas blancas) en comparación con los controles. (C, D) Aumento moderado de neuropilina en NP (flechas negras). (E, F) Inmunoexpresión de SRGN de moderada a fuerte en algunas neuronas de la corteza con enredos y enredos neurofibrilares (flechas blancas). La imagen insertada muestra una neurona atrófica con positividad intracitoplasmática moderada para neuropilina. (G) Los NP son muy positivos para SRGN. La imagen insertada muestra un NP con grandes depósitos de SRGN. (H) La SRGN se deposita en las paredes de las arteriolas en AAC. Bar en A = 60  $\mu$ m; B = 20  $\mu$ m; C = 40  $\mu$ m; D = 20  $\mu$ m; E-G = 60  $\mu$ m; H = 40 micras.

### 5.3. DISCUSIÓN

Snow y sus colaboradores fueron los primeros en demostrar la presencia de los HSPGs en los tres tipos de lesiones de la EA: PNs, AAC y ONFs mediante el uso de IHQ (Perry *et al.*, 1991; A D Snow *et al.*, 1988). Varios estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que las moléculas de HS se colocan preferentemente con  $A\beta$  alrededor de los núcleos densos de las PSs (Jendresen *et al.*, 2015; O'Callaghan *et al.*, 2008) y se ha propuesto que la interacción  $A\beta$ -HS es mutuamente protectora en el sentido de que  $A\beta$  está protegido de la degradación de la proteasa y el HS está protegido de la degradación de la HPSE (Bame *et al.*, 1997; Gupta-Bansal *et al.*, 1995). Además, el trabajo realizado durante la última década indica que la patología tau puede propagarse entre células de una manera priónica mediada por HSPGs (Holmes & Diamond, 2014).

En el presente estudio, nos hemos centrado en el análisis de los niveles de expresión de los 17 genes que codifican las proteínas núcleo de los HSPGs en diferentes etapas de la EA mediante qRT-PCR. Posteriormente, hemos identificado en el tejido cerebral aquellas proteínas con alteraciones significativas de sus niveles de expresión génica mediante IHQ.

Con respecto a los HSPGs de la superficie celular (SDCs y GPCs), se sabe poco acerca de la expresión molecular de estas familias en su conjunto en la EA. El hallazgo más interesante de este trabajo fue la sobreexpresión constante de *SDC4* observada en todas las áreas del cerebro en muestras de todas las etapas de la EA. La IHQ indicó la presencia de expresión leve a moderada de *SDC4* principalmente en relación con la patología de tau y depósitos de  $A\beta$ . Además, hemos observado que a pesar de la gran sobreexpresión de *SDC4* eso no se tradujo en una fuerte inmunoexpresión de la proteína en el tejido. Es posible que exista algún mecanismo regulador intermedio como por ejemplo a través de microARNs o incluso un aumento de la degradación de la propia proteína para justificar esa reducción de la concentración a nivel histológico. Aunque se ha descrito que el *SDC4* está involucrado en la endocitosis, actualmente se sabe muy poco sobre la verdadera función de *SDC4* en la EA. Un trabajo publicado en los últimos años y que utilizó técnicas *in vitro* con neuronas IPSC humanas sugirió la participación de *SDC4* en la internalización celular de tau y postuló el uso de *SDC4* como una nueva estrategia terapéutica para inhibir la propagación de la patología tau (Usenovic *et al.*, 2018). En nuestro trabajo de investigación hemos identificado una expresión variable de los HSPGs de superficie celular en cerebros con EA según el estadio de Braak & Braak, lo cual está en línea con estudios previos que han caracterizado la presencia de estos miembros de la familia en los tres tipos de lesiones en la EA, y que tienen un afinidad particular por el  $A\beta$  fibrilar (Cui *et al.*, 2013; Perry *et al.*, 1991; A D Snow *et al.*, 1988). Como tal, se ha descrito que los *SDC1-3* están presentes en PNs y ONFs (Jack Horssen *et al.*, 2001; J van Horssen *et al.*, 2003; Verbeek *et al.*, 1999), lo que respalda nuestros datos en relación con *SDC1*, además de que nuestros resultados añaden que *SDC2* también está presente en AAC. En este sentido, este trabajo también encontró que *SDC4* está presente en los tres tipos de lesiones de la EA. Recientemente se ha descrito que los SDCs participan directamente en la EA preferentemente en los procesos de internalización celular, acumulación intraneuronal y fibrilación de beta amiloide (Letoha *et al.*, 2019).

En cuanto a los GPCs, cabe destacar la regulación a la baja de la mayoría de estos genes en el claustrum y la sobreexpresión de *GPC1*, *GPC2* y *GPC3* en las áreas límbicas del cerebro, más notablemente en las etapas severas de la EA. Varios estudios han demostrado la participación de *GPC1* en la EA, habiéndose localizado *GPC1* en placas amiloides cerebrales, así como en ONFs (Verbeek *et al.*, 1999; N. Watanabe *et al.*, 2004). Además, artículos previos han descrito la presencia de *GPC1* y *SDC3* en la glía y asociados con depósitos de

amiloides próximos al sitio de acumulación de HS. Este resultado es consistente con el hallazgo de nuestro trabajo en relación con la expresión de HSPGs y su incremento en neuronas y glía de pacientes con EA, lo que respaldaría aún más la idea de que los HSPGs codepositados con placas amiloides pueden derivarse de las células cerebrales (neuronas y glía) y que pueden producirse en respuesta a la acumulación de  $A\beta$  (O'Callaghan *et al.*, 2008; Su *et al.*, 1992). La mayoría de los hallazgos de las investigaciones publicadas sobre la localización tisular de los HSPGs de la superficie celular en cerebros con EA se han resumido en una revisión relativamente reciente (G. L. Zhang *et al.*, 2014). En este sentido, hemos intentado mejorar el conocimiento disponible sobre la localización de los HSPGs de superficie celular previamente no bien caracterizados en la EA mediante la realización de IHQ para SDC4, GPC4 y GPC6.

Con respecto a los MEC HSPGs, la mayoría de los cambios se observaron en el área límbica, particularmente en la región transentorrinal y el hipocampo, como se describió previamente. Se ha descrito que tanto la AGRN como el COL18A1 están involucrados en los tres tipos de lesiones de la EA (J van Horsen *et al.*, 2003). Aunque algunos artículos han señalado la presencia de PRCAN en PNs, ONFs y paredes vasculares con amiloide, otros, incluido este estudio, no han podido confirmar estas observaciones utilizando anticuerpos monoclonales contra la proteína central del PRCAN (Cui *et al.*, 2013; A D Snow *et al.*, 1988; Verbeek *et al.*, 1999). Además, estudios recientes han demostrado que los HSPGs se acumulan preferentemente alrededor de los núcleos densos de las PNs pero permanecen en gran parte ausentes en las placas difusas (O'Callaghan *et al.*, 2008).

En relación con los HSPG "a tiempo parcial" en la EA, se han publicado muy pocos datos previamente. Un hallazgo interesante de nuestro trabajo es la subexpresión significativa de *CD44v3* y *NRP1* en casi todas las áreas del cerebro analizadas. Sin embargo, otros investigadores han descrito que en muestras de hipocampo, la expresión de *CD44v3* fue significativamente mayor en pacientes con EA en comparación con los controles (Pinner *et al.*, 2017). En cuanto a *NRP1*, hasta donde sabemos, no se han publicado informes anteriores sobre este HSPG y la EA. Aunque se encontró que *NRP1* estaba mayoritariamente regulado a la baja, la IHQ indicó la acumulación de *NRP1* en neuronas degeneradas, en el neurópilo y en PNs. Vale la pena señalar que *NRP1* es un receptor de semaforina 3A, y la acumulación de una forma internalizada de esta molécula se asocia con la degeneración de neuronas en zonas vulnerables del hipocampo durante la EA (Good *et al.*, 2004). *TFGBR3*, así como *PRCAN* y otros, se considera un PG derivado de células vasculares (A. D. Snow *et al.*, 1995). Los cambios significativos observados en nuestro estudio para *TGFBR* fueron principalmente en términos de regulación a la baja. Un estudio anterior detectó que *TGFBR3* estaba regulado al alza en la EA familiar, mientras que estaba marcado a la baja en los fibroblastos esporádicos de la EA. Además, esta expresión diferencial de *TGFBR3* en la EA familiar y en células esporádicas de



EA se asoció con fases avanzadas de la EA (Bellucci *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2015).

SRGN, el único HSPG intracelular, se encuentra en los gránulos de los mastocitos de tipo tejido conectivo, donde la alta carga negativa de sus cadenas de HS facilita el empaquetamiento de proteasas cargadas positivamente, histamina y otros mediadores inflamatorios (Kolset & Pejler, 2011). En nuestro trabajo hemos demostrado, por primera vez, la presencia de SRGN en los tres tipos de lesiones de la EA. Además, también describimos una sobreexpresión significativa y constante de *SRGN* en casi todas las áreas del cerebro con EA moderada y grave. Se ha descrito que el HS se une y afecta la agregación, la internalización intracelular y el aclaramiento de tau y APP (Cui *et al.*, 2013). Además, el HS mejora y estabiliza la formación de fibrillas de A $\beta$ , dependiendo del grado de sulfatación de las cadenas de HS (Bruinsma *et al.*, 2010). Además, varios estudios han demostrado que la heparina puede promover la fosforilación de tau por las proteínas quinasas, lo que evita que la tau se una a los microtúbulos e induce el rápido desensamblaje de los microtúbulos de una manera dependiente de la sulfatación (Goedert *et al.*, 1996; Pérez *et al.*, 1996). En un estudio más profundo, Sepulveda-Díaz *et al.* encontraron que la enzima heparán sulfato 3-O-sulfotransferasa 2 (HS3ST2) se expresa predominantemente en neuronas. Observaron que el gen *HS3ST2* se sobreexpresaba en el hipocampo de los cerebros con EA en comparación con los controles, donde generaba dominios poco frecuentes 3-O-sulfatados en las cadenas de HS. Además, al interactuar con tau a nivel intracelular, sus hallazgos indican por tanto que los dominios de heparán sulfato 3-O-sulfatados producidos por HS3ST2 podrían actuar como chaperonas moleculares que permitiesen la fosforilación anormal de tau (Sepulveda-Díaz *et al.*, 2015). En este sentido, teniendo en cuenta que SRGN es el único HSPG intracelular, esta molécula podría desempeñar un papel central en la estabilización y progresión de la EA a través de los dominios 3-O-sulfatados en sus cadenas de HS. Sin embargo, la falta de tecnología para cuantificar el grupo 3-O-sulfato y la dificultad de obtener grandes cantidades de HS para hacer análisis estructurales, dificultan los intentos de establecer la verdadera prevalencia de 3-O-sulfatación en las cadenas HS de cada HSPG (Thacker *et al.*, 2014).

Aunque los HSPGs son proteínas de la MEC o de la superficie celular, se ha detectado alguna inmunexpresión positiva en el citoplasma. Esto podría deberse a las funciones respectivas de la proteína central de los HSPGs y la especificidad de la estructura de la cadena de HS para la endocitosis, los eventos de señalización intracelular involucrados en la invaginación de la membrana dependiente de los HSPGs y la formación de vesículas, así como los efectos biológicos de los ligandos internalizados (Christianson & Belting, 2014).

En nuestra opinión, la falta de progreso en el tratamiento de la EA podría verse influida por el hecho de que los estudios apenas han estimado las

propiedades funcionales o estructurales de las moléculas de HS en la EA (Arahamian *et al.*, 2013; Alan David Snow *et al.*, 2021). En este sentido, considerando que la interacción HS-A $\beta$  contribuye en todas las etapas de la patogénesis de A $\beta$  en la EA, incluida la producción, el aclaramiento, la acumulación, la agregación y la toxicidad, parece racional suponer que la interferencia en la interacción HS-A $\beta$  podría tener múltiples efectos beneficiosos.

En conclusión, las alteraciones en los niveles de algunas proteínas núcleo de los HSPGs se asocian con lesiones típicas de la EA, tales como los ONFs, PNs y AAC. Por tanto, concluimos que subtipos específicos de HSPGs pueden tener diferentes roles en cuanto a la patogénia de las distintas lesiones de EA, especialmente para SDC4 y SRGN, cuyos niveles transcripcionales se encuentran incrementados incluso en aquellas áreas que aún no presentan lesiones histológicas de EA, destacando ambas como potenciales inductores de la enfermedad.

## 5.4. PERSPECTIVA

### Perspective

# Heparan sulfate proteoglycans as possible diagnostic molecular tools with therapeutic potential in Alzheimer's disease

Iván Fernández-Vega<sup>1</sup>, Laura Lorente-Gea, Carla Martín, Luis M. Quirós

**Importance of dementia and Alzheimer's disease (AD):** On Earth, there is a "country" that we call *Dementia* with around 50 million inhabitants and an estimated global economic cost of US \$1 trillion (Wimo et al., 2017). AD may contribute to 60–70% of cases, with other major forms of dementia being vascular dementia, dementia with Lewy bodies and a group of diseases that contribute to frontotemporal dementia. However, the boundaries between different forms of dementia are indistinct and mixed forms often co-exist, which are only confirmed after postmortem neuropathological studies (Fernández-Vega et al., 2015).

Alzheimer's disease is a debilitating neurodegenerative disorder with three cardinal histopathologic changes: beta-amyloid protein (A $\beta$ ) deposits in the form of neuritic plaques (NPs), cerebral amyloid angiopathy, which presents as microvascular plaques of A $\beta$  and neurofibrillary tangles (NFTs). Tau protein becomes hyperphosphorylated and is therefore unable to bind to microtubules, which results in the production of paired helical filaments, a building unit of NFTs. After more than a century since the first diagnosis of AD was made, there is still no treatment available to cure AD or to alter the progressive deterioration of patients. The current diagnosis of AD is based principally on the assessment of a patient's cognitive state and behavior, supported by molecular tools to quantify biomarkers (A $\beta$  peptides, neurogranin, polymorphic aggregated A $\beta$  species, Tau aggregates, hyperphosphorylated Tau, APP, and monocyte chemoattractant protein-1) in blood and cerebrospinal fluid. However, despite the great amount of research effort and resources focused on the development of molecular tools and techniques for the identification and quantification of new biomarkers, this has resulted in few meaningful changes in routine clinical diagnosis or treatment in the last few decades. As such, it seems time to change the research focus towards new possible therapeutic targets and molecular pathways such as heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) and their catalytic enzyme heparanase (HPSE).

**Heparan sulfate proteoglycans:** The proteoglycans are a family of complex macromolecules consisting of a protein core to which several heparan sulfate (HS) glycosaminoglycan (GAG) chains are covalently attached. The functions of HSPGs ultimately rely on the fine structure of these chains. The cell surface HSPGs are membrane-spanning syndecans (SDCs) and lipid-anchored glypicans (GPCs) and the matrix-associated HSPGs are agrin (AGRN), collagen type XVIII (COL18A1) and perlecan (PRCAN), and they

are also present in the secretory vesicles, i.e., serglycin (SRGN). The binding sites for many different ligands, such as growth factors, enzymes, cytokines, chemokines, and ECM, are defined by specific sets of variably modified disaccharides. Because of these interactions, HS is also involved in many physiological functions and pathologies including amyloid diseases, inflammation, infectious diseases, cancer and neurodegeneration (García et al., 2014; Vega IF et al., 2014).

Previous studies have found the variable expression of four distinct classes of PGs and GAGs associated with NFTs, NPs and cerebral amyloid angiopathy. Keratan sulfate proteoglycans, dermatan sulfate proteoglycans, and chondroitin sulfate are found only in the periphery of senile plaques (non-specific to AD), whereas HSPGs are associated with all three types of AD lesion, suggesting that this latter class has an important role in the formation and persistence of lesions (van Horssen et al., 2003).

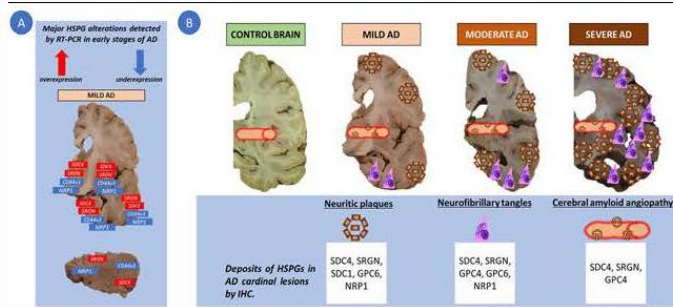
**Heparan sulfate proteoglycans and heparanases in AD:** Substantial scientific evidence exists that highlights the important roles played by HSPGs in the etiology of AD. HSPGs have been co-localized with both hyperphosphorylated Tau in NFTs and A $\beta$  in NPs. Furthermore, previous work has suggested that HSPGs may promote A $\beta$  or Tau fibrillization and described HS-A $\beta$  interaction as mutually protective, i.e., A $\beta$  is protected from protease degradation and HS is protected from the action of HPSE, an endo-D-glucuronidase that cleaves specific linkages in the structure of HS (van Horssen et al., 2003). Other published data have pointed out that the HS-A $\beta$  interaction contributes to every stage of pathogenesis in AD, including production, clearance, accumulation, aggregation, and the toxic action of A $\beta$  (van Horssen et al., 2002; Cui et al., 2013), while work over the last decade indicates that Tau can propagate aggregates between cells in a prion-like manner mediated by HSPGs (Holmes and Diamond, 2014).

We have previously observed the overexpression of HPSE and its natural competitive inhibitor heparanase 2 (HPSE2) in neurodegenerated areas of AD brains, closely correlated with the Braak & Braak stage (García et al., 2017). In our most recent published work, we focused on the analysis of the expression levels of the 17 genes that encode the core proteins of HSPGs at different stages of AD using RT-PCR, after which we localized certain significant proteins in the tissue using immunohistochemistry (Lorente-Gea et al., 2020). The most interesting finding was the consistent overexpression of SDC4 found in every brain area in samples from

all AD stages (mild, moderate and severe). Immunohistochemistry indicated that the presence of SDC4 was mainly related to Tau pathology and A $\beta$  deposits in all three types of AD lesion. SDC4 was demonstrated to be involved in endocytosis but very little is known about the real function of SDC4 in AD. However, a recently published work by Marija Usenovic et al. using *in vitro* techniques with human iPSC neurons suggested SDC4's involvement in Tau cellular internalization, and they postulated the use of SDC4 as a novel therapeutic strategy to inhibit the spread of tau pathology (Usenovic et al., 2018). As part of our research, we also noted a significant overexpression of SRGN in almost all areas of AD brains and in all types of AD lesion. In this light, considering that SRGN is the only intracellular HSPG, this molecule could play a central role in AD stabilization and progression throughout the 3-O-sulfated domains in HS chains. In addition, we also described the presence in AD of other major alterations in expression levels of HSPGs such as SDC1, GPC4, GPC6 and two "part-time" HSPGs (which can vary depending on source and growth conditions and may or may not have a GAG chain composed of HS), CD44v3 and neuropilin 1 (NRP1). These latter two molecules were also consistently underexpressed in every area from samples of mild AD (Figure 1). Regarding extracellular matrix HSPGs, most changes were observed in the limbic area, particularly the transentorhinal region and the hippocampus, as has previously been reported. AGRN and COL18A1 were also found to be involved in all three types of AD lesion. Although some articles have pointed to the presence of PRCAN in NPs, NFTs, and amyloid-laden vessels, others, including this study, have been unable to confirm these observations using monoclonal antibodies against the core protein of PRCAN. Overall, HSPG core proteins suffer precise alterations in their levels of expression (overexpression of SDC4+SRGN and underexpression of CD44v3+NRP1) that could be implemented as biomarkers to better diagnosis suspected cases of AD either on cerebrospinal fluid or blood samples. However, further studies should be performed to check the specificity of these alterations to AD and rule out their occurrence in other brain diseases as well. That said, these results may well point to a new research line in the search for an alternative therapeutic strategy against AD.

HSPGs and HPSEs play a crucial role in AD pathogenesis. While HPSE activity may help to halt the progression of the disease by breaking down A $\beta$ -HS deposits or blocking Tau intracellular fibril formation and propagation, HPSE2 appears to act as an inhibitor of HPSE. This blocking of HPSE by HPSE2 may interfere with its hypothetical beneficial role in stopping AD pathogenesis (Lorente-Gea et al., 2017). In this scenario, it is possible that the lack of progress in AD investigation may be a consequence of the underestimation of the structural and molecular roles of HS molecules in AD pathogenesis. In this regard, considering that HS-A $\beta$  interaction contributes to every stage of A $\beta$  pathogenesis in AD, it seems reasonable to hypothesize that interfering in the HS-A $\beta$  interaction could have multiple beneficial effects. In this vein, in our latest work we were able to identify SDC4 and SRGN

Perspective



**Figure 1 | Schematic representation of the principle alterations of HSPG core proteins in AD.** (A) Significant HSPG molecular modifications detected by RT-PCR in early stages of AD. (B) HSPG core proteins co-localized in neurotic plaques, neurofibrillary tangles and cerebral amyloid angiopathy. AD: Alzheimer's disease; GPC: glypican; HSPG: heparan sulfate proteoglycans; NRP1: neuropilin 1; RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction; SDC: syndecan; SRGN: serglycin.

as the HSPGs molecules that were most often altered in every stage of AD. Although further research is needed in this field, the information above could lead to the development of novel insights into AD pathogenesis and may lead to the development of innovative therapeutic strategies.

For example, HS-protein interactions and specific motifs on HS chains are emerging as potential therapeutic targets in AD. To this end, we briefly describe here some of the most promising therapeutic findings using HSPGs against AD. In experiments using zebrafish, the role of HS has been targeted through two different approaches. HS antagonists (surfen and oxalyl surfen) have been identified as efficient therapeutic candidates for 3-O-sulfated HS and 6-O-sulfated HS motifs in tau pathology, known to be critical for tau seed internalization (Alavi Naini and Soussi-Yanicostas, 2018). On the other hand, targeting pathological tau proteins via immunotherapy also appears to be a promising strategy for the disease-modifying treatment of AD. To this effect, the administration of exogenous antibodies (passive immunotherapy) such as DC8E8 against the microtubule binding domain containing DC8E8 epitopes and HSPGs on the neuron surface, has shown in animals to block cell-to-cell propagation of tau by preventing the neuronal internalization of extracellular tau, (Weisova et al., 2019). Specific clinical trials are ongoing using both these approaches.

As outlined above, HSPG and HPSEs play significant and multifactorial roles in the pathogenesis of AD. Additional studies, however, remain to be performed to further clarify the roles of SDC4, SRGN and many other HSPGs involved in AD pathology. Although specific HSPGs have been immunohistochemically localized in the principle histological lesions of AD, their biochemical isolation from these structures, which would allow for the identification of the number of GAG chains and the extent and position of GAG sulfation, has yet to be performed. This determination of the chemical structure of HSPG is a necessary step toward a complete understanding of the roles of HSPG in the etiology of AD. It may also facilitate the discovery of possible alterations in HSPG metabolism in AD and resolve apparent discrepancies in the immunohistochemical localization of HSPG core proteins in cardinal

histopathological lesions in AD.

**Conclusion:** Specific alterations in HSPGs and HPSEs have been described in recent years that support the idea that these molecules play a crucial role in AD pathogenesis. However, a deeper understanding of the chemical structure of HSPGs would assist in the development of rational, targeted therapeutic strategies to combat AD, the most frequent neurodegenerative disease. Preliminary studies are currently ongoing in our laboratory concerning the biochemical determination of the chemical structure of HSPGs in order to better understand their roles in AD pathogenesis. In conclusion, we have shown briefly here several novel insights concerning HSPGs in AD pathogenesis that might lead to the development of additional diagnostic biomarkers and strengthen new innovative therapeutic strategies.

**Iván Fernández-Vega\*, Laura Lorente-Gea, Carla Martín, Luis M. Quirós**

Department of Pathology, Hospital Universitario Central de Asturias, Biobank of Principality of Asturias, Health Research Institute of the Principality of Asturias, Oviedo, Spain (Fernández-Vega I)  
 Department of Pathology, Hospital Universitario de Araba-Ixagorritxu; Biobanco Vasco para la Investigación (O+eHun), Brain Bank, Hospital Universitario, Vitoria, Spain (Fernández-Vega I, Lorente-Gea L)  
 Instituto Universitario Fernández-Vega, Oviedo, Spain (Fernández-Vega I, Martín C, Quirós LM)  
 Department of Functional Biology, University of Oviedo, Spain (Quirós LM)

\*Correspondence to: Iván Fernández-Vega, MD, PhD, ivan\_fernandez\_vega@hotmail.com. <https://orcid.org/0000-0000> (Iván Fernández-Vega)

Received: June 7, 2020

Peer review started: August 4, 2020

Accepted: September 17, 2020

Published online: 2020

<https://doi.org/10.4103/>

**How to cite this article:** Fernández-Vega I, Lorente-Gea L, Martín C, Quirós LM (2021) Heparan sulfate proteoglycans as possible diagnostic molecular tools with therapeutic

potential in Alzheimer's disease. *Neural Regen Res* 16(0):000-000.

**Copyright license agreement:** The Copyright License Agreement has been signed by all authors before publication.

**Plagiarism check:** Checked twice by iThenticate.

**Peer review:** Externally peer reviewed.

**Open access statement:** This is an open access journal, and articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 License, which allows others to remix, tweak, and build upon the work non-commercially, as long as appropriate credit is given and the new creations are licensed under the identical terms.

**Open peer reviewer:** Hong Xu, University of Pennsylvania, USA.

**Additional file:** Open peer review report 1.

References

Alavi Naini SM, Soussi-Yanicostas N (2018) Heparan sulfate as a therapeutic target in tauopathies: insights from zebrafish. *Front Cell Dev Biol* 6:163.

Cui H, Freeman C, Jacobson GA, Small DH (2013) Proteoglycans in the central nervous system: role in development, neural repair, and Alzheimer's disease. *IUBMB Life* 65:108-120.

Fernandez-Vega I, Ruiz-Ojeda J, Juste RA, Gejjo M, Zarranz JJ, Sanchez-Menoyo JL, Vicente-Etxenautia I, Mediavilla-García J, Guerra-Merino I (2015) Coexistence of mixed phenotype Creutzfeldt-Jakob disease, Lewy body disease and argyrophilic grain disease plus histological features of possible Alzheimer's disease: a multi-protein disorder in an autopsy case. *Neuropathology* 35:56-63.

García B, Martín C, García-Suárez O, Muniz-Alonso B, Ordiales H, Fernández-Menéndez S, Santos-Juanes J, Lorente-Gea L, Castañón S, Vicente-Etxenautia I, Pina-Batista KM, Ruiz-Díaz I, Caballero-Martínez MC, Merayo-Lloves J, Guerra-Merino I, Quirós LM, Fernández-Vega I (2017) Upregulated expression of heparanase and heparanase 2 in the brains of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 58:185-192.

García B, Fernández-Vega I, García-Suárez O, Castañón S, Quirós LM (2014) The role of heparan sulfate proteoglycans in bacterial infections. *J Med Microb Diagn* 3:157.

Holmes BB, Diamond MI (2014) Prion-like properties of Tau protein: the importance of extracellular Tau as a therapeutic target. *J Biol Chem* 289:19855-19861.

Lorente-Gea L, García B, Martín C, Quirós LM, Fernández-Vega I (2017) Heparan sulfate proteoglycans and heparanases in Alzheimer's disease: current outlook and potential therapeutic targets. *Neural Regen Res* 12:914-915.

Lorente-Gea L, García B, Martín C, Ordiales H, García-Suárez O, Pina-Batista KM, Merayo-Lloves J, Quirós LM, Fernández-Vega I (2020) Heparan sulfate proteoglycans undergo differential expression alterations in Alzheimer disease brains. *J Neuropathol Exp Neurol* 79:474-483.

Userovic M, Suon S, Gretzula CA, Parmentier-Batteur S (2018) Novel targets for blocking the uptake of tau oligomers in hippocampal neurons. *Alzheimers Dement* 14:P1140-P1141.

van Horsen J, Wesseling P, van den Heuvel LP, de Waal RM, Verbeek MM (2003) Heparan sulphate proteoglycans in Alzheimer's disease and amyloid-related disorders. *Lancet Neurol* 2:482-492.

van Horsen J, Kleijnijshuis J, Maass CN, Rensink AA, Otte-Holler I, David G, van den Heuvel LP, Wesseling P, de Waal RM, Verbeek MM (2002) Accumulation of heparan sulfate proteoglycans in cerebellar senile plaques. *Neurobiol Aging* 23:537-545.

Vega IF, GB, Suárez OG, Castañón S, Quirós LM (2014) Alterations of heparan sulfate proteoglycans in cancer. *J Glycobiol* 3:1-6.

Weisova P, Cehlár O, Skrabana R, Zilkova M, Filipcik P, Kovacech B, Prcina M, Wojcikova L, Fialova L, Smolek T, Kontsejkova E, Zilka N, Novak M (2019) Therapeutic antibody targeting microtubule-binding domain prevents neuronal internalization of extracellular tau via masking neuron surface proteoglycans. *Acta Neuropathol Commun* 7:129.

Wimo A, Guerchet M, Ali GC, Wu YT, Prina AM, Wimlad B, Jonsson L, Liu Z, Prince M (2017) The worldwide costs of dementia 2015 and comparisons with 2010. *Alzheimers Dement* 13:1-7.

P-Reviewer Xu H; C-Editors Zhou M, Qiu Y; T-Editor Jia Y

## 6. CONCLUSIONES

---





1. El análisis de las alteraciones en los niveles de transcripción de los genes de las HPSEs y las proteínas núcleo de los HSPGs en la región transentorrinal, hipocampo anterior, hipocampo posterior, claustrum, cisura calcarina, globo pálido y cerebelo en pacientes de EA leves, moderados y severos mostró alteraciones relevantes en la mayor parte de los casos.
2. El estudio de los niveles de expresión de las HPSEs identificó una intensa sobreexpresión de *HPSE* y *HPSE2* preferentemente en el sistema límbico y neocórtex de enfermos con EA y en su mayoría dependientes del estadio Braak & Braak. Cabe resaltar que la *HPSE* se subexpresó en el núcleo pálido y la *HPSE2* se sobreexpresó significativamente a nivel del cerebelo, una estructura aparentemente poco afectada en la EA.
3. El estudio inmunohistoquímico mostró la presencia de HPSE y HPSE2 en relación con las principales lesiones histopatológicas de la EA, a destacar los ONFs y PNs. La expresión de HPSE a nivel de las PNs fue preferentemente en aquellas con núcleos fragmentados.
4. El estudio de los niveles de expresión de las proteínas núcleo de los HSPGs mostró alteraciones en su mayoría dependientes del estadio Braak & Braak y que se describen a continuación:
  - a. En la familia de los SDCs, los niveles de expresión de *SDC2* y *SDC3* se alteraron al alza preferentemente en casos de EA leve y moderado. El *SDC1* fue el SDC con menos niveles de expresión en el tejido y sin alteraciones significativas en comparación con los cerebros control. Cabe destacar como hecho relevante que se identificó una sobreexpresión constante de *SDC4* en todas las áreas y en todos los estadios de los cerebros con EA.
  - b. En la familia de los GPCs, se subexpresaron significativamente en el claustrum y, el *GPC1*, *GPC5* y *GPC6* lo hicieron también a nivel del cerebelo. Curiosamente, el *GPC1*, el *GPC2* y el *GPC3* se sobreexpresaron en áreas límbicas del cerebro, más notablemente en las etapas severas de la EA. Por otra parte, el *GPC2* y el *GPC4* mostraron menos alteraciones significativas en sus niveles de transcripción en la EA que otros miembros de la familia.
  - c. En general, los genes de los HSPGs de MEC mostraron menos alteraciones que los HSPGs de superficie celular. La mayoría tendieron a subexpresarse especialmente a nivel del claustrum y el cerebelo. Destacó una sobreexpresión del *COL18A1* preferentemente en el sistema límbico de casos avanzados de EA.
  - d. En relación con los HSPGs a tiempo parcial, se identificó que los genes *CD44v3* y *NRP1* se subexpresaron de manera significativa en la mayoría de las áreas analizadas del cerebro y para casi todas las etapas de la EA. Para el caso del gen *TGFBR3* la subexpresión fue

más restringida a nivel del pálido y el cerebelo. Por el contrario, se identificó una sobreexpresión significativa y consistente de *SRGN* en casi todas las áreas analizadas para cerebros con EA moderada y severa.

5. El estudio inmunohistoquímico realizado a las proteínas núcleo de los HSPGs mayormente alterados mostró como hechos relevantes:
  - a. En la familia de los SDCs, una inmunoexpresión del SDC4 débil a moderada en el neurópilo y en los tres tipos de lesiones características de EA que incluyen PNs, ONFs y AAC.
  - b. En la familia de los GPCs, una inmunoexpresión débil a moderada de GPC4 y GPC6 en neuronas principalmente en relación con pre-ONFs y ONFs. Se detectaron además depósitos de GPC4 en las paredes de las arteriolas con AAC y de GPC6 a nivel de las PNs.
  - c. Para los HSPGs de la MEC, el estudio inmunohistoquímico del PRCAN no mostró cambios en los casos de EA en comparación con el tejido cerebral sano.
  - d. Para los HSPGs a tiempo parcial, se observó una inmunoexpresión débil a moderada de NRP1 en el neurópilo y en algunas neuronas de la neocorteza con pre-ONFs y con ONFs, así como en PNs. Como hecho relevante cabe destacar que se observó una inmunoexpresión mayormente intensa para *SRGN* en los tres tipos de lesiones histopatológicas características de la EA.
6. Se han identificado alteraciones en los niveles de expresión de las HPSEs y de las proteínas núcleo de los HSPGs a nivel del cerebelo, una estructura aparentemente preservada en la EA.



## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---



- Ai, X., Do, A. T., Kusche-Gullberg, M., Lindahl, U., Lu, K., & Emerson, C. P. (2006). Substrate specificity and domain functions of extracellular heparan sulfate 6-O-endosulfatases, QSulf1 and QSulf2. *Journal of Biological Chemistry*, 281(8), 4969-4976. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511902200>
- Allen, H. B. (2016). Alzheimer's Disease: Assessing the Role of Spirochetes, Biofilms, the Immune System, and Amyloid- $\beta$  with Regard to Potential Treatment and Prevention. En *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 53, Número 4, pp. 1271-1276). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JAD-160388>
- Almeida, C. G., Takahashi, R. H., & Gouras, G. K. (2006).  $\beta$ -amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system. *Journal of Neuroscience*, 26(16), 4277-4288. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5078-05.2006>
- Alonso, A. D. C., Grundke-Iqbal, I., Barra, H. S., & Iqbal, K. (1997). Abnormal phosphorylation of tau and the mechanism of Alzheimer neurofibrillary degeneration: Sequestration of microtubule-associated proteins 1 and 2 and the disassembly of microtubules by the abnormal tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(1), 298-303. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.1.298>
- Alonso, R., Pisa, D., Marina, A. I., Morato, E., Rábano, A., & Carrasco, L. (2014). Fungal infection in patients with Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 41(1), 301-311. <https://doi.org/10.3233/JAD-132681>
- Ancsin, J. B. (2003). Amyloidogenesis: Historical and modern observations point to heparan sulfate proteoglycans as a major culprit. En *Amyloid* (Vol. 10, Número 2, pp. 67-79). Parthenon Publishing Group Ltd. <https://doi.org/10.3109/13506120309041728>
- Annweiler, C., Rolland, Y., Schott, A. M., Blain, H., Vellas, B., Herrmann, F. R., & Beauchet, O. (2012). Higher vitamin D dietary intake is associated with lower risk of Alzheimer's disease: A 7-year follow-up. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 67(11), 1205-1211. <https://doi.org/10.1093/gerona/gls107>
- Apostolova, L. G. (2016). Alzheimer Disease. *Continuum (Minneapolis, Minn)*, 22(2 Dementia), 419-434. <https://doi.org/10.1212/con.0000000000000307>
- Aprahamian, I., Stella, F., & Forlenza, O. V. (2013). New treatment strategies for Alzheimer's disease: is there a hope? *The Indian Journal of Medical Research*, 138(4), 449-460.
- Armstrong, R. A. (2009). The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Folia Neuropathologica*, 47(4), 289-299.
- Armstrong, R. A. (2011). The pathogenesis of Alzheimer's disease: A reevaluation of the «amyloid cascade hypothesis». *International Journal of*

- Alzheimer's Disease*, 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/630865>
- Asti, A., & Gioglio, L. (2014). Can a bacterial endotoxin be a key factor in the kinetics of amyloid fibril formation? *Journal of Alzheimer's Disease*, 39(1), 169-179. <https://doi.org/10.3233/JAD-131394>
- Attems, J., & Jellinger, K. A. (2014). The overlap between vascular disease and Alzheimer's disease - lessons from pathology. *BMC Medicine*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s12916-014-0206-2>
- Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., & Jones, E. (2011). Alzheimer's disease. En *The Lancet* (Vol. 377, Número 9770, pp. 1019-1031). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61349-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61349-9)
- Bame, K. J., Danda, J., Hassall, A., & Tumova, S. (1997). A $\beta$ (1-40) prevents heparanase-catalyzed degradation of heparan sulfate glycosaminoglycans and proteoglycans in vitro. A role for heparan sulfate proteoglycan turnover in Alzheimer's disease. *Journal of Biological Chemistry*, 272(27), 17005-17011. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.27.17005>
- Barnes, D. E., & Yaffe, K. (2011). The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. En *The Lancet Neurology* (Vol. 10, Número 9, pp. 819-828). *Lancet Neurol.* [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70072-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70072-2)
- Barrett, P. J., Song, Y., Van Horn, W. D., Hustedt, E. J., Schafer, J. M., Hadziselimovic, A., Beel, A. J., & Sanders, C. R. (2012). The amyloid precursor protein has a flexible transmembrane domain and binds cholesterol. *Science*, 336(6085), 1168-1171. <https://doi.org/10.1126/science.1219988>
- Bartus, R. T. (2000). On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: Lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. En *Experimental Neurology* (Vol. 163, Número 2, pp. 495-529). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1006/exnr.2000.7397>
- Baruch-Suchodolsky, R., & Fischer, B. (2009). A $\beta$ 40, either soluble or aggregated, is a remarkably potent antioxidant in cell-free oxidative systems. *Biochemistry*, 48(20), 4354-4370. <https://doi.org/10.1021/bi802361k>
- Barzegar, K., & Barzegar, S. (2017). Chess therapy: A new approach to curing panic attack. En *Asian Journal of Psychiatry* (Vol. 30, pp. 118-119). *Asian J Psychiatr.* <https://doi.org/10.1016/j.ajp.2017.08.019>
- Basak, J. M., & Kim, J. (2010). Differential effects of apoe isoforms on dendritic spines in vivo: Linking an alzheimer's disease risk factor with synaptic Alterations. En *Journal of Neuroscience* (Vol. 30, Número 13, pp. 4526-4527). *J Neurosci.* <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0505-10.2010>

- Bekris, L. M., Yu, C.-E. E., Bird, T. D., & Tsuang, D. W. (2010). Genetics of Alzheimer disease. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, 23(4), 213-227. <https://doi.org/10.1177/0891988710383571>
- Bellucci, C., Lilli, C., Baroni, T., Parnetti, L., Sorbi, S., Emiliani, C., Lumare, E., Calabresi, P., Balloni, S., & Bodo, M. (2007). Differences in extracellular matrix production and basic fibroblast growth factor response in skin fibroblasts from sporadic and familial Alzheimer's disease. *Molecular Medicine*, 13(9-10), 542-550. <https://doi.org/10.2119/2007-00034.Bellucci>
- Bennett, D. A., Schneider, J. A., Arvanitakis, Z., Kelly, J. F., Aggarwal, N. T., Shah, R. C., & Wilson, R. S. (2006). Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies. *Neurology*, 66(12), 1837-1844. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000219668.47116.e6>
- Berchtold, N. C., & Cotman, C. W. (1998). Evolution in the conceptualization of dementia and Alzheimer's disease: Greco-Roman period to the 1960s. *Neurobiology of Aging*, 19(3), 173-189. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(98\)00052-9](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(98)00052-9)
- Bernfield, M., Götte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J., & Zako, M. (1999). Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. En *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 68, pp. 729-777). Annu Rev Biochem. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.729>
- Bernfield, M., Kokenyesi, R., Kato, M., Hinkes, M. T., Spring, J., Gallo, R. L., & Lose, E. J. (1992). Biology of the syndecans: A family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. En *Annual Review of Cell Biology* (Vol. 8, pp. 365-393). Annu Rev Cell Biol. <https://doi.org/10.1146/annurev.cb.08.110192.002053>
- Bertram, L., & Tanzi, R. E. (2004). Alzheimer's disease: One disorder, too many genes? En *Human Molecular Genetics* (Vol. 13, Número REV. ISS. 1). Hum Mol Genet. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh077>
- Bezakova, G., & Lømo, T. (2001). Muscle activity and muscle agrin regulate the organization of cytoskeletal proteins and attached acetylcholine receptor (AChR) aggregates in skeletal muscle fibers. *Journal of Cell Biology*, 153(7), 1453-1463. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.7.1453>
- Bihaqi, S. W., Bahmani, A., Subaiea, G. M., & Zawia, N. H. (2014). Infantile exposure to lead and late-age cognitive decline: Relevance to AD. *Alzheimer's and Dementia*, 10(2), 187-195. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.02.012>
- Bird, T. D., Lampe, T. H., Nemens, E. J., Sumi, S. M., Nochlin, D., Schellenberg, G. D., & Wijsman, E. M. (1989). Characteristics of familial Alzheimer's disease in nine kindreds of Volga German ancestry. *Progress in Clinical and Biological Research*, 317, 229-234.

- Boada, M., Anaya, F., Ortiz, P., Olazarán, J., Shua-Haim, J. R., Obisesan, T. O., Hernández, I., Muñoz, J., Buendia, M., Alegret, M., Lafuente, A., Tárraga, L., Núñez, L., Torresh, M., Ramon Grifols, J., Ferrer, I., Lopez, O. L., & Páezh, A. (2017). Efficacy and safety of plasma exchange with 5% albumin to modify cerebrospinal fluid and plasma amyloid- $\beta$  concentrations and cognition outcomes in Alzheimer's disease patients: A multicenter, randomized, controlled clinical trial. *Journal of Alzheimer's Disease*, *56*(1), 129-143. <https://doi.org/10.3233/JAD-160565>
- Bonche, R., Chessel, A., Boisivon, S., Smolen, P., Thérond, P., & Pizette, S. (2021). Two different sources of Perlecan cooperate for its function in the basement membrane of the Drosophila wing imaginal disc. *Developmental Dynamics*, *250*(4), 542-561. <https://doi.org/10.1002/dvdy.274>
- Bosseboeuf, E., & Raimondi, C. (2020). Signalling, Metabolic Pathways and Iron Homeostasis in Endothelial Cells in Health, Atherosclerosis and Alzheimer's Disease. *Cells*, *9*(9). <https://doi.org/10.3390/cells9092055>
- Braak, H., Alafuzoff, I., Arzberger, T., Kretzschmar, H., & Tredici, K. (2006). Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathologica*, *112*(4), 389-404. <https://doi.org/10.1007/s00401-006-0127-z>
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. En *Acta Neuropathologica* (Vol. 82, Número 4, pp. 239-259). Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/BF00308809>
- Braak, H., & Braak, E. (1996). Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*, *94*(SUPPL.165), 3-12. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1996.tb05866.x>
- Braak, H., Thal, D. R., Ghebremedhin, E., & Del Tredici, K. (2011). Stages of the pathologic process in alzheimer disease: Age categories from 1 to 100 years. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *70*(11), 960-969. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e318232a379>
- Braak, H., & Tredici, K. Del. (2018). Spreading of tau pathology in sporadic Alzheimer's disease along cortico-cortical top-down connections. *Cerebral Cortex*, *28*(9), 3372-3384. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhy152>
- Broce, I. J., Tan, C. H., Fan, C. C., Jansen, I., Savage, J. E., Witoelar, A., Wen, N., Hess, C. P., Dillon, W. P., Glastonbury, C. M., Glymour, M., Yokoyama, J. S., Elahi, F. M., Rabinovici, G. D., Miller, B. L., Mormino, E. C., Sperling, R. A., Bennett, D. A., McEvoy, L. K., ... Desikan, R. S. (2019). Dissecting the genetic relationship between cardiovascular risk factors and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, *137*(2), 209-226. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1928-6>
- Brown, J. C., Sasaki, T., Göhring, W., Yamada, Y., & Timpl, R. (1997). The C-terminal domain V of perlecan promotes  $\beta$ 1 integrin-mediated cell adhesion, binds heparin, nidogen and fibulin-2 and can be modified by

- glycosaminoglycans. *European Journal of Biochemistry*, 250(1), 39-46. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00039.x>
- Bruinsma, I. B., Te Riet, L., Gevers, T., Ten Dam, G. B., Van Kuppevelt, T. H., David, G., Küsters, B., De Waal, R. M. W., & Verbeek, M. M. (2010). Sulfation of heparan sulfate associated with amyloid- $\beta$  plaques in patients with Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 119(2), 211-220. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0577-1>
- Brundin, P., Melki, R., & Kopito, R. (2010). Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. En *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 11, Número 4, pp. 301-307). Nat Rev Mol Cell Biol. <https://doi.org/10.1038/nrm2873>
- Bussi re, T., Bard, F., Barbour, R., Grajeda, H., Guido, T., Khan, K., Schenk, D., Games, D., Seubert, P., & Buttini, M. (2004). Morphological characterization of Thioflavin-S-positive amyloid plaques in transgenic Alzheimer mice and effect of passive Abeta immunotherapy on their clearance. *The American Journal of Pathology*, 165(3), 987-995. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)63360-3](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63360-3)
- Cacabelos, R. (1990). [The neurobiology and molecular genetics of Alzheimer's disease: the diagnostic markers and therapy]. *Medicina clinica*, 95(13), 502-516.
- Cárdenas, A. M., Ardiles, A. O., Barraza, N., Ba ez-Matus, X., & Caviedes, P. (2012). Role of Tau Protein in Neuronal Damage in Alzheimer's Disease and Down Syndrome. En *Archives of Medical Research* (Vol. 43, Número 8, pp. 645-654). Arch Med Res. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2012.10.012>
- Changyaleket, B., Deliu, Z., Chignalia, A. Z., & Feinstein, D. L. (2017). Heparanase: Potential roles in multiple sclerosis. En *Journal of Neuroimmunology* (Vol. 310, pp. 72-81). J Neuroimmunol. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.07.001>
- Charidimou, A., Peeters, A., Fox, Z., Gregoire, S. M., Vandermeeren, Y., Laloux, P., J ger, H. R., Baron, J.-C., & Werring, D. J. (2012). Spectrum of transient focal neurological episodes in cerebral amyloid angiopathy: multicentre magnetic resonance imaging cohort study and meta-analysis. *Stroke*, 43(9), 2324-2330. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.112.657759>
- Chartier-hariln, M. C., Parfitt, M., Legrain, S., Pérez-tur, J., Brousseau, T., Evans, A., Berr, C., Vldal, O., Roques, P., Gourlet, V., Fruchart, J. C., Delacourte, A., Rossor, M., & Amouyel, P. (1994). Apolipoprotein e,  $\epsilon$ 4 allele as a major risk factor for sporadic early and late-onset forms of alzheimer's disease: Analysis of the 19q13.2 chromosomal region. *Human Molecular Genetics*, 3(4), 569-574. <https://doi.org/10.1093/hmg/3.4.569>
- Chiu, W. C., Tsan, Y. T., Tsai, S. L., Chang, C. J., Wang, J. D., & Chen, P. C. (2014). Hepatitis C viral infection and the risk of dementia. *European Journal of Neurology*, 21(8). <https://doi.org/10.1111/ene.12317>

- Christianson, H. C., & Belting, M. (2014). Heparan sulfate proteoglycan as a cell-surface endocytosis receptor. *Matrix Biology*, 35, 51-55. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.10.004>
- Consensus recommendations for the postmortem diagnosis of Alzheimer's disease. The National Institute on Aging, and Reagan Institute Working Group on Diagnostic Criteria for the Neuropathological Assessment of Alzheimer's Disease. (1997). *Neurobiology of Aging*, 18(4 Suppl), S1-2.
- Corder, E. H., Saunders, A. M., Strittmatter, W. J., Schmechel, D. E., Gaskell, P. C., Small, G. W., Roses, A. D., Haines, J. L., & Pericak-Vance, M. A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*, 261(5123), 921-923. <https://doi.org/10.1126/science.8346443>
- Cornelison, D. D. W., Filla, M. S., Stanley, H. M., Rapraeger, A. C., & Olwin, B. B. (2001). Syndecan-3 and syndecan-4 specifically mark skeletal muscle satellite cells and are implicated in satellite cell maintenance and muscle regeneration. *Developmental Biology*, 239(1), 79-94. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0416>
- Coyle, J. T., Price, D. L., & DeLong, M. R. (1983). Alzheimer's disease: A disorder of cortical cholinergic innervation. *Science*, 219(4589), 1184-1190. <https://doi.org/10.1126/science.6338589>
- Craig, L. A., Hong, N. S., & McDonald, R. J. (2011). Revisiting the cholinergic hypothesis in the development of Alzheimer's disease. En *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 35, Número 6, pp. 1397-1409). *Neurosci Biobehav Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.03.001>
- Cras, P., Smith, M. A., Richey, P. L., Siedlak, S. L., Mulvihill, P., & Perry, G. (1995). Extracellular neurofibrillary tangles reflect neuronal loss and provide further evidence of extensive protein cross-linking in Alzheimer disease. *Acta Neuropathologica*, 89(4), 291-295. <https://doi.org/10.1007/BF00309621>
- Crook, R., Verkkoniemi, A., Perez-Tur, J., Mehta, N., Baker, M., Houlden, H., Farrer, M., Hutton, M., Lincoln, S., Hardy, J., Gwinn, K., Somer, M., Paetau, A., Kalimo, H., Ylikoski, R., Pöyhönen, M., Kucera, S., & Haltia, M. (1998). A variant of Alzheimer's disease with spastic paraparesis and unusual plaques due to deletion of exon 9 of presenilin 1. *Nature Medicine*, 4(4), 452-455. <https://doi.org/10.1038/nm0498-452>
- Crutch, S. J., Lehmann, M., Schott, J. M., Rabinovici, G. D., Rossor, M. N., & Fox, N. C. (2012). Posterior cortical atrophy. En *The Lancet Neurology* (Vol. 11, Número 2, pp. 170-178). *Lancet Neurol.* [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70289-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70289-7)
- Cui, H., Freeman, C., Jacobson, G. A., & Small, D. H. (2013). Proteoglycans in the central nervous system: Role in development, neural repair, and Alzheimer's disease. En *IUBMB Life* (Vol. 65, Número 2, pp. 108-120).



- IUBMB Life. <https://doi.org/10.1002/iub.1118>
- Daneshvar Kakhaki, R., Kouchaki, E., Dadgostar, E., Behnam, M., Tamtaji, O. R., Nikoueinejad, H., & Akbari, H. (2020). The correlation of helios and neuropilin-1 frequencies with parkinson disease severity. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, *192*. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2020.105833>
- David, G. (1993). Integral membrane heparan sulfate proteoglycans. *The FASEB Journal*, *7*(11), 1023-1030. <https://doi.org/10.1096/fasebj.7.11.8370471>
- De Agostini, A. I., Dong, J. C., Arrighi, C. D. V., Ramus, M. A., Dentand-Quadri, I., Thalmann, S., Ventura, P., Ibecheole, V., Monge, F., Fischer, A. M., Hajmohammadi, S., Shworak, N. W., Zhang, L., Zhang, Z., & Linhardt, R. J. (2008). Human follicular fluid heparan sulfate contains abundant 3-O-sulfated chains with anticoagulant activity. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(42), 28115-28124. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805338200>
- de Pedro-Cuesta, J., Virués-Ortega, J., Vega, S., Seijo-Martínez, M., Saz, P., Rodríguez, F., Rodríguez-Laso, A., Reñé, R., de las Heras, S. P., Mateos, R., Martínez-Martín, P., Manubens, J. M., Mahillo-Fernandez, I., López-Pousa, S., Lobo, A., Reglà, J. L., Gascón, J., García, F. J., Fernández-Martínez, M., ... del Barrio, J. L. (2009). Prevalence of dementia and major dementia subtypes in Spanish populations: A reanalysis of dementia prevalence surveys, 1990-2008. *BMC Neurology*, *9*, 55. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-9-55>
- De Strooper, B., Iwatsubo, T., & Wolfe, M. S. (2012). Presenilins and  $\gamma$ -secretase: Structure, function, and role in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006304>
- Dean, D. C., Jerskey, B. A., Chen, K., Protas, H., Thiyyagura, P., Roontiva, A., O'Muircheartaigh, J., Dirks, H., Waskiewicz, N., Lehman, K., Siniard, A. L., Turk, M. N., Hua, X., Madsen, S. K., Thompson, P. M., Fleisher, A. S., Huentelman, M. J., Deoni, S. C. L., & Reiman, E. M. (2014). Brain differences in infants at differential genetic risk for late-onset alzheimer disease: A cross-sectional imaging study. *JAMA Neurology*, *71*(1), 11-22. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.4544>
- Deininger, M. H., Fimmen, B. A., Thal, D. R., Schluessener, H. J., & Meyermann, R. (2002). Aberrant neuronal and paracellular deposition of endostatin in brains of patients with Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, *22*(24), 10621-10626. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-24-10621.2002>
- Delloye-Bourgeois, C., Moret, F., & Castellani, V. (2017). Performing axon orientation assays with secreted semaphorins and other guidance cues. *Methods in Molecular Biology*, *1493*, 237-246. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6448-2\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6448-2_17)
- Denys, A., & Allain, F. (2019). The emerging roles of heparan sulfate 3-O-

- sulfotransferases in cancer. En *Frontiers in Oncology* (Vol. 9, Número JUN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00507>
- DeSimone, C. V., Graff-Radford, J., El-Harasis, M. A., Rabinstein, A. A., Asirvatham, S. J., & Holmes, D. R. (2017). Cerebral Amyloid Angiopathy: Diagnosis, Clinical Implications, and Management Strategies in Atrial Fibrillation. En *Journal of the American College of Cardiology* (Vol. 70, Número 9, pp. 1173-1182). *J Am Coll Cardiol.* <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.07.724>
- Djordjevic, J., Golam Sabbir, M., & C. Albeni, B. (2016). Traumatic Brain Injury as a Risk Factor for Alzheimer's Disease: Is Inflammatory Signaling a Key Player? *Current Alzheimer Research*, 13(7), 730-738. <https://doi.org/10.2174/1567205013666160222110320>
- Dong, S., Cole, G. J., & Halfter, W. (2003). Expression of collagen XVIII and localization of its glycosaminoglycan attachment sites. *Journal of Biological Chemistry*, 278(3), 1700-1707. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209276200>
- Doran, E., Keator, D., Head, E., Phelan, M. J., Kim, R., Totoiu, M., Barrio, J. R., Small, G. W., Potkin, S. G., & Lott, I. T. (2017). Down Syndrome, Partial Trisomy 21, and Absence of Alzheimer's Disease: The Role of APP. *Journal of Alzheimer's Disease*, 56(2), 459-470. <https://doi.org/10.3233/JAD-160836>
- Dowd, S. B., & Davidhizar, R. (2003). Can mental and physical activities such as chess and gardening help in the prevention and treatment of Alzheimer's? Healthy aging through stimulation of the mind. *The Journal of Practical Nursing*, 53(3), 11-13.
- Drachman, D. A. (2014). The amyloid hypothesis, time to move on: Amyloid is the downstream result, not cause, of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*, 10(3), 372-380. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.11.003>
- Dubois, B., Hampel, H., Feldman, H. H., Scheltens, P., Aisen, P. S., Andrieu, S., Bakardjian, H., Benali, H., Bertram, L., Blennow, K., Broich, K., Cavedo, E., Crutch, S., Dartigues, J. F., Duyckaerts, C., Epelbaum, S., Frisoni, G. B., Gauthier, S., Genthon, R., ... Jack, C. R. (2016). Preclinical Alzheimer's disease: Definition, natural history, and diagnostic criteria. *Alzheimer's and Dementia*, 12(3), 292-323. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.02.002>
- Dubois, B., Villain, N., Frisoni, G. B., Rabinovici, G. D., Sabbagh, M., Cappa, S., Bejanin, A., Bombois, S., Epelbaum, S., Teichmann, M., Habert, M. O., Nordberg, A., Blennow, K., Galasko, D., Stern, Y., Rowe, C. C., Salloway, S., Schneider, L. S., Cummings, J. L., & Feldman, H. H. (2021). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: recommendations of the International Working Group. *The Lancet. Neurology*, 20(6), 484-496. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(21\)00066-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(21)00066-1)
- Duyckaerts, C., Braak, H., Brion, J. P., Buée, L., Del Tredici, K., Goedert, M., Halliday, G., Neumann, M., Spillantini, M. G., Tolnay, M., & Uchihara, T.

- (2015). PART is part of Alzheimer disease. *Acta Neuropathologica*, 129(5), 749-756. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1390-7>
- El Masri, R., Seffouh, A., Lortat-Jacob, H., & Vivès, R. R. (2017). The "in and out" of glucosamine 6-O-sulfation: the 6th sense of heparan sulfate. En *Glycoconjugate Journal* (Vol. 34, Número 3, pp. 285-298). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s10719-016-9736-5>
- Esko, J. D., & Lindahl, U. (2001). Molecular diversity of heparan sulfate. *Journal of Clinical Investigation*, 108(2), 169-173. <https://doi.org/10.1172/jci13530>
- Esko, J. D., & Selleck, S. B. (2002). Order out of chaos: Assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. En *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 71, pp. 435-471). Annu Rev Biochem. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135458>
- Esparza, T. J., Zhao, H., Cirrito, J. R., Cairns, N. J., Bateman, R. J., Holtzman, D. M., & Brody, D. L. (2013). Amyloid-beta oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls. *Annals of Neurology*, 73(1), 104-119. <https://doi.org/10.1002/ana.23748>
- Falter, A., & Van Den Bossche, M. J. A. (2021). How non-rapid eye movement sleep and Alzheimer pathology are linked. *World journal of psychiatry*, 11(11), 1027-1038. <https://doi.org/10.5498/WJP.V11.I11.1027>
- Fechheimer, M., Furukawa, R., Maselli, A., & Davis, R. C. (2002). Hirano bodies in health and disease. *Trends in Molecular Medicine*, 8(12), 590-591. [https://doi.org/10.1016/s1471-4914\(02\)02439-5](https://doi.org/10.1016/s1471-4914(02)02439-5)
- Fernández-Vega, I., García-Suárez, O., García, B., Crespo, A., Astudillo, A., & Quirós, L. M. (2015). Heparan sulfate proteoglycans undergo differential expression alterations in right sided colorectal cancer, depending on their metastatic character. *BMC Cancer*, 15(1), 1-20. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1724-9>
- Fernández-Vega, I., García, O., Crespo, A., Castañón, S., Menéndez, P., Astudillo, A., & Quirós, L. M. (2013). Specific genes involved in synthesis and editing of heparan sulfate proteoglycans show altered expression patterns in breast cancer. *BMC Cancer*, 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-24>
- Fernández-Vega, I., Lorente-Gea, L., Martín, C., & Quirós, L. (2021). Heparan sulfate proteoglycans as possible diagnostic molecular tools with therapeutic potential in Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*, 16(7), 1404-1405. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.301056>
- Fernández-Viadero, C., Rodríguez Rodríguez, E., Combarros Pascual, O., & Crespo Santiago, D. (2013). Genética y enfermedad de Alzheimer: Población en riesgo. En *Revista Espanola de Geriatria y Gerontologia* (Vol. 48, Número 1, pp. 39-44). Ediciones Doyma, S.L.

<https://doi.org/10.1016/j.regg.2012.03.004>

Ferris, L. T., Williams, J. S., & Shen, C. L. (2007). The effect of acute exercise on serum brain-derived neurotrophic factor levels and cognitive function. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 39(4), 728-734. <https://doi.org/10.1249/mss.0b013e31802f04c7>

Filmus, J., Capurro, M., & Rast, J. (2009). Glypicans. *Genome Biology*, 9(5). <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-5-224>

Frades, B., Frank, A., Gangoiti, L., Genua, M. I., González, M. I., & Hueros, A. (2013). *Estado del arte de la enfermedad de Alzheimer en España*. Editorial Pwc. <http://www.serviciodc.com/congreso/congress/pass/communications/bueno1.html>

Fratiglioni, L., Wang, H. X., Ericsson, K., Maytan, M., & Winblad, B. (2000). Influence of social network on occurrence of dementia: A community-based longitudinal study. *Lancet*, 355(9212), 1315-1319. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02113-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02113-9)

Freeman, C., & Parish, C. R. (1998). Human platelet heparanase: Purification, characterization and catalytic activity. *Biochemical Journal*, 330(3), 1341-1350. <https://doi.org/10.1042/bj3301341>

Freeze, H. H., Kinoshita, T., & Varki, A. (2015). Glycans in Acquired Human Diseases. En *Essentials of Glycobiology*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28876835>

Fukutani, Y., Kobayashi, K., Nakamura, I., Watanabe, K., Isaki, K., & Cairns, N. J. (1995). Neurons, intracellular and extracellular neurofibrillary tangles in subdivisions of the hippocampal cortex in normal ageing and Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 200(1), 57-60. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)12083-G](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)12083-G)

Funderburgh, J. L. (2002). Keratan sulfate biosynthesis. En *IUBMB Life* (Vol. 54, Número 4, pp. 187-194). IUBMB Life. <https://doi.org/10.1080/15216540214932>

Funk, K. E., Mirbaha, H., Jiang, H., Holtzman, D. M., & Diamond, M. I. (2015). Distinct therapeutic mechanisms of Tau antibodies: Promoting microglial clearance versus blocking neuronal uptake. *Journal of Biological Chemistry*, 290(35), 21652-21662. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.657924>

Fuster-Matanzo, A., Hernández, F., & Ávila, J. (2018). Tau spreading mechanisms; Implications for dysfunctional tauopathies. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Número 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19030645>

García, B., García-Suárez, O., Fernández-Vega, I., Vallina, A., Astudillo, A., & Quirós, L. M. (2016). Heparanase and heparanase 2 display differently

- deregulation in neuroendocrine tumors, depending on their differentiation grade. *Histology and Histopathology*, 31(1), 73-81. <https://doi.org/10.14670/HH-11-650>
- García, B., Martín, C., García-Suárez, O., Muñiz-Alonso, B., Ordiales, H., Fernández-Menéndez, S., Santos-Juanes, J., Lorente-Gea, L., Castañón, S., Vicente-Etxenausia, I., Piña Batista, K. M., Ruiz-Díaz, I., Caballero-Martínez, M. C., Merayo-Lloves, J., Guerra-Merino, I., Quirós, L. M., & Fernández-Vega, I. (2017). Upregulated Expression of Heparanase and Heparanase 2 in the Brains of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 58(1), 185-192. <https://doi.org/10.3233/JAD-161298>
- Giannakopoulos, P., Herrmann, F. R., Bussière, T., Bouras, C., Kövari, E., Perl, D. P., Morrison, J. H., Gold, G., & Hof, P. R. (2003). Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology*, 60(9), 1495-1500. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000063311.58879.01>
- Gilman, S., Koller, M., Black, R. S., Jenkins, L., Griffith, S. G., Fox, N. C., Eisner, L., Kirby, L., Boada Rovira, M., Forette, F., & Orgogozo, J. M. (2005). Clinical effects of A $\beta$  immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology*, 64(9), 1553-1562. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000159740.16984.3C>
- Glennner, G. G., & Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 120(3), 885-890. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(84\)80190-4](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(84)80190-4)
- Goedert, M. (1993). Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. En *Trends in Neurosciences* (Vol. 16, Número 11, pp. 460-465). Trends Neurosci. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(93\)90078-Z](https://doi.org/10.1016/0166-2236(93)90078-Z)
- Goedert, M., Jakes, R., Spillantini, M. G., Hasegawa, M., Smith, M. J., & Crowther, R. A. (1996). Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature*, 383(6600), 550-553. <https://doi.org/10.1038/383550a0>
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Cairns, N. J., & Crowther, R. A. (1992). Tau proteins of alzheimer paired helical filaments: Abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron*, 8(1), 159-168. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90117-V](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90117-V)
- Gómez-Ramos, A., Díaz-Hernández, M., Cuadros, R., Hernández, F., & Avila, J. (2006). Extracellular tau is toxic to neuronal cells. *FEBS Letters*, 580(20), 4842-4850. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.07.078>
- Gondelaud, F., & Ricard-Blum, S. (2019). Structures and interactions of syndecans. En *FEBS Journal* (Vol. 286, Número 15, pp. 2994-3007). FEBS J. <https://doi.org/10.1111/febs.14828>

- Good, P. F., Alapat, D., Hsu, A., Chu, C., Perl, D., Wen, X., Burstein, D. E., & Kohtz, D. S. (2004). A role for semaphorin 3A signaling in the degeneration of hippocampal neurons during Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 91(3), 716-736. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02766.x>
- Gorno-Tempini, M. L., Hillis, A. E., Weintraub, S., Kertesz, A., Mendez, M., Cappa, S. F., Ogar, J. M., Rohrer, J. D., Black, S., Boeve, B. F., Manes, F., Dronkers, N. F., Vandenberghe, R., Rascovsky, K., Patterson, K., Miller, B. L., Knopman, D. S., Hodges, J. R., Mesulam, M. M., & Grossman, M. (2011). Classification of primary progressive aphasia and its variants. *Neurology*, 76(11), 1006-1014. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31821103e6>
- Gough, S. M., Casella, A., Ortega, K. J., & Hackam, A. S. (2021). Neuroprotection by the Ketogenic Diet: Evidence and Controversies. *Frontiers in nutrition*, 8. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2021.782657>
- Green, R. C., Schneider, L. S., Amato, D. A., Beelen, A. P., Wilcock, G., Swabb, E. A., & Zavitz, K. H. (2009). Effect of tarenflurbil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: A randomized controlled trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 302(23), 2557-2564. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1866>
- Grinberg, L. T., Rüb, U., Ferretti, R. E. L., Nitrini, R., Farfel, J. M., Polichiso, L., Gierga, K., Jacob-Filho, W., & Heinsen, H. (2009). The dorsal raphe nucleus shows phospho-tau neurofibrillary changes before the transentorhinal region in Alzheimer's disease. A precocious onset? *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 35(4), 406-416. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2008.00997.x>
- Groffen, A. J. A., Buskens, C. A. F., Van Kuppevelt, T. H., Veerkamp, J. H., Monnens, L. A. H., & Van Den Heuvel, L. P. W. J. (1998). Primary structure and high expression of human agrin in basement membranes of adult lung and kidney. *European Journal of Biochemistry*, 254(1), 123-128. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2540123.x>
- Grujic, M., Braga, T., Lukinius, A., Eloranta, M. L., Knight, S. D., Pejler, G., & Åbrink, M. (2005). Serglycin-deficient cytotoxic T lymphocytes display defective secretory granule maturation and granzyme B storage. *Journal of Biological Chemistry*, 280(39), 33411-33418. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501708200>
- Gudowska-Sawczuk, M., & Mroczko, B. (2021). The role of neuropilin-1 (Nrp-1) in sars-cov-2 infection: Review. *Journal of Clinical Medicine*, 10(13), 2772. <https://doi.org/10.3390/jcm10132772>
- Guimond, S. E., Rudd, T. R., Skidmore, M. A., Ori, A., Gaudesi, D., Cosentino, C., Guerrini, M., Edge, R., Collison, D., McInnes, E., Torri, G., Turnbull, J. E., Fernig, D. G., & Yates, E. A. (2009). Cations modulate polysaccharide structure to determine FGF-FGFR signaling: A comparison of signaling and

- inhibitory polysaccharide interactions with FGF-1 in solution. *Biochemistry*, 48(22), 4772-4779. <https://doi.org/10.1021/bi802318z>
- Gupta-Bansal, R., Frederickson, R. C. A., & Brunden, K. R. (1995). Proteoglycan-mediated inhibition of A $\beta$  proteolysis. A potential cause of senile plaque accumulation. *Journal of Biological Chemistry*, 270(31), 18666-18671. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.31.18666>
- Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., & Sisodia, S. (2012). Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006270>
- Haass, C., & Selkoe, D. J. (1993). Cellular processing of  $\beta$ -amyloid precursor protein and the genesis of amyloid  $\beta$ -peptide. En *Cell* (Vol. 75, Número 6, pp. 1039-1042). Cell. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90312-E](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90312-E)
- Habuchi, H., Miyake, G., Nogami, K., Kuroiwa, A., Matsuda, Y., Kusche-Gullberg, M., Habuchi, O., Tanaka, M., & Kimata, K. (2003). Biosynthesis of heparan sulphate with diverse structures and functions: Two alternatively spliced forms of human heparan sulphate 6-O-sulphotransferase-2 having different expression patterns and properties. *Biochemical Journal*, 371(1), 131-142. <https://doi.org/10.1042/BJ20021259>
- Halfter, W., Dong, S., Schurer, B., & Cole, G. J. (1998). Collagen XVIII is a basement membrane heparan sulfate proteoglycan. *Journal of Biological Chemistry*, 273(39), 25404-25412. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.39.25404>
- Hammond, C. J., Hallock, L. R., Howanski, R. J., Appelt, D. M., Little, C. S., & Balin, B. J. (2010). Immunohistological detection of Chlamydia pneumoniae in the Alzheimer's disease brain. *BMC Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-11-121>
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054), 184-185. <https://doi.org/10.1126/science.1566067>
- Hardy, J., & Allsop, D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12(C), 383-388. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(91\)90609-V](https://doi.org/10.1016/0165-6147(91)90609-V)
- Hardy, J., Bogdanovic, N., Winblad, B., Portelius, E., Andreassen, N., Cedazo-Minguez, A., & Zetterberg, H. (2014). Pathways to Alzheimer's disease. *Journal of Internal Medicine*, 275(3), 296-303. <https://doi.org/10.1111/joim.12192>
- Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M. L., Pahwa, J. S., Moskvin, V., Dowzell, K., Williams, A., Jones, N., Thomas, C., Stretton, A., Morgan, A. R., Lovestone, S., Powell, J., Proitsi, P., Lupton, M. K., Brayne, C., ... Williams, J. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease.

*Nature Genetics*, 41(10), 1088-1093. <https://doi.org/10.1038/ng.440>

Harris, F. M., Brecht, W. J., Xu, Q., Tesseur, I., Kekonius, L., Wyss-Coray, T., Fish, J. D., Masliah, E., Hopkins, P. C., Searce-Levie, K., Weisgraber, K. H., Mucke, L., Mahley, R. W., & Huang, Y. (2003). Carboxyl-terminal-truncated apolipoprotein E4 causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration and behavioral deficits in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(19), 10966-10971. <https://doi.org/10.1073/pnas.1434398100>

Hassan, N., Greve, B., Espinoza-Sánchez, N. A., & Götte, M. (2021). Cell-surface heparan sulfate proteoglycans as multifunctional integrators of signaling in cancer. En *Cellular Signalling* (Vol. 77). Cell Signal. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109822>

Hauser, P. S., Narayanaswami, V., & Ryan, R. O. (2011). Apolipoprotein E: From lipid transport to neurobiology. En *Progress in Lipid Research* (Vol. 50, Número 1, pp. 62-74). Prog Lipid Res. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.09.001>

Hebert, L. E., Scherr, P. A., Bienias, J. L., Bennett, D. A., & Evans, D. A. (2003). Alzheimer disease in the US population: Prevalence estimates using the 2000 census. *Archives of Neurology*, 60(8), 1119-1122. <https://doi.org/10.1001/archneur.60.8.1119>

Herrero-San Martín, A., Villarejo-Galende, A., Rábano-Gutiérrez, A., Guerrero-Márquez, C., Porta-Etessam, J., & Bermejo-Pareja, F. (2013). [Frontal variant of Alzheimer's disease. Two pathologically confirmed cases and a literature review]. *Revista de neurologia*, 57(12), 542-548. <https://doi.org/10.33588/rn.5712.2013255>

Hess, D. J., Henry-Stanley, M. J., Erlandsen, S. L., & Wells, C. L. (2006). Heparan sulfate proteoglycans mediate Staphylococcus aureus interactions with intestinal epithelium. *Medical Microbiology and Immunology*, 195(3), 133-141. <https://doi.org/10.1007/s00430-005-0007-5>

Hill, J. M., Clement, C., Pogue, A. I., Bhattacharjee, S., Zhao, Y., & Lukiw, W. J. (2014). Pathogenic microbes, the microbiome, and Alzheimer's disease (AD). *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6(JUN). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00127>

Holmes, B. B., DeVos, S. L., Kfoury, N., Li, M., Jacks, R., Yanamandra, K., Ouidja, M. O., Brodsky, F. M., Marasa, J., Bagchi, D. P., Kotzbauer, P. T., Miller, T. M., Papy-Garcia, D., & Diamond, M. I. (2013). Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(33). <https://doi.org/10.1073/pnas.1301440110>

Holmes, B. B., & Diamond, M. I. (2014). Prion-like properties of Tau protein: The importance of extracellular Tau as a therapeutic target. En *Journal of*



- Biological Chemistry* (Vol. 289, Número 29, pp. 19855-19861). American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1074/jbc.R114.549295>
- Honig, L. S., Vellas, B., Woodward, M., Boada, M., Bullock, R., Borrie, M., Hager, K., Andreasen, N., Scarpini, E., Liu-Seifert, H., Case, M., Dean, R. A., Hake, A., Sundell, K., Poole Hoffmann, V., Carlson, C., Khanna, R., Mintun, M., DeMattos, R., ... Siemers, E. (2018). Trial of Solanezumab for Mild Dementia Due to Alzheimer's Disease. *The New England journal of medicine*, 378(4), 321-330. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA1705971>
- Hopf, M., Göhring, W., Kohfeldt, E., Yamada, Y., & Timpl, R. (1999). Recombinant domain IV of perlecan binds to nidogens, laminin-nidogen complex, fibronectin, fibulin-2 and heparin. *European Journal of Biochemistry*, 259(3), 917-926. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00127.x>
- Horssen, Jack, Otte-Höller, I., David, G., Maat-Schieman, M. L., Heuvel, L. P., Wesseling, P., Waal, R. M., & Verbeek, M. M. (2001). Heparan sulfate proteoglycan expression in cerebrovascular amyloid  $\beta$  deposits in Alzheimer's disease and hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch) brains. *Acta Neuropathologica*, 102(6), 604-614. <https://doi.org/10.1007/s004010100414>
- Hu, W., Lin, X., & Chen, K. (2015). Integrated analysis of differential gene expression profiles in hippocampi to identify candidate genes involved in Alzheimer's disease. *Molecular Medicine Reports*, 12(5), 6679-6687. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4271>
- Hudák, A., Jósvay, K., Domonkos, I., Letoha, A., Szilák, L., & Letoha, T. (2021). The interplay of apoE with syndecans in influencing key cellular events of amyloid pathology. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13). <https://doi.org/10.3390/ijms22137070>
- Hulette, C. M., Welsh-Bohmer, K. A., Murray, M. G., Saunders, A. M., Mash, D. C., & McIntyre, L. M. (1998). Neuropathological and neuropsychological changes in «normal» aging: Evidence for preclinical Alzheimer Disease in cognitively normal individuals. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 57(12), 1168-1174. <https://doi.org/10.1097/00005072-199812000-00009>
- Iannuzzi, C., Irace, G., & Sirangelo, I. (2015). The effect of glycosaminoglycans (GAGs) on amyloid aggregation and toxicity. En *Molecules* (Vol. 20, Número 2, pp. 2510-2528). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules20022510>
- Iozzo, R. V. (2001). Series Introduction: Heparan sulfate proteoglycans: intricate molecules with intriguing functions. *Journal of Clinical Investigation*, 108(2), 165-167. <https://doi.org/10.1172/jci13560>
- Iozzo, R. V., & Schaefer, L. (2015). Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. En *Matrix Biology* (Vol. 42,

- pp. 11-55). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.02.003>
- Irvine, K., Laws, K. R., Gale, T. M., & Kondel, T. K. (2012). Greater cognitive deterioration in women than men with Alzheimer's disease: A meta analysis. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, *34*(9), 989-998. <https://doi.org/10.1080/13803395.2012.712676>
- Isacke, C. M., & Yarwood, H. (2002). The hyaluronan receptor, CD44. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *34*(7), 718-721. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(01\)00166-2](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(01)00166-2)
- Jacobs, H. I. L., Hopkins, D. A., Mayrhofer, H. C., Bruner, E., Van Leeuwen, F. W., Raaijmakers, W., & Schmahmann, J. D. (2018). The cerebellum in Alzheimer's disease: Evaluating its role in cognitive decline. *Brain*, *141*(1), 37-47. <https://doi.org/10.1093/brain/awx194>
- Janssen, J. C., Beck, J. A., Campbell, T. A., Dickinson, A., Fox, N. C., Harvey, R. J., Houlden, H., Rossor, M. N., & Collinge, J. (2003). Early onset familial Alzheimer's disease: Mutation frequency in 31 families. *Neurology*, *60*(2), 235-239. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000042088.22694.E3>
- Jarrett, J. T., Berger, E. P., & Lansbury, P. T. (1993). The Carboxy Terminus of the  $\beta$  Amyloid Protein Is Critical for the Seeding of Amyloid Formation: Implications for the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Biochemistry*, *32*(18), 4693-4697. <https://doi.org/10.1021/bi00069a001>
- Jendresen, C. B., Cui, H., Zhang, X., Vlodaysky, I., Nilsson, L. N. G., & Li, J. P. (2015). Overexpression of heparanase lowers the amyloid burden in amyloid- $\beta$  precursor Protein Transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(8), 5053-5064. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.600569>
- Jost, B. C., & Grossberg, G. T. (1995). The Natural History of Alzheimer's Disease: A Brain Bank Study. *Journal of the American Geriatrics Society*, *43*(11), 1248-1255. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1995.tb07401.x>
- Kanekiyo, T., Xu, H., & Bu, G. (2014). ApoE and A $\beta$  in Alzheimer's disease: Accidental encounters or partners? En *Neuron* (Vol. 81, Número 4, pp. 740-754). Neuron. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.01.045>
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., & Müller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, *325*(6106), 733-736. <https://doi.org/10.1038/325733a0>
- Karran, E. (2012). Current status of vaccination therapies in Alzheimer's disease. En *Journal of neurochemistry* (Vol. 123, Número 5, pp. 647-651). J Neurochem. <https://doi.org/10.1111/jnc.12009>
- Karran, E., & De Strooper, B. (2016). The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *Journal of Neurochemistry*, *139*, 237-252.

<https://doi.org/10.1111/jnc.13632>

- Kaur, S. P., & Cummings, B. S. (2019). Role of glypicans in regulation of the tumor microenvironment and cancer progression. En *Biochemical Pharmacology* (Vol. 168, pp. 108-118). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.06.020>
- Kelly, S. C., He, B., Perez, S. E., Ginsberg, S. D., Mufson, E. J., & Counts, S. E. (2017). Locus coeruleus cellular and molecular pathology during the progression of Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica communications*, 5(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0411-2>
- Kempuraj, D., Thangavel, R., Selvakumar, G. P., Zaheer, S., Ahmed, M. E., Raikwar, S. P., Zahoor, H., Saeed, D., Natteru, P. A., Iyer, S., & Zaheer, A. (2017). Brain and peripheral atypical inflammatory mediators potentiate neuroinflammation and neurodegeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00216>
- Kidd, M. (1963). Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's Disease. *Nature*, 197(4863), 192-193. <https://doi.org/10.1038/197192b0>
- Kimura, H., Tooyama, I., & Mcgeer, P. L. (1994). Acidic FGF Expression in the Surroundings of Senile Plaques. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 174(3), 279-293. <https://doi.org/10.1620/tjem.174.279>
- Kirk-Sanchez, N. J., & McGough, E. L. (2013). Physical exercise and cognitive performance in the elderly: Current perspectives. *Clinical Interventions in Aging*, 9, 51-62. <https://doi.org/10.2147/CIA.S39506>
- Kitsukawa, T., Shimono, A., Kawakami, A., Kondoh, H., & Fujisawa, H. (1995). Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Development (Cambridge, England)*, 121(12), 4309-4318.
- Knopman, D. S. (2020). The Enigma of Decreasing Dementia Incidence. En *JAMA network open* (Vol. 3, Número 7, p. e2011199). JAMA Netw Open. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.11199>
- Kolset, S. O., & Pejler, G. (2011). Serglycin: A Structural and Functional Chameleon with Wide Impact on Immune Cells. *The Journal of Immunology*, 187(10), 4927-4933. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100806>
- Konno, T., Oiki, S., Hasegawa, K., & Naiki, H. (2004). Anionic contribution for fibrous maturation of protofibrillar assemblies of the human tau repeat domain in a fluoroalcohol solution. *Biochemistry*, 43(42), 13613-13620. <https://doi.org/10.1021/bi048549o>
- Kreuger, J., & Kjellén, L. (2012). Heparan Sulfate Biosynthesis: Regulation and Variability. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 60(12), 898-907. <https://doi.org/10.1369/0022155412464972>

- Kreuger, J., Matsumoto, T., Vanwildemeersch, M., Sasaki, T., Timpl, R., Claesson-Welsh, L., Spillmann, D., & Lindahl, U. (2002). Role of heparan sulfate domain organization in endostatin inhibition of endothelial cell function. *EMBO Journal*, 21(23), 6303-6311. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf638>
- Kreuger, J., Spillmann, D., Li, J. P., & Lindahl, U. (2006). Interactions between heparan sulfate and proteins: The concept of specificity. En *Journal of Cell Biology* (Vol. 174, Número 3, pp. 323-327). J Cell Biol. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604035>
- Kumar, D. K. V., Choi, H. S., Washicosky, K. J., Eimer, W. A., Tucker, S., Ghofrani, J., Lefkowitz, A., McColl, G., Goldstein, L. E., Tanzi, R. E., & Moir, R. D. (2016). Amyloid- $\beta$  peptide protects against microbial infection in mouse and worm models of Alzheimer's disease. *Science Translational Medicine*, 8(340). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf1059>
- Kurosawa, N., Chen, G. Y., Kadomatsu, K., Ikematsu, S., Sakuma, S., & Muramatsu, T. (2001). Glypican-2 binds to midkine: The role of glypican-2 in neuronal cell adhesion and neurite outgrowth. *Glycoconjugate Journal*, 18(6), 499-507. <https://doi.org/10.1023/A:1016042303253>
- LaFerla, F. M., Green, K. N., & Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid- $\beta$  in Alzheimer's disease. En *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 8, Número 7, pp. 499-509). Nat Rev Neurosci. <https://doi.org/10.1038/nrn2168>
- Lakshmanachetty, S., & Koster, M. I. (2016). Emerging roles for collagen XV and XVIII in cancer progression. *Experimental Dermatology*, 25(5), 346-347. <https://doi.org/10.1111/exd.12960>
- Lamanna, W. C., Kalus, I., Padva, M., Baldwin, R. J., Merry, C. L. R., & Dierks, T. (2007). The heparanome-The enigma of encoding and decoding heparan sulfate sulfation. *Journal of Biotechnology*, 129(2), 290-307. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.01.022>
- Lambert, J. C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Zelenika, D., Bullido, M. J., Tavernier, B., Letenneur, L., Bettens, K., Berr, C., Pasquier, F., Fiévet, N., Barberger-Gateau, P., Engelborghs, S., De Deyn, P., Mateo, I., ... Amouyel, P. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 41(10), 1094-1099. <https://doi.org/10.1038/ng.439>
- Lander, A. D., & Selleck, S. B. (2000). The elusive functions of proteoglycans: In vivo veritas. En *Journal of Cell Biology* (Vol. 148, Número 2, pp. 227-232). J Cell Biol. <https://doi.org/10.1083/jcb.148.2.227>
- Law, L. L., Rol, R. N., Schultz, S. A., Dougherty, R. J., Edwards, D. F., Kosciak, R. L., Gallagher, C. L., Carlsson, C. M., Bendlin, B. B., Zetterberg, H., Blennow, K., Asthana, S., Sager, M. A., Hermann, B. P., Johnson, S. C., Cook, D. B., & Okonkwo, O. C. (2018). Moderate intensity physical activity

- associates with CSF biomarkers in a cohort at risk for Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia: Diagnosis, Assessment and Disease Monitoring*, 10, 188-195. <https://doi.org/10.1016/j.dadm.2018.01.001>
- Lepelletier, F. X., Mann, D. M. A., Robinson, A. C., Pinteaux, E., & Boutin, H. (2017). Early changes in extracellular matrix in Alzheimer's disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 43(2), 167-182. <https://doi.org/10.1111/nan.12295>
- Letoha, T., Hudák, A., Kusz, E., Pettkó-Szandtner, A., Domonkos, I., Jós vay, K., Hofmann-Apitius, M., & Szilák, L. (2019). Contribution of syndecans to cellular internalization and fibrillation of amyloid- $\beta$ (1-42). *Scientific reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-018-37476-9>
- Leveugle, B., Scanameo, A., Ding, W., & Fillit, H. (1994). Binding of heparan sulfate glycosaminoglycan to beta-amyloid peptide: inhibition by potentially therapeutic polysulfated compounds. *Neuroreport*, 5(11), 1389-1392.
- Levy-Adam, F., Feld, S., Cohen-Kaplan, V., Shteingauz, A., Gross, M., Arvatz, G., Naroditsky, I., Ilan, N., Doweck, I., & Vlodaysky, I. (2010). Heparanase 2 interacts with heparan sulfate with high affinity and inhibits heparanase activity. *Journal of Biological Chemistry*, 285(36), 28010-28019. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.116384>
- Li, J. P., Escobar Galvis, M. L., Gong, F., Zhang, X., Zcharia, E., Metzger, S., Vlodaysky, I., Kisilevsky, R., & Lindahl, U. (2005). In vivo fragmentation of heparan sulfate by heparanase overexpression renders mice resistant to amyloid protein a amyloidosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(18), 6473-6477. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502287102>
- Li, J. P., & Zhang, X. (2020). Implications of Heparan Sulfate and Heparanase in Amyloid Diseases. En *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1221, pp. 631-645). Adv Exp Med Biol. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-34521-1\\_25](https://doi.org/10.1007/978-3-030-34521-1_25)
- Lidsky, T. I., & Schneider, J. S. (2003). Lead neurotoxicity in children: Basic mechanisms and clinical correlates. En *Brain* (Vol. 126, Número 1, pp. 5-19). Brain. <https://doi.org/10.1093/brain/awg014>
- Limorenko, G., & Lashuel, H. A. (2021). Revisiting the grammar of Tau aggregation and pathology formation: how new insights from brain pathology are shaping how we study and target Tauopathies. *Chemical Society reviews*. <https://doi.org/10.1039/D1CS00127B>
- Lindahl, U., Couchman, J., Kimata, K., & Esko, J. D. (2015). Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. En *Essentials of Glycobiology*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28876828>
- Liu, X., McFarland, D. C., Nestor, K. E., & Velleman, S. G. (2004).

- Developmental regulated expression of syndecan-1 and glypican in pectoralis major muscle in turkeys with different growth rates. *Development Growth and Differentiation*, 46(1), 37-51. <https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2004.00728.x>
- Livingston, G., Huntley, J., Sommerlad, A., Ames, D., Ballard, C., Banerjee, S., Brayne, C., Burns, A., Cohen-Mansfield, J., Cooper, C., Costafreda, S. G., Dias, A., Fox, N., Gitlin, L. N., Howard, R., Kales, H. C., Kivimäki, M., Larson, E. B., Ogunniyi, A., ... Mukadam, N. (2020). Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. En *The Lancet* (Vol. 396, Número 10248, pp. 413-446). Lancet. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30367-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30367-6)
- Livingston, G., Sommerlad, A., Orgeta, V., Costafreda, S. G., Huntley, J., Ames, D., Ballard, C., Banerjee, S., Burns, A., Cohen-Mansfield, J., Cooper, C., Fox, N., Gitlin, L. N., Howard, R., Kales, H. C., Larson, E. B., Ritchie, K., Rockwood, K., Sampson, E. L., ... Mukadam, N. (2017). Dementia prevention, intervention, and care. En *The Lancet* (Vol. 390, Número 10113, pp. 2673-2734). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31363-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31363-6)
- Lorente-Gea, L., García, B., Martín, C., Quirós, L. M., & Fernández-Vega, I. (2017). Heparan sulfate proteoglycans and heparanases in Alzheimer's disease: Current outlook and potential therapeutic targets. En *Neural Regeneration Research* (Vol. 12, Número 6, pp. 914-915). Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.208571>
- Lurain, N. S., Hanson, B. A., Martinson, J., Leurgans, S. E., Landay, A. L., Bennett, D. A., & Schneider, J. A. (2013). Virological and immunological characteristics of human cytomegalovirus infection associated with Alzheimer disease. *Journal of Infectious Diseases*, 208(4), 564-572. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit210>
- Mahley, R. W., & Huang, Y. (2012). Apolipoprotein E Sets the Stage: Response to Injury Triggers Neuropathology. En *Neuron* (Vol. 76, Número 5, pp. 871-885). Neuron. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.11.020>
- Maïza, A., Chantepie, S., Vera, C., Fifre, A., Huynh, M. B., Stettler, O., Ouidja, M. O., & Papy-Garcia, D. (2018). The role of heparan sulfates in protein aggregation and their potential impact on neurodegeneration. En *FEBS Letters* (Vol. 592, Número 23, pp. 3806-3818). Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13082>
- Malavaki, C., Mizumoto, S., Karamanos, N., & Sugahara, K. (2008). Recent advances in the structural study of functional chondroitin sulfate and dermatan sulfate in health and disease. En *Connective Tissue Research* (Vol. 49, Números 3-4, pp. 133-139). Connect Tissue Res. <https://doi.org/10.1080/03008200802148546>
- Mangialasche, F., Solomon, A., Winblad, B., Mecocci, P., & Kivipelto, M. (2010). Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. En *The Lancet*

- Neurology* (Vol. 9, Número 7, pp. 702-716). *Lancet Neurol.*  
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70119-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70119-8)
- Martin, C., Lozano-Iturbe, V., Girón, R. M., Vazquez-Espinosa, E., Rodriguez, D., Merayo-Lloves, J., Vazquez, F., Quirós, L. M., & García, B. (2019). Glycosaminoglycans are differentially involved in bacterial binding to healthy and cystic fibrosis lung cells. *Journal of Cystic Fibrosis*, 18(3), e19-e25. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2018.10.017>
- Martin, J. J., Gheuens, J., Bruyland, M., Cras, P., Vandenberghe, A., Masters, C. L., Beyreuther, K., Dom, R., Ceuterick, C., Lübke, U., Van Heuverswijn, H., De Winter, G., & Van Broeckhoven, C. (1991). Early-onset *alzheimer's* disease in 2 large belgian families. *Neurology*, 41(1), 62-68. <https://doi.org/10.1212/wnl.41.1.62>
- Mawuenyega, K. G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J. C., Yarasheski, K. E., & Bateman, R. J. (2010). Decreased clearance of CNS  $\beta$ -amyloid in Alzheimer's disease. *Science*, 330(6012), 1774. <https://doi.org/10.1126/science.1197623>
- McCartney, M. (2015). Margaret McCartney: The «breakthrough» drug that's not been shown to help in Alzheimer's disease. *BMJ (Clinical research ed.)*, 351, h4064. <https://doi.org/10.1136/bmj.h4064>
- McGeer, P. L., Guo, J. P., Lee, M., Kennedy, K., & McGeer, E. G. (2018). Alzheimer's Disease Can Be Spared by Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. En *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 62, Número 3, pp. 1219-1222). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JAD-170706>
- McKenzie, E. A. (2007). Heparanase: A target for drug discovery in cancer and inflammation. En *British Journal of Pharmacology* (Vol. 151, Número 1, pp. 1-14). *Br J Pharmacol.* <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707182>
- Melrose, J. (2020). Perlecan, a modular instructive proteoglycan with diverse functional properties. En *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 128). *Int J Biochem Cell Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105849>
- Melrose, J., Roughley, P., Knox, S., Smith, S., Lord, M., & Whitelock, J. (2006). The structure, location, and function of perlecan, a prominent pericellular proteoglycan of fetal, postnatal, and mature hyaline cartilages. *Journal of Biological Chemistry*, 281(48), 36905-36914. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608462200>
- Mendoza, V., Vilchis-Landeros, M. M., Mendoza-Hernández, G., Huang, T., Villarreal, M. M., Hinck, A. P., López-Casillas, F., & Montiel, J. L. (2009). Betaglycan has two independent domains required for high affinity TGF- $\beta$  binding: Proteolytic cleavage separates the domains and inactivates the neutralizing activity of the soluble receptor. *Biochemistry*, 48(49), 11755-11765. <https://doi.org/10.1021/bi901528w>



- Mikami, T., & Kitagawa, H. (2013). Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. En *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1830, Número 10, pp. 4719-4733). Biochim Biophys Acta. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.06.006>
- Miklossy, J. (2011). Emerging roles of pathogens in Alzheimer disease. En *Expert reviews in molecular medicine* (Vol. 13). Expert Rev Mol Med. <https://doi.org/10.1017/s1462399411002006>
- Mintun, M. A., Wessels, A. M., & Sims, J. R. (2021). Donanemab in Early Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, 385(7), 666-667. <https://doi.org/10.1056/nejmc2109455>
- Moretti, M., Sinnappah-Kang, N. D., Toller, M., Curcio, F., & Marchetti, D. (2006). HPSE-1 expression and functionality in differentiating neural cells. *Journal of Neuroscience Research*, 83(4), 694-701. <https://doi.org/10.1002/jnr.20753>
- Morimoto-Tomita, M., Uchimura, K., Werb, Z., Hemmerich, S., & Rosen, S. D. (2002). Cloning and characterization of two extracellular heparin-degrading endosulfatases in mice and humans. *Journal of Biological Chemistry*, 277(51), 49175-49185. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205131200>
- Morsch, R., Simon, W., & Coleman, P. D. (1999). Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 58(2), 188-197. <https://doi.org/10.1097/00005072-199902000-00008>
- Motamedi-Shad, N., Monsellier, E., Torrasa, S., Relini, A., & Chiti, F. (2009). Kinetic analysis of amyloid formation in the presence of heparan sulfate. Faster unfolding and change of pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 284(43), 29921-29934. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.018747>
- Mucke, L., & Selkoe, D. J. (2012). Neurotoxicity of amyloid  $\beta$ -protein: Synaptic and network dysfunction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006338>
- Mufson, E. J., Malek-Ahmadi, M., Snyder, N., Ausdemore, J., Chen, K., & Perez, S. E. (2016). Braak stage and trajectory of cognitive decline in noncognitively impaired elders. *Neurobiology of Aging*, 43, 101-110. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.03.003>
- Mukadam, N., Sommerlad, A., Huntley, J., & Livingston, G. (2019). Population attributable fractions for risk factors for dementia in low-income and middle-income countries: an analysis using cross-sectional survey data. *The Lancet Global Health*, 7(5), e596-e603. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30074-9](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30074-9)
- Müller, U., Winter, P., & Graeber, M. B. (2013). A presenilin 1 mutation in the first case of Alzheimer's disease. En *The Lancet Neurology* (Vol. 12, Número 2, pp. 129-130). Lancet Neurol. [---

108](https://doi.org/10.1016/S1474-</a></p></div><div data-bbox=)



4422(12)70307-1

- Mulloy, B., & Forster, M. J. (2000). Conformation and dynamics of heparin and heparan sulfate. *Glycobiology*, 10(11), 1147-1156. <https://doi.org/10.1093/glycob/10.11.1147>
- Munoz, D. G., Wang, D., & Greenberg, B. D. (1993). Hirano bodies accumulate C-terminal sequences of beta-amyloid precursor protein (beta-APP) epitopes. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 52(1), 14-21. <https://doi.org/10.1097/00005072-199301000-00003>
- Nagarajan, A., Malvi, P., & Wajapeyee, N. (2018). Heparan sulfate and Heparan Sulfate Proteoglycans in cancer initiation and progression. En *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 9, Número AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00483>
- Nakato, H., & Kimata, K. (2002). Heparan sulfate fine structure and specificity of proteoglycan functions. En *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1573, Número 3, pp. 312-318). Biochim Biophys Acta. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00398-7](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00398-7)
- Nasser, N. J., Avivi, A., Shushy, M., Vlodaysky, I., & Nevo, E. (2007). Cloning, expression, and characterization of an alternatively spliced variant of human heparanase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354(1), 33-38. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.189>
- Nicole, S., Chaouch, A., Torbergsen, T., Bauché, S., De Bruyckere, E., Fontenille, M. J., Horn, M. A., Van Ghelue, M., Løseth, S., Issop, Y., Cox, D., Müller, J. S., Evangelista, T., Stålberg, E., Ioos, C., Barois, A., Brochier, G., Sternberg, D., Fournier, E., ... Lochmüller, H. (2014). Agrin mutations lead to a congenital myasthenic syndrome with distal muscle weakness and atrophy. *Brain*, 137(9), 2429-2443. <https://doi.org/10.1093/brain/awu160>
- Nicoll, J. A. R., Barton, E., Boche, D., Neal, J. W., Ferrer, I., Thompson, P., Vlachouli, C., Wilkinson, D., Bayer, A., Games, D., Seubert, P., Schenk, D., & Holmes, C. (2006). A $\beta$  species removal after A $\beta$ 42 immunization. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 65(11), 1040-1048. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000240466.10758.ce>
- Niu, H., Álvarez-Álvarez, I., Guillén-Grima, F., & Aguinaga-Ontoso, I. (2017). Prevalencia e incidencia de la enfermedad de Alzheimer en Europa: metaanálisis. *Neurología*, 32(8), 523-532. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2016.02.016>
- O'Callaghan, P., Sandwall, E., Li, J. P., Yu, H., Ravid, R., Guan, Z. Z., Van Kuppevelt, T. H., Nilsson, L. N. G., Ingelsson, M., Hyman, B. T., Kalimo, H., Lindahl, U., Lannfelt, L., & Zhang, X. (2008). Heparan sulfate accumulation with A $\beta$  deposits in Alzheimer's disease and Tg2576 mice is contributed by glial cells. *Brain Pathology*, 18(4), 548-561. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2008.00152.x>

- Okada, Y., Yamada, S., Toyoshima, M., Dong, J., Nakajima, M., & Sugahara, K. (2002). Structural recognition by recombinant human heparanase that plays critical roles in tumor metastasis: Hierarchical sulfate groups with differential effects and the essential target disulfated trisaccharide sequence. *Journal of Biological Chemistry*, 277(45), 42488-42495. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206510200>
- Ori, A., Wilkinson, M. C., & Fernig, D. G. (2008). The heparanome and regulation of cell function: Structures, functions and challenges. En *Frontiers in Bioscience* (Vol. 13, Número 11, pp. 4309-4338). Front Biosci. <https://doi.org/10.2741/3007>
- Parker, M. W., Guo, H. F., Li, X., Linkugel, A. D., & Vander Kooi, C. W. (2012). Function of members of the neuropilin family as essential pleiotropic cell surface receptors. *Biochemistry*, 51(47), 9437-9446. <https://doi.org/10.1021/bi3012143>
- Patel, V. N., Pineda, D. L., & Hoffman, M. P. (2017). The function of heparan sulfate during branching morphogenesis. En *Matrix Biology* (Vols. 57-58, pp. 311-323). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.09.004>
- Pellegrini, M., Pilia, G., Pantano, S., Lucchini, F., Uda, M., Fumi, M., Cao, A., Schlessinger, D., & Forabosco, A. (1998). Gpc3 expression correlates with the phenotype of the Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 213(4), 431-439. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199812\)213:4<431::AID-AJA8>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199812)213:4<431::AID-AJA8>3.0.CO;2-7)
- Pérez-Tur, J. (2000). [Genetics and Alzheimer's disease]. *Revista de neurologia*, 30(2), 161-169.
- Pérez, M., Valpuesta, J. M., Medina, M., Montejo De Garcini, E., & Avila, J. (1996). Polymerization of  $\tau$  into filaments in the presence of heparin: The minimal sequence required for  $\tau$ - $\tau$  interaction. *Journal of Neurochemistry*, 67(3), 1183-1190. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67031183.x>
- Perry, G., Siedlak, S. L., Richey, P., Kawai, M., Cras, P., Kalaria, R. N., Galloway, P. G., Scardina, J. M., Cordell, B., Greenberg, B. D., Ledbetter, S. R., & Gambetti, P. (1991). Association of heparan sulfate proteoglycan with the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 11(11), 3679-3683. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.11-11-03679.1991>
- Peterson, S., & Liu, J. (2012). Deciphering mode of action of heparanase using structurally defined oligosaccharides. *Journal of Biological Chemistry*, 287(41), 34836-34843. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.390161>
- Petitti, D. B., Crooks, V. C., Buckwalter, J. G., & Chiu, V. (2005). Blood pressure levels before dementia. *Archives of Neurology*, 62(1), 112-116. <https://doi.org/10.1001/archneur.62.1.112>
- Pinner, E., Gruper, Y., Ben Zimra, M., Kristt, D., Laudon, M., Naor, D., & Zisapel,

- N. (2017). CD44 Splice Variants as Potential Players in Alzheimer's Disease Pathology. *Journal of Alzheimer's Disease*, 58(4), 1137-1149. <https://doi.org/10.3233/JAD-161245>
- Pollheimer, J., Bauer, S., Huber, A., Husslein, P., Aplin, J. D., & Knöfler, M. (2004). Expression pattern of collagen XVIII and its cleavage product, the angiogenesis inhibitor endostatin, at the fetal-maternal interface. *Placenta*, 25(10), 770-779. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.03.003>
- Pomin, V. H. (2015). Keratan sulfate: An up-to-date review. En *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 72, pp. 282-289). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.08.029>
- Pooja Naik, L. C. (2014). Diabetes Mellitus and Blood-Brain Barrier Dysfunction: An Overview. *Journal of Pharmacovigilance*, 02(02). <https://doi.org/10.4172/2329-6887.1000125>
- Prandota, J. (2014). Possible link between toxoplasma gondii and the anosmia associated with neurodegenerative diseases. *American Journal of Alzheimer's Disease and other Dementias*, 29(3), 205-214. <https://doi.org/10.1177/1533317513517049>
- Price, J. L., & Morris, J. C. (2004). So what if tangles precede plaques? En *Neurobiology of Aging* (Vol. 25, Número 6, pp. 721-723). Neurobiol Aging. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2003.12.017>
- Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretschmar, H. A., & Herms, J. (2006). Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(27), 7212-7221. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1450-06.2006>
- Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., & Ferri, C. P. (2013). The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. En *Alzheimer's and Dementia* (Vol. 9, Número 1, pp. 63-75.e2). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.11.007>
- Prusiner, S. B. (2013). Biology and genetics of prions causing neurodegeneration. En *Annual Review of Genetics* (Vol. 47, pp. 601-623). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155524>
- Quan, X., Liang, H., Chen, Y., Qin, Q., Wei, Y., & Liang, Z. (2020). Related Network and Differential Expression Analyses Identify Nuclear Genes and Pathways in the Hippocampus of Alzheimer Disease. *Medical Science Monitor*, 26. <https://doi.org/10.12659/MSM.919311>
- Reiland, J., Kempf, D., Roy, M., Denkins, Y., & Marchetti, D. (2006). FGF2 binding, signaling, and angiogenesis are modulated by heparanase in metastatic melanoma cells. *Neoplasia*, 8(7), 596-606. <https://doi.org/10.1593/neo.06244>

- Reilly, C. E. (2000). Crucial role of heparan sulfate proteoglycan (agrin) in beta-amyloid formation in Alzheimer's disease. *Journal of neurology*, 247(8), 663-664. <https://doi.org/10.1007/s004150070144>
- Rensink, A. A. M., De Waal, R. M. W., Kremer, B., & Verbeek, M. M. (2003). Pathogenesis of cerebral amyloid angiopathy. En *Brain Research Reviews* (Vol. 43, Número 2, pp. 207-223). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2003.08.001>
- Ricard-Blum, S., & Lisacek, F. (2017). Glycosaminoglycanomics: where we are. *Glycoconjugate Journal*, 34(3), 339-349. <https://doi.org/10.1007/s10719-016-9747-2>
- Rivara, S., Milazzo, F. M., & Giannini, G. (2016). Heparanase: A rainbow pharmacological target associated to multiple pathologies including rare diseases. En *Future Medicinal Chemistry* (Vol. 8, Número 6, pp. 647-680). Future Science. <https://doi.org/10.4155/fmc-2016-0012>
- Rogaev, E. I., Sherrington, R., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Liang, Y., Chi, H., Lin, C., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Sorbi, S., Nacmias, B., Piacentini, S., Amaducci, L., Chumakov, I., Cohen, D., Lannfelt, L., Fraser, P. E., ... George-Hyslop, P. H. S. (1995). Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature*, 376(6543), 775-778. <https://doi.org/10.1038/376775a0>
- Rolland, Y., Abellan van Kan, G., & Vellas, B. (2008). Physical Activity and Alzheimer's Disease: From Prevention to Therapeutic Perspectives. En *Journal of the American Medical Directors Association* (Vol. 9, Número 6, pp. 390-405). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2008.02.007>
- Saint-Aubert, L., Lemoine, L., Chiotis, K., Leuzy, A., Rodriguez-Vieitez, E., & Nordberg, A. (2017). Tau PET imaging: present and future directions. En *Molecular Neurodegeneration* (Vol. 12, Número 1). Mol Neurodegener. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0162-3>
- Saito, T., Suemoto, T., Brouwers, N., Slegers, K., Funamoto, S., Mihira, N., Matsuba, Y., Yamada, K., Nilsson, P., Takano, J., Nishimura, M., Iwata, N., Van Broeckhoven, C., Ihara, Y., & Saido, T. C. (2011). Potent amyloidogenicity and pathogenicity of A $\beta$  243. *Nature Neuroscience*, 14(8), 1023-1032. <https://doi.org/10.1038/nn.2858>
- Sarrazin, S., Lamanna, W. C., & Esko, J. D. (2011). Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(7), 1-33. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004952>
- Savva, G. M., Wharton, S. B., Ince, P. G., Forster, G., Matthews, F. E., & Brayne, C. (2009). Age, Neuropathology, and Dementia. *New England Journal of Medicine*, 360(22), 2302-2309. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0806142>
- Sawesi, O., Spillmann, D., Lundén, A., Wernersson, S., & Åbrink, M. (2010).

- Serglycin-independent release of active mast cell proteases in response to *Toxoplasma gondii* infection. *Journal of Biological Chemistry*, 285(49), 38005-38013. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.118471>
- Schaefer, L., & Schaefer, R. M. (2010). Proteoglycans: From structural compounds to signaling molecules. En *Cell and Tissue Research* (Vol. 339, Número 1, pp. 237-246). *Cell Tissue Res.* <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0821-y>
- Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M. M. B., de Strooper, B., Frisoni, G. B., Salloway, S., & Van der Flier, W. M. (2016). Alzheimer's disease. *Lancet*, 388(10043), 505-517. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(15\)01124-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(15)01124-1)
- Scheltens, P., De Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C. E., Cummings, J., & van der Flier, W. M. (2021). Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)*, 397(10284), 1577-1590. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32205-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32205-4)
- Schneider, L. S., Mangialasche, F., Andreasen, N., Feldman, H., Giacobini, E., Jones, R., Mantua, V., Mecocci, P., Pani, L., Winblad, B., & Kivipelto, M. (2014). Clinical trials and late-stage drug development for Alzheimer's disease: An appraisal from 1984 to 2014. *Journal of Internal Medicine*, 275(3), 251-283. <https://doi.org/10.1111/joim.12191>
- Selkoe, D. J. (1994). Alzheimer's disease: a central role for amyloid. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 53(5), 438-447. <https://doi.org/10.1097/00005072-199409000-00003>
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: Genes, proteins, and therapy. En *Physiological Reviews* (Vol. 81, Número 2, pp. 741-766). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.741>
- Sepulveda-Diaz, J. E., Alavi Naini, S. M., Huynh, M. B., Ouidja, M. O., Yanicostas, C., Chantepie, S., Villares, J., Lamari, F., Jospin, E., Van Kuppevelt, T. H., Mensah-Nyagan, A. G., Raisman-Vozari, R., Soussi-Yanicostas, N., & Papy-Garcia, D. (2015). HS3ST2 expression is critical for the abnormal phosphorylation of tau in Alzheimer's disease-related tau pathology. *Brain*, 138(5), 1339-1354. <https://doi.org/10.1093/brain/awv056>
- Serenó, L., Coma, M., Rodríguez, M., Sánchez-Ferrer, P., Sánchez, M. B., Gich, I., Agulló, J. M., Pérez, M., Avila, J., Guardia-Laguarta, C., Clarimón, J., Lleó, A., & Gómez-Isla, T. (2009). A novel GSK-3 $\beta$  inhibitor reduces Alzheimer's pathology and rescues neuronal loss in vivo. *Neurobiology of Disease*, 35(3), 359-367. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.05.025>
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., & Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006189>

- Shaffer, L. M., Dority, M. D., Gupta-Bansal, R., Frederickson, R. C. A., Younkin, S. G., & Brunden, K. R. (1995). Amyloid  $\beta$  protein (A $\beta$ ) removal by neuroglial cells in culture. *Neurobiology of Aging*, 16(5), 737-745. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(95\)00055-J](https://doi.org/10.1016/0197-4580(95)00055-J)
- Shen, L., & Ji, H. F. (2015). Vitamin D deficiency is associated with increased risk of Alzheimer's disease and dementia: Evidence from meta-analysis. *Nutrition Journal*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12937-015-0063-7>
- Shimizu, H., Ghazizadeh, M., Sato, S., Oguro, T., & Kawanami, O. (2009). Interaction between  $\beta$ -amyloid protein and heparan sulfate proteoglycans from the cerebral capillary basement membrane in Alzheimer's disease. *Journal of Clinical Neuroscience*, 16(2), 277-282. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2008.04.009>
- Shin, R. W., Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. (1994). Aluminum modifies the properties of Alzheimer's disease PHF $\tau$  proteins in vivo and in vitro. *Journal of Neuroscience*, 14(11 II), 7221-7233. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.14-11-07221.1994>
- Simic, G., Stanic, G., Mladinov, M., Jovanov-Milosevic, N., Kostovic, I., & Hof, P. R. (2009). Does Alzheimer's disease begin in the brainstem?: Annotation. En *Neuropathology and Applied Neurobiology* (Vol. 35, Número 6, pp. 532-554). *Neuropathol Appl Neurobiol*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2009.01038.x>
- Slachevsky & Oyarzo. (2008). Las demencias: historia, clasificación y aproximación clínica. *Tratado de Neuropsicología Clínica*.
- Small, D. H. (2008). Network dysfunction in Alzheimer's disease: does synaptic scaling drive disease progression? *Trends in Molecular Medicine*, 14(3), 103-108. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.12.006>
- Smith, M. M., & Melrose, J. (2015). Proteoglycans in Normal and Healing Skin. *Advances in Wound Care*, 4(3), 152-173. <https://doi.org/10.1089/wound.2013.0464>
- Snow, A. D., Kinsella, M. G., Parks, E., Sekiguchi, R. T., Miller, J. D., Kimata, K., & Wight, T. N. (1995). Differential Binding of Vascular Cell-Derived Proteoglycans (Perlecan, Biglycan, Decorin, and Versican) to the Beta-Amyloid Protein of Alzheimer's Disease. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 320(1), 84-95. <https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1345>
- Snow, A D, Mar, H., Nochlin, D., Kimata, K., Kato, M., Suzuki, S., Hassell, J., & Wight, T. N. (1988). The presence of heparan sulfate proteoglycans in the neuritic plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer's disease. *The American Journal of Pathology*, 133(3), 456-463.
- Snow, Alan D., Nochlin, D., Sekiguchi, R., & Carlson, S. S. (1996). Identification and immunolocalization of a new class of proteoglycan (Keratan sulfate) to the neuritic plaques of Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*,

- 138(2), 305-317. <https://doi.org/10.1006/exnr.1996.0069>
- Snow, Alan David, Cummings, J. A., & Lake, T. (2021). The Unifying Hypothesis of Alzheimer's Disease: Heparan Sulfate Proteoglycans/Glycosaminoglycans Are Key as First Hypothesized Over 30 Years Ago. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.710683>
- Snow, Alan David, Sekiguchi, R., Nochlin, D., Fraser, P., Kimata, K., Mizutani, A., Arai, M., Schreier, W. A., & Morgan, D. G. (1994). An important role of heparan sulfate proteoglycan (perlecan) in a model system for the deposition and persistence of fibrillar  $\alpha$ -amyloid in rat brain. *Neuron*, 12(1), 219-234. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90165-1](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90165-1)
- Snow, Alan David, Sekiguchi, R. T., Nochlin, D., Kalaria, R. N., & Kimata, K. (1994). Heparan sulfate proteoglycan in diffuse plaques of hippocampus but not of cerebellum in Alzheimer's disease brain. *American Journal of Pathology*, 144(2), 337-347. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8311117/>
- Soscia, S. J., Kirby, J. E., Washicosky, K. J., Tucker, S. M., Ingelsson, M., Hyman, B., Burton, M. A., Goldstein, L. E., Duong, S., Tanzi, R. E., & Moir, R. D. (2010). The Alzheimer's disease-associated amyloid  $\beta$ -protein is an antimicrobial peptide. *PLoS ONE*, 5(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009505>
- Sperling, R. A., Aisen, P. S., Beckett, L. A., Bennett, D. A., Craft, S., Fagan, A. M., Iwatsubo, T., Jack, C. R., Kaye, J., Montine, T. J., Park, D. C., Reiman, E. M., Rowe, C. C., Siemers, E., Stern, Y., Yaffe, K., Carrillo, M. C., Thies, B., Morrison-Bogorad, 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 and Dementia*, 7(3), 280-292. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.003>
- Sperling, R. A., Jack, C. R., Black, S. E., Frosch, M. P., Greenberg, S. M., Hyman, B. T., Scheltens, P., Carrillo, M. C., Thies, W., Bednar, M. M., Black, R. S., Brashear, H. R., Grundman, M., Siemers, E. R., Feldman, H. H., & Schindler, R. J. (2011). Amyloid-related imaging abnormalities in amyloid-modifying therapeutic trials: Recommendations from the Alzheimer's Association Research Roundtable Workgroup. *Alzheimer's and Dementia*, 7(4), 367-385. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.05.2351>
- Spillmann, D., Witt, D., & Lindahl, U. (1998). Defining the interleukin-8-binding domain of heparan sulfate. *Journal of Biological Chemistry*, 273(25), 15487-15493. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.25.15487>
- Stamer, K., Vogel, R., Thies, E., Mandelkow, E., & Mandelkow, E. M. (2002). Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *Journal of Cell Biology*, 156(6), 1051-1063. <https://doi.org/10.1083/jcb.200108057>
- Stern, Y., Albert, S., Tang, M. X., & Tsai, W. Y. (1999). Rate of memory decline

- in AD is related to education and occupation: Cognitive reserve? *Neurology*, 53(9), 1942-1947. <https://doi.org/10.1212/wnl.53.9.1942>
- Stringer, S. E., & Gallagher, J. T. (1997). Specific binding of the chemokine platelet factor 4 to heparan sulfate. *Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20508-20514. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.33.20508>
- Su, J. H., Cummings, B. J., & Cotman, C. W. (1992). Localization of heparan sulfate glycosaminoglycan and proteoglycan core protein in aged brain and Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 51(4), 801-813. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(92\)90521-3](https://doi.org/10.1016/0306-4522(92)90521-3)
- Tammi, M. I., Day, A. J., & Turley, E. A. (2002). Hyaluronan and homeostasis: A balancing act. En *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 277, Número 7, pp. 4581-4584). J Biol Chem. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100037200>
- Terry, R. D., Hansen, L. A., Deteresa, R., Da Vies, P., Tobias, H., & Katzman, R. (1987). Senile dementia of the alzheimer type without neocortical neurofibrillary tangles. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 46(3), 262-268. <https://doi.org/10.1097/00005072-198705000-00003>
- Terry, A. V., & Buccafusco, J. J. (2003). The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: Recent challenges and their implications for novel drug development. En *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (Vol. 306, Número 3, pp. 821-827). J Pharmacol Exp Ther. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.041616>
- Thacker, B. E., Xu, D., Lawrence, R., & Esko, J. D. (2014). Heparan sulfate 3-O-sulfation: A rare modification in search of a function. *Matrix Biology*, 35, 60-72. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.12.001>
- 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. <https://doi.org/10.1212/WNL.58.12.1791>
- Theofilas, P., Ehrenberg, A. J., Dunlop, S., Di Lorenzo Alho, A. T., Nguy, A., Leite, R. E. P., Rodriguez, R. D., Mejia, M. B., Suemoto, C. K., Ferretti-Rebustini, R. E. D. L., Polichiso, L., Nascimento, C. F., Seeley, W. W., Nitrini, R., Pasqualucci, C. A., Jacob Filho, W., Rueb, U., Neuhaus, J., Heinsen, H., & Grinberg, L. T. (2017). Locus coeruleus volume and cell population changes during Alzheimer's disease progression: A stereological study in human postmortem brains with potential implication for early-stage biomarker discovery. *Alzheimer's and Dementia*, 13(3), 236-246. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.06.2362>
- Thompson, L. D., Pantoliano, M. W., & Springer, B. A. (1994). Energetic Characterization of the Basic Fibroblast Growth Factor-Heparin Interaction: Identification of the Heparin Binding Domain. *Biochemistry*, 33(13), 3831-3840. <https://doi.org/10.1021/bi00179a006>



- Todorović-Raković, N., Milovanović, J., & Nikolić-Vukosavljević, D. (2011). TGF- $\beta$  and its coreceptors in cancerogenesis: An overview. *Biomarkers in Medicine*, 5(6), 855-863. <https://doi.org/10.2217/bmm.11.59>
- Trout, A. L., Rutkai, I., Biose, I. J., & Bix, G. J. (2020). Review of alterations in perlecan-associated vascular risk factors in dementia. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2). <https://doi.org/10.3390/ijms21020679>
- Tsepilov, R. N., & Beloded, A. V. (2015). Hyaluronic acid - An «old» molecule with «new» functions: Biosynthesis and depolymerization of hyaluronic acid in bacteria and vertebrate tissues including during carcinogenesis. En *Biochemistry (Moscow)* (Vol. 80, Número 9, pp. 1093-1108). Maik Nauka Publishing / Springer SBM. <https://doi.org/10.1134/S0006297915090011>
- Turner, P. R., O'Connor, K., Tate, W. P., & Abraham, W. C. (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. En *Progress in Neurobiology* (Vol. 70, Número 1, pp. 1-32). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(03\)00089-3](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(03)00089-3)
- Uchimura, K. (2015). Keratan sulfate: Biosynthesis, structures, and biological functions. *Methods in Molecular Biology*, 1229, 389-400. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1714-3\\_30](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1714-3_30)
- Usenovic, M., Suon, S., Gretzula, C. A., & Parmentier-Batteur, S. (2018). Novel targets for blocking the uptake of tau oligomers in hipsc neurons. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 14(7), P1140-P1141. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.06.1550>
- Vallejo Johnson, M. A., & Marcial Velastegui, P. (2017). Influencia del estrés en la Enfermedad de Alzheimer. *Revista Ciencia UNEMI*, 10(25), 123-133. <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6645971.pdf>
- van Horsen, J, Wesseling, P., van den Heuvel, L. P., de Waal, R. M., & Verbeek, M. M. (2003). Heparan sulphate proteoglycans in Alzheimer's disease and amyloid-related disorders. *Lancet Neurol*, 2(8), 482-492.
- Van Horsen, Jack, Wilhelmus, M. M. M., Heljasvaara, R., Pihlajaniemi, T., Wesseling, P., De Waal, R. M. W., & Verbeek, M. M. (2002). Collagen XVIII: A novel heparan sulfate proteoglycan associated with vascular amyloid depositions and senile plaques in Alzheimer's disease brains. *Brain Pathology*, 12(4), 456-462. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2002.tb00462.x>
- Vellas, B., Andrieu, S., Sampaio, C., & Wilcock, G. (2007). Disease-modifying trials in Alzheimer's disease: a European task force consensus. En *Lancet Neurology* (Vol. 6, Número 1, pp. 56-62). Lancet Neurol. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70677-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70677-9)
- Verbeek, M. M., Otte-Höller, I., Van Den Born, J., Van Den Heuvel, L. P. W. J., David, G., Wesseling, P., & De Waal, R. M. W. (1999). Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan accumulating in Alzheimer's disease brain.

- American Journal of Pathology*, 155(6), 2115-2125.  
[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65529-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65529-0)
- Veugelers, M., De Cat, B., Ceulemans, H., Bruystens, A. M., Coomans, C., Dürr, J., Vermeesch, J., Marynen, P., & David, G. (1999). Glypican-6, a new member of the glypican family of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry*, 274(38), 26968-26977.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.38.26968>
- Veugelers, M., Vermeesch, J., Reekmans, G., Steinfeld, R., Marynen, P., & David, G. (1997). Characterization of glypican-5 and chromosomal localization of human GPC5, a new member of the glypican gene family. *Genomics*, 40(1), 24-30. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.4518>
- Vlodavsky, I., Elkin, M., Abboud-Jarrous, G., Levi-Adam, F., Fuks, L., Shafat, I., & Ilan, N. (2008). Heparanase: One molecule with multiple functions in cancer progression. *Connective Tissue Research*, 49(3-4), 207-210.  
<https://doi.org/10.1080/03008200802143281>
- Vlodavsky, I., Goldshmidt, O., Zcharia, E., Atzmon, R., Rangini-Guatta, Z., Elkin, M., Peretz, T., & Friedmann, Y. (2002). Mammalian heparanase: Involvement in cancer metastasis, angiogenesis and normal development. *Seminars in Cancer Biology*, 12(2), 121-129.  
<https://doi.org/10.1006/scbi.2001.0420>
- Walker, K. A., Sims-Lucas, S., Caruana, G., Cullen-McEwen, L., Li, J., Sarraj, M. A., Bertram, J. F., & Stenvers, K. L. (2011). Betaglycan is required for the establishment of nephron endowment in the mouse. *PLoS ONE*, 6(4).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018723>
- Wallin, A., & Blennow, K. (1996). Clinical subgroups of the Alzheimer syndrome. *Acta Neurologica Scandinavica*, 94(SUPPL.165), 51-57.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1996.tb05872.x>
- Walsh, D., & Selkoe, D. J. (2005). Oligomers on the Brain: the Emerging Role of Soluble Protein Aggregates in Neurodegeneration. *Protein & Peptide Letters*, 11(3), 213-228. <https://doi.org/10.2174/0929866043407174>
- Wang, S. J., Wreesmann, V. B., & Bourguignon, L. Y. W. (2007). Association of CD44 V3-containing isoforms with tumor cell growth, migration, matrix metalloproteinase expression, and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Head and Neck*, 29(6), 550-558.  
<https://doi.org/10.1002/hed.20544>
- Wang, S., Mims, P. N., Roman, R. J., & Fan, F. (2016). Is Beta-Amyloid Accumulation a Cause or Consequence of Alzheimer's Disease? *Journal of Alzheimer's parkinsonism & dementia*, 1(2).  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28815226>
- Watanabe, K., Yamada, H., & Yamaguchi, Y. (1995). K-glypican: A novel GPI-anchored heparan sulfate proteoglycan that is highly expressed in

- developing brain and kidney. *Journal of Cell Biology*, 130(5), 1207-1218. <https://doi.org/10.1083/jcb.130.5.1207>
- Watanabe, N., Araki, W., Chui, D.-H., Makifuchi, T., Ihara, Y., & Tabira, T. (2004). Glypican-1 as an A $\beta$  binding HSPG in the human brain: Its localization in DIG domains and possible roles in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *The FASEB Journal*, 18(9), 1013-1015. <https://doi.org/10.1096/fj.03-1040fje>
- Wechalekar, A. D., Gillmore, J. D., & Hawkins, P. N. (2016). Systemic amyloidosis. En *The Lancet* (Vol. 387, Número 10038, pp. 2641-2654). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01274-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01274-X)
- Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y., & Kirschner, M. W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(5), 1858-1862. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.5.1858>
- Welling, M. M., Nabuurs, R. J. A., & Van Der Weerd, L. (2015). Potential role of antimicrobial peptides in the early onset of Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia*, 11(1), 51-57. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.12.020>
- Wessels, A. M., Tariot, P. N., Zimmer, J. A., Selzler, K. J., Bragg, S. M., Andersen, S. W., Landry, J., Krull, J. H., Downing, A. M., Willis, B. A., Shcherbinin, S., Mullen, J., Barker, P., Schumi, J., Shering, C., Matthews, B. R., Stern, R. A., Vellas, B., Cohen, S., ... Sims, J. R. (2020). Efficacy and Safety of Lanabecestat for Treatment of Early and Mild Alzheimer Disease: The AMARANTH and DAYBREAK-ALZ Randomized Clinical Trials. *JAMA neurology*, 77(2), 199-209. <https://doi.org/10.1001/JAMANEUROL.2019.3988>
- Whitehouse, P. J., Price, D. L., Struble, R. G., Clark, A. W., Coyle, J. T., & DeLong, M. R. (1982). Alzheimer's disease and senile dementia: Loss of neurons in the basal forebrain. *Science*, 215(4537), 1237-1239. <https://doi.org/10.1126/science.7058341>
- Whitelock, J. M., & Iozzo, R. V. (2005). Heparan sulfate: A complex polymer charged with biological activity. En *Chemical Reviews* (Vol. 105, Número 7, pp. 2745-2764). Chem Rev. <https://doi.org/10.1021/cr010213m>
- Wiedermann, C. J., & Römisch, J. (2002). The anti-inflammatory actions of antithrombin - A review. En *Acta Medica Austriaca* (Vol. 29, Número 3, pp. 89-92). Acta Med Austriaca. <https://doi.org/10.1046/j.1563-2571.2002.02012.x>
- Wilson, J. C., Laloo, A. E., Singh, S., & Ferro, V. (2014). <sup>1</sup>H NMR spectroscopic studies establish that heparanase is a retaining glycosidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443(1), 185-188. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.079>

- Winblad, B., Andreasen, N., Minthon, L., Floesser, A., Imbert, G., Dumortier, T., Maguire, R. P., Blennow, K., Lundmark, J., Staufenbiel, M., Orgogozo, J. M., & Graf, A. (2012). Safety, tolerability, and antibody response of active A $\beta$  immunotherapy with CAD106 in patients with Alzheimer's disease: Randomised, double-blind, placebo-controlled, first-in-human study. *The Lancet Neurology*, *11*(7), 597-604. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70140-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70140-0)
- Winkler, E. A., Nishida, Y., Sagare, A. P., Rege, S. V., Bell, R. D., Perlmutter, D., Sengillo, J. D., Hillman, S., Kong, P., Nelson, A. R., Sullivan, J. S., Zhao, Z., Meiselman, H. J., Wenby, R. B., Soto, J., Abel, E. D., Makshanoff, J., Zuniga, E., De Vivo, D. C., & Zlokovic, B. V. (2015). GLUT1 reductions exacerbate Alzheimer's disease vasculo-neuronal dysfunction and degeneration. *Nature Neuroscience*, *18*(4), 521-530. <https://doi.org/10.1038/nn.3966>
- Wischik, C. M., Edwards, P. C., Lai, R. Y. K., Roth, M., & Harrington, C. R. (1996). Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(20), 11213-11218. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.20.11213>
- Wolters, F. J., Chibnik, L. B., Waziry, R., Anderson, R., Berr, C., Beiser, A., Bis, J. C., Blacker, D., Bos, D., Brayne, C., Dartigues, J. F., Darweesh, S. K. L., Davis-Plourde, K. L., de Wolf, F., Debette, S., Dufouil, C., Fornage, M., Goudsmit, J., Grasset, L., ... Hofman, A. (2020). Twenty-seven-year time trends in dementia incidence in Europe and the United States: The Alzheimer Cohorts Consortium. *Neurology*, *95*(5), e519-e531. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000010022>
- Xiong, N., Schiller, M. R., Li, J., Chen, X., & Lin, Z. (2021). Severe COVID-19 in Alzheimer's disease: APOE4's fault again? *Alzheimer's Research and Therapy*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/s13195-021-00858-9>
- Yan, T., Ding, F., & Zhao, Y. (2019). Integrated identification of key genes and pathways in Alzheimer's disease via comprehensive bioinformatical analyses. *Hereditas*, *156*(1). <https://doi.org/10.1186/S41065-019-0101-0>
- Yao, Z. X., & Papadopoulos, V. (2002). Function of beta-amyloid in cholesterol transport: a lead to neurotoxicity. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *16*(12), 1677-1679. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0285fje>
- Ye, S., Huang, Y., Müllendorff, K., Dong, L., Giedt, G., Meng, E. C., Cohen, F. E., Kuntz, I. D., Weisgraber, K. H., & Mahley, R. W. (2005). Apolipoprotein (apo) E4 enhances amyloid  $\beta$  peptide production in cultured neuronal cells: ApoE structure as a potential therapeutic target. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(51), 18700-18705. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508693102>
- Youmans, K. L., Tai, L. M., Nwabuisi-Heath, E., Jungbauer, L., Kanekiyo, T.,

- Gan, M., Kim, J., Eimer, W. A., Estus, S., Rebeck, G. W., Weeber, E. J., Bu, G., Yu, C., & LaDu, M. J. (2012). APOE4-specific changes in A $\beta$  accumulation in a new transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*, 287(50), 41774-41786. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.407957>
- Young, J. E., Fong, L. K., Frankowski, H., Petsko, G. A., Small, S. A., & Goldstein, L. S. B. (2018). Stabilizing the Retromer Complex in a Human Stem Cell Model of Alzheimer's Disease Reduces TAU Phosphorylation Independently of Amyloid Precursor Protein. *Stem Cell Reports*, 10(3), 1046-1058. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.01.031>
- Younkin, S. G. (1998). The role of A $\beta$ 42 in Alzheimer's disease. *Journal of Physiology Paris*, 92(3-4), 289-292. [https://doi.org/10.1016/S0928-4257\(98\)80035-1](https://doi.org/10.1016/S0928-4257(98)80035-1)
- Yu, J. T., Tan, L., & Hardy, J. (2014). Apolipoprotein e in Alzheimer's disease: An update. En *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 37, pp. 79-100). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-071013-014300>
- Zhang, G. L., Zhang, X., Wang, X. M., & Li, J. P. (2014). Towards Understanding the Roles of Heparan Sulfate Proteoglycans in Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/516028>
- Zhang, Q., Chen, C. Z., Swaroop, M., Xu, M., Wang, L., Lee, J., Pradhan, M., Shen, M., Luo, Z., Xu, Y., Huang, W., Zheng, W., & Ye, Y. (2020). Targeting heparan sulfate proteoglycan-assisted endocytosis as a COVID-19 therapeutic option. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.07.14.202549>
- Zhang, Xian, Li, Y., Xu, H., & Zhang, Y. W. (2014). The  $\gamma$ -secretase complex: From structure to function. En *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 8, Número DEC). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00427>
- Zhang, Xiao, O'Callaghan, P., Li, H., Tan, Y., Zhang, G. L., Barash, U., Wang, X., Lannfelt, L., Vlodavsky, I., Lindahl, U., & Li, J. P. (2021). Heparanase overexpression impedes perivascular clearance of amyloid- $\beta$  from murine brain: relevance to Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01182-x>
- Zhang, Xiao, Wang, B., & Li, J. P. (2014). Implications of heparan sulfate and heparanase in neuroinflammation. En *Matrix Biology* (Vol. 35, pp. 174-181). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.12.009>
- Zhang, Xiao, Wang, B., O'Callaghan, P., Hjertström, E., Jia, J., Gong, F., Zcharia, E., Nilsson, L. N. G., Lannfelt, L., Vlodavsky, I., Lindahl, U., & Li, J. P. (2012). Heparanase overexpression impairs inflammatory response and macrophage-mediated clearance of amyloid- $\beta$  in murine brain. *Acta Neuropathologica*, 124(4), 465-478. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-0997-1>

Zhao, J., Huvent, I., Lippens, G., Eliezer, D., Zhang, A., Li, Q., Tessier, P., Linhardt, R. J., Zhang, F., & Wang, C. (2017). Glycan Determinants of Heparin-Tau Interaction. *Biophysical Journal*, 112(5), 921-932. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.01.024>

Zhao, Y., & Lukiw, W. J. (2015). Microbiome-generated amyloid and potential impact on amyloidogenesis in Alzheimer's disease (AD). *Journal of Nature and Science*, 1(7).

Zhou, Z. D., Chan, C. H. S., Ma, Q. H., Xu, X. H., Xiao, Z. C., & Tan, E. K. (2011). The roles of amyloid precursor protein (APP) in neurogenesis, implications to pathogenesis and therapy of alzheimer Disease (AD). *Cell Adhesion and Migration*, 5(4). <https://doi.org/10.4161/cam.5.4.16986>

## 8. ANEXOS

---





## Anexo 1: Artículo publicado correspondiente al Capítulo I

Journal of Alzheimer's Disease 58 (2017) 185–192  
 DOI 10.3233/JAD-161298  
 IOS Press

185

# Upregulated Expression of Heparanase and Heparanase 2 in the Brains of Alzheimer's Disease

Beatriz García<sup>a,b</sup>, Carla Martín<sup>a,b</sup>, Olivia García-Suárez<sup>b,c</sup>, Bárbara Muñoz-Alonso<sup>a</sup>, Helena Ordiales<sup>a</sup>, Santiago Fernández-Menéndez<sup>d</sup>, Jorge Santos-Juanes<sup>e</sup>, Laura Lorente-Geaf<sup>f</sup>, Sonia Castañón<sup>g</sup>, Ikerne Vicente-Etxenausia<sup>h</sup>, Kelvin Manuel Piña Batista<sup>i</sup>, Iruñe Ruiz-Díaz<sup>j</sup>, María Cristina Caballero-Martínez<sup>j,k</sup>, Jesús Merayo-Llaves<sup>b</sup>, Isabel Guerra-Merino<sup>f</sup>, Luis M. Quirós<sup>a,b</sup> and Iván Fernández-Vega<sup>b,e,f,h,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Functional Biology, University of Oviedo, Spain

<sup>b</sup>Instituto Universitario Fernández-Vega, Oviedo, Spain

<sup>c</sup>Department of Morphology and Cell Biology, University of Oviedo, Oviedo, Spain

<sup>d</sup>Department of Neurology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

<sup>e</sup>Department of Pathology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

<sup>f</sup>Department of Pathology, Hospital Universitario de Araba-Txagorritxu, Spain

<sup>g</sup>Department of Biotechnology, Neiker-Tecnalia Arkaute, Vitoria-Gasteiz, Spain

<sup>h</sup>Biobanco Vasco para la Investigación (O+eHun), Brain Bank, Hospital Universitario Araba, Spain

<sup>i</sup>Department of Neurosurgery, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

<sup>j</sup>Department of Pathology, Hospital Universitario Donostia, Gipuzkoa, Spain

<sup>k</sup>Biobanco Vasco para la Investigación (O+eHun), Brain Bank Hospital Universitario Donostia, Spain

Handling Associate Editor: Bing Zhang

Accepted 1 March 2017

## Abstract.

**Background:** Heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) promote amyloid- $\beta$  peptide and tau fibrillization in Alzheimer's disease (AD) and provide resistance against proteolytic breakdown. Heparanase (HPSE) is the only enzyme that cleaves heparan sulfate (HS). Heparanase 2 (HPSE2) lacks HS-degrading activity, although it is able to interact with HS with high affinity.

**Objective:** To analyze HPSE and HPSE2 expressions at different stages of AD.

**Methods:** RT-PCR was used to analyze transcription levels of both heparanases at different stages of AD, and immunohistochemistry was performed to localize each one in different parts of the brain.

**Results:** Both proteins appeared overexpressed at different stages of AD. Immunohistochemistry indicated that the presence of the heparanases was related to AD pathology, with intracellular deposits found in degenerated neurons. At the extracellular level, HPSE was observed only in neuritic plaques with a fragmented core, while HPSE2 appeared in those with compact cores as well.

**Conclusion:** Given the involvement of HSPGs in AD pathology, there would seem to be a relationship between the regulation of heparanase expression, the features of the disease, and a possible therapeutic alternative.

Keywords: Alzheimer's disease, amyloid, amyloid- $\beta$ , glycosaminoglycan, heparan sulfate, heparanase

\*Correspondence to: Dr. Ivan Fernandez-Vega, MD, PhD, Service of Anatomic Pathology, Hospital Universitario de Araba-Txagorritxu, C/Jose Atxotegui s/n, E-01009, Vitoria-Gasteiz,

Alava, Spain. Tel.: +34 945007001; E-mail: ivan\_fernandez-vega@hotmail.com.

## INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disease, and the main cause of dementia in older people worldwide. AD is characterized by progressive loss of memory and cognitive dysfunction. The disease inexorably leads to death, with patients usually dying of complications of chronic illness [1, 2]. AD is proteinopathy-driven, principally by two types of abnormal protein deposition in the human brain: the extracellular accumulation of cytotoxic amyloid- $\beta$  peptide ( $A\beta$ ) in senile plaques, and the intracellular accumulation of hyperphosphorylated forms of a microtubule associated protein tau, in neurofibrillary tangles [3, 4]. Little to date is known of how these plaques trigger the onset of neurodegeneration. However, it is thought that heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) may, on the one hand, promote  $A\beta$  or tau fibrillization, and, on the other, provide resistance against proteolytic breakdown [5]. In addition to  $A\beta$ , the most common AD-related subtype of senile plaques, called neuritic plaques (NPs), also contain accessory molecules, such as heparan sulfate (HS), apolipoprotein E, serum amyloid-P component, and  $\alpha$ 1-antichymotrypsin. Previous data indicates that the HS- $A\beta$  interaction contributes to every stage of pathogenesis in AD, including production, clearance, accumulation, aggregation, and toxicity of  $A\beta$  [6–8].

Heparanase (HPSE) is an endo- $\beta$ -D-glucuronidase that cleaves specific linkages in the structure of HS, yielding biologically active fragments [9]. By altering HSPGs on the cell surface, HPSE is thought to regulate the cellular response to external stimuli [10]. HPSE develops multiple functions in cancer, inflammation, infections, diabetes, and atherosclerosis [11–17], and in terms of neurodegeneration, recent studies have shown that overexpression of HPSE lowers the amyloid burden in transgenic mouse models of AD [18]. Heparanase 2 (HPSE2) is a homologue of HPSE that lacks HS-degrading activity, although it is able to interact with HS with high affinity [19, 20]. HPSE2 could act as a natural competitive inhibitor of HPSE due to its ability to associate with HPSE, and it appears, to modulate its enzymatic activity and signaling properties [14, 19].

In this study, we investigate for the first time the expression of two genes encoding heparanases in different stages of AD, using human brain tissue from different brain areas, principally following the Braak & Braak classification [21].

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

The following materials were purchased from the manufacturers indicated: RNeasy Kit and RNase-Free DNase from Qiagen (Hilden, Germany); High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit and PowerSYBR Green PCR Master Mix from Applied Biosystems (Foster City, CA); GenElute PCR clean-up kit and 3–3' diaminobenzidine from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO); EnVision™ Flex/HRP and high pH Envision FLEX target retrieval solution from Dako (Glostrup, Denmark). All other chemicals were obtained from commercial sources and were of analytical grade.

The following antibodies were used in this study: Goat anti-heparanase 1 polyclonal antibody (L-19), which recognizes the proteolytically-processed highly active HPSE (50 kDa active form of HPSE), was purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA) and rabbit anti-heparanase-2 polyclonal antibody, from GeneTex (Atlanta, GA). Both primary antibodies were properly validated as specific for the HPSE and HPSE2 proteins [14]. Anti-rabbit (sc-2004) and anti-goat (sc-2005) secondary antibodies were also from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Molecular Weight of proteolytically processed highly active HPA1: 50 kDa.

### Patients and samples

Samples from 18 patients with AD and 6 controls were collected at the Brain Biobank of the Hospital Universitario de Araba between February 2013 and October 2015 following approval from the same institute's Review Board on Ethical Procedures, and after informed consent for the research had been received from each patient or their relatives. The diagnosis of AD was based on morphological and immunohistochemical criteria according to the most up-to-date grading classification (NIA-RI Consensus 1997). The characteristics of the patients studied (age, gender) and the timing of the postmortem of each sample were recorded (Table 1). Samples from the different brain areas were collected following the Braak & Braak classification [21]. Additionally, samples from basal ganglia (pallidum) and the cerebellum were used as an internal control, since they are assumed to not be altered in this disease.

Table 1  
Patient characteristics and descriptive statistics

	Patients				
	Total (N=24)	Control (N=6)	Mild AD (N=6)	Moderate AD (N=6)	Severe AD (N=6)
Sex (%)					
Male	7 (30)	3 (50)	1 (17)	2 (33)	1 (17)
Female	17 (70)	3 (50)	5 (83)	4 (67)	5 (83)
Age (Mean ± sd)	84 ± 11	79 ± 16	89 ± 5	89 ± 10	80 ± 12
Brain Weight (g)	1128 ± 111	1148 ± 57	1177 ± 26	1122 ± 31	967 ± 19
Postmortem interval (h)	17 ± 5	18 ± 5	19 ± 5	15 ± 5	20 ± 4

AD, Alzheimer's disease; Mild AD, I-II Braak & Braak classification; Moderate AD, III-IV Braak & Braak classification; Severe AD, V-VI Braak & Braak classification.

#### Total RNA isolation and cDNA synthesis

To obtain the RNA, tissue fragments of between 20 and 30 mg in weight were homogenized using a polytron PT 2100 (Kinematica Inc.; Bohemia, NY), and RNA was isolated using the RNeasy kit, following the manufacturer's specifications. To ensure removal of residual contaminating DNA, samples were subjected to treatment with RNase-free DNase during the purification process itself. The concentration of RNA obtained was determined spectrophotometrically by measuring absorbance using a Picodrop Microliter UV/Vis spectrophotometer (Picodrop Limited, UK). The samples were divided into aliquots of 10 µl and either used for reverse transcription reactions or stored at -20°C until further use.

cDNA synthesis was carried out using the High Capacity cDNA Transcription Kit following the manufacturer's guidelines. The reactions were performed using an iCycler IQ thermocycler (BioRad; Hercules, CA), using 2 µg of RNA as starting material. The reaction products were cleaned using the PCR Clean-Up GenElute kit following the manufacturer's instructions. Finally, the aliquots containing the cDNA were diluted 1:20 with water and used for qRT-PCR assays or stored at -20°C until use.

#### qRT-PCR reactions

In all cases, specific oligonucleotides were designed on different exons or exon junctions, using the program Primer 3 ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)). The size of the amplicon in all cases was between 70 and 150 base pairs and wherever possible T<sub>m</sub> was above 77°C. The theoretical T<sub>m</sub> for each amplicon was determined using the program Biomath (<http://www.promega.com/biomath/calc11>).

The primer sequences were: *HPSE* (Gene ID 10855) forward 5' ATGCTCAGTTGCTCCTGGAC 3', reverse 5' CTCCTAACTGCGACCCATTG 3'; *HPSE2* (Gene ID 60495) forward 5' cacctgatgttatgctggag 3', reverse 5' tccagagcaatcagcaagta 3'.

A minimum four repetitions of all the qRT-PCR reactions were carried out in a final volume of 10 µl, in accordance with the manufacturer's specifications, using 1 µl of the cDNA dilution as template, with 2 µl of primer pair mix (200 nM final concentration) and 5 µl of SYBR Green mix, assembled in 96-well microtiter plates. The plates were sealed with optical film and centrifuged at 2500 rpm for 5 min before being placed in a Real-Time ABI Prism Detection System device (Applied Biosystems; Foster City, CA) with the following cycling conditions: 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 15 s followed by 60°C for 60 s. Following the thermal cycling and data collection steps, amplifier products were analyzed using a melt curve program (95°C for 1 min, 55°C for 1 min, then increments of 0.5°C per cycle for 80 cycles of 10 s each). For each amplification, the presence of a single peak with a T<sub>m</sub> corresponding to the theoretical value previously calculated was verified. Actin was included on each plate as a control gene in order to compare run variation and to normalize individual gene expression.

#### Data analysis

To calculate the efficiencies of amplification for each gene we used the program LinRegPCR (<http://www.gene-quantification.de/download.html>), taking the best correlation coefficient (after considering a minimum of 3 points within the window of linearity) and establishing the average of all positive amplifications. The expression values of the genes of interest were calculated as  $(1 + \text{efficiency})^{-\Delta\text{Ct}}$  (relative to actin as the housekeeping gene).



### Immunohistochemistry

Paraffin embedded tissue sections were treated with xylene to render them diaphanous (the paraffin being removed later by passing it through decreasing alcohol concentrations until 100% water was reached). Rehydrated sections were rinsed in phosphate buffered saline (PBS) containing 1% tween-20. For the detection of HPSE2, sections were heated in high pH Envision FLEX target retrieval solution at 65°C for 20 min and then incubated for 20 min at room temperature in the same solution. For HPSE detection, the final step was omitted.

Endogenous peroxidase activity (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and non-specific binding (33% fetal calf serum) were blocked and the sections were incubated overnight at 4°C with primary antibodies using a 1:100 dilution. Ready to use labelled polymer-HRP (DAKO, Spain) was used as secondary antibodies, and 3-3' diaminobenzidine was employed as a chromogen. Finally, samples were counterstained with hematoxylin, dehydrated, and mounted in Entellan® (Merck, Germany). The sections were studied and photographed under a light microscope (Nikon – Eclipse 80i).

### Immunohistochemistry assessment

The protein expression levels were evaluated by two independent experts (and in the case of disagreement, a third).

### Statistical analysis

A non-parametric Wilcoxon test was used for the statistical analysis of the experiments with the level of significance set at  $p < 0.05$ . All analyses were performed using the Statistics for Windows program (Statsoft Inc.; Tulsa, OK).

## RESULTS

### Analysis of differential gene expression

Initially we used qRT-PCR to perform a quantitative analysis of the differential transcription of the coding genes using samples of 7 different tissue types from various encephalic areas. Mild AD cases (I-II Braak & Braak classification), Moderate AD cases (III-IV Braak & Braak classification), and Severe AD cases (V-VI Braak & Braak classification) were analyzed and compared to healthy controls. The samples

corresponded to patients of both sexes aged between 52 and 103 years. Determination of the expression of HPSE and HPSE 2 from the different areas of AD brains was performed by immunohistochemistry.

### Differential expression of heparanase

Analysis of the transcription levels of the HPSE gene by means of qRT-PCR detected expression levels in all samples studied. There were statistically significant differences in alterations between AD stages as defined by Braak & Braak staging. Additionally, significant overexpression of HPSE was noted in neurodegenerated areas of AD brains. Furthermore, significant HPSE underexpression was observed in pallidum in mild and moderate AD brains. The cerebellum of brains at different AD stages did not show any significant alterations in HPSE transcription levels (Fig. 1).

Compared with healthy tissue, immunohistochemistry showed the presence of intracellular HPSE deposits in atrophic neurons with neurofibrillary tangles. At the extracellular level, HPSE was mainly observed in NPs with fragmented core rather than those with a large dense core, pointing to the existence of a gradient of HPSE expression. Basal ganglia and cerebellum were mostly negative (Fig. 2).

### Differential expression of heparanase 2

We analyzed the levels of transcription of *HPSE2* in cerebral tissue using primers designed to detect wild-type transcripts (*HPSE2c*). Analysis of the transcription levels of *HPSE2* detected expression in all samples studied. Stage-dependent (based on Braak & Braak) statistically significant differences were found in AD brains. Additionally, significant *HPSE2* overexpression was noted, mainly in neurodegenerated areas of AD brains and in the cerebellum in all AD cases. Pallidum, on the other hand, showed no significant alterations of *HPSE2* transcription levels (Fig. 1).

*HPSE2* protein expression was analyzed by immunohistochemistry, showing the presence of intracellular *HPSE2* deposits in atrophic neurons with neurofibrillary degeneration. At the extracellular level, *HPSE2* was observed in almost all NPs. *HPSE2* was undetectable in pallidum and cerebellum, although the latter showed a very mild diffuse positivity (Fig. 3).

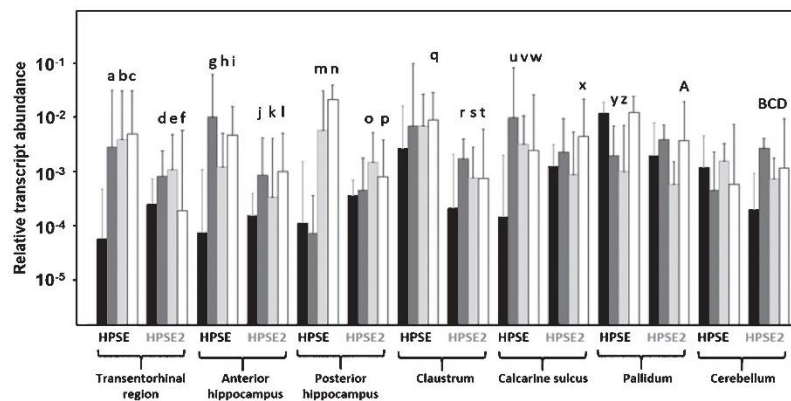


Fig. 1. Differential transcription of heparanase and heparanase 2 in Alzheimer's disease (AD). Relative abundance for controls (black bars), mild AD (dark gray bars), moderate AD (light gray bars) and severe AD (white bars) are plotted on a log scale for each gene assayed and the spreads represent standard deviations. Genes and zones that display significant differences in their transcription levels are highlighted. a:  $p=0.000011$ ; b:  $p=0.000001$ ; c:  $p=0.000000$ ; d:  $p=0.013545$ ; e:  $p=0.01817$ ; f:  $p=0.026365$ ; g:  $p=0.000005$ ; h:  $p=0.002675$ ; i:  $p=0.000021$ ; j:  $p=0.043012$ ; k:  $p=0.013804$ ; l:  $p=0.000149$ ; m:  $p=0.000079$ ; n:  $p=0.000000$ ; o:  $p=0.025297$ ; p:  $p=0.048391$ ; q:  $p=0.024351$ ; r:  $p=0.001165$ ; s:  $p=0.041894$ ; t:  $p=0.037990$ ; u:  $p=0.000007$ ; v:  $p=0.000063$ ; w:  $p=0.005458$ ; x:  $p=0.005616$ ; y:  $p=0.000002$ ; z:  $p=0.000009$ ; A:  $p=0.012136$ ; B:  $p=0.001540$ ; C:  $p=0.004565$ ; D:  $p=0.007672$ . Values on the Y axis are represented on a logarithmic scale.

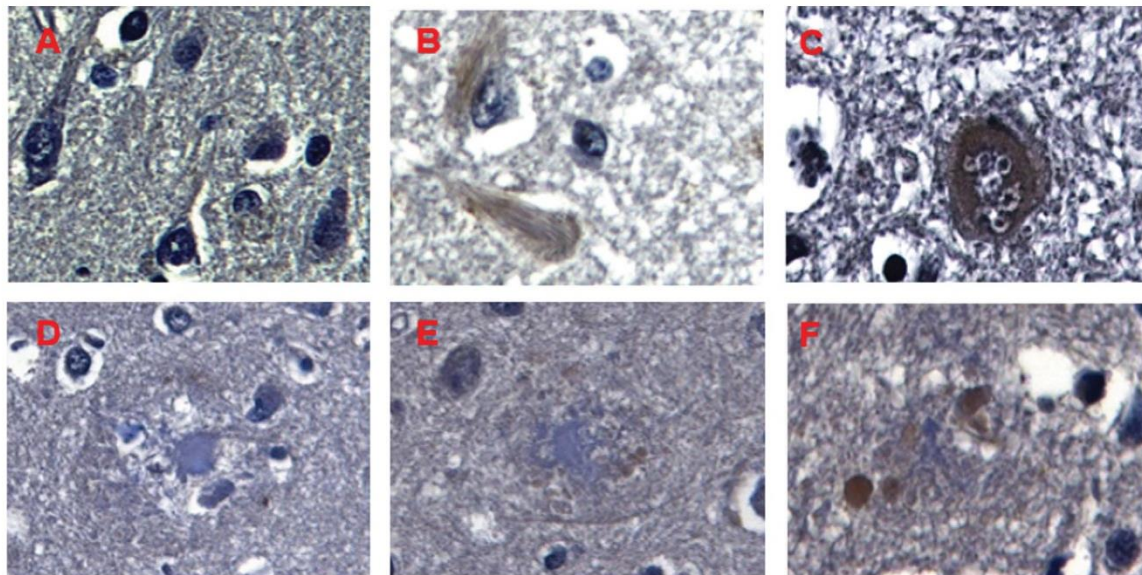


Fig. 2. Immunohistochemical staining of HPSE in Alzheimer's disease. A) Negative expression of HPSE in neurons and glial cells in control brain samples. B, C) HPSE overexpression in neurons with neurofibrillary tangles (B) and granulovacuolar degeneration (C). D-F) NPs showing different core size, from big to medium-sized and small (white arrows); in inverse correlation to HPSE deposits from mild (D) to moderate (E) and high levels (F) (black arrow). Magnification 600X.

## DISCUSSION

AD is a fatal progressive neurodegenerative disorder mainly caused by extracellular accumulation of A $\beta$  protein in plaques, which is thought to account for the onset of neurodegeneration. Several *in vitro* studies have demonstrated the interaction of A $\beta$  with

HS [22, 23]. In addition, studies have demonstrated that HS molecules are preferentially colocalized with A $\beta$  around the dense cores of senile plaques [18, 24] and it has been proposed that A $\beta$ -HS interaction is mutually protective, in that A $\beta$  is protected from protease degradation and HS is protected from HPSE degradation [22, 25]. HPSE is a multitasking protein



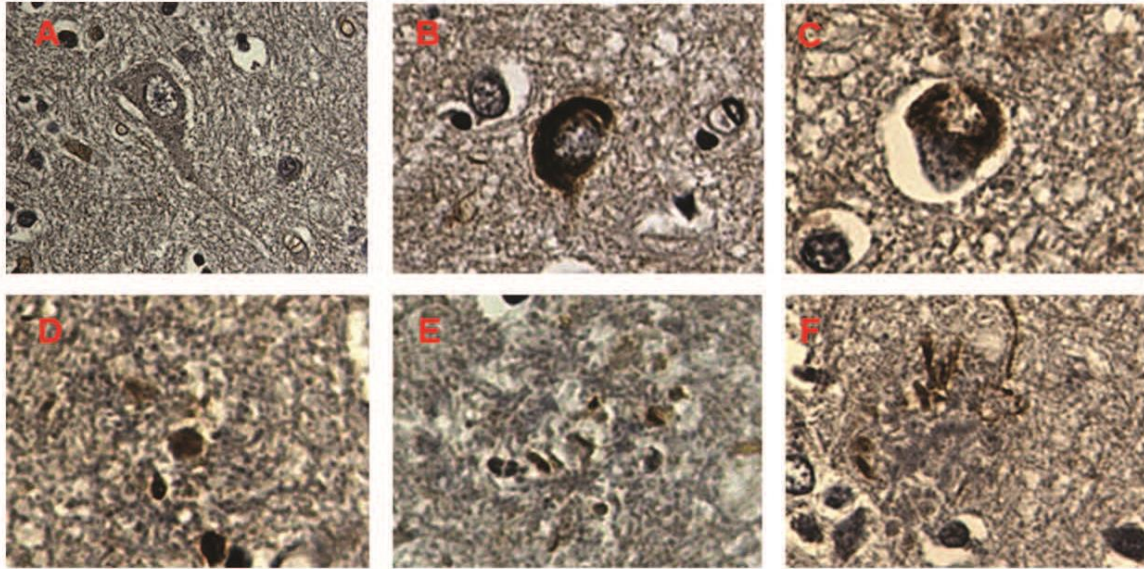


Fig. 3. Immunohistochemical staining of HPSE 2 in Alzheimer's disease. A) Negative expression of HPSE2 in neurons and glial cells in control brain samples. B, C) HPSE2 overexpression in neurons with neurofibrillary tangles (B) and granulovacuolar degeneration (C). D-F) NPs showing different forms of HPSE 2 deposits. Concentrated deposits in unfragmented core of NPs (D), dispersed deposits (E), and filament-like deposits are indicated (F) (blue arrows). Magnification 600X.

characterized by involvement in enzymatic and non-enzymatic activities. The former activity gives rise to fragments of HSPG chains which are biologically involved in multiple physiological and pathological functions [9]. Thanks to the cleavage of HS, HPSE also promotes the release and diffusion of several HS-linked molecules, such as growth factors, cytokines, and enzymes. In addition to degrading HS chains, HPSE has non-enzymatic functions that trigger several signaling pathways [26]. In the present work, we have focused on the study of the expression levels of 2 genes which encode heparanases at different stages of AD using RT-PCR, and then localized the proteins in the tissue through immunohistochemistry.

Concerning HPSE, a significant overexpression was noted in neurodegenerated areas of AD brains, which mostly correlated well with the Braak & Braak stage for each case. We speculate that HPSE overexpression in AD could be a consequence of the disease itself, rather than being part of the cause. Under this scenario, different brain cells would release HPSE in order to reduce the existing AD pathology by degrading HS chains, exposing A $\beta$  deposits to degradation. Many different treatment approaches have tried to focus on inhibiting tau-aggregation or reducing A $\beta$  deposits by decreasing production, preventing aggregation, or increasing removal [27, 28]. There have been many clinical trials for AD treatments,

and although the majority have proved inconclusive [29–34], these treatment options continue to be pursued. However, it is our view that the lack of progress in AD treatment is due to the majority of studies having underestimated either the functional or structural roles of HS molecules in AD [35].

Published data indicates that intact HS chains are required at multiple sites in order to mediate neurodegeneration, further supporting the notion that HPSE is possibly a crucial element that may have potential treatment implications in AD [36]. Additionally, recent experimental evidence suggests that transcellular propagation of fibrillar protein aggregates drives the progression of neurodegenerative diseases in a prion-like manner [37]. Likewise, the mechanism by which aggregated extracellular proteins, such as tau, bind and enter cells to trigger intracellular fibril formation occurs via HSPG binding [38]. HPSE could, therefore, act to modulate or impede this process, as heparinase III does *in vitro* in order to slow down neurodegeneration [38]. However, there are potentially contradictory roles that can be ascribed to HPSE in AD: On the one hand, HPSE could impair inflammatory response and macrophage-mediated clearance of A $\beta$  favoring AD progression. On the other, HPSE could block the internalization and propagation of pathologic tau throughout the brain [38, 39]. The significant overexpression of HPSE in calcarine sulcus

(neocortex) at early stages of AD could be explained by the existence of extracellular deposits related to fragmented NPs. Likewise, the significant underexpression of HPSE in the pallidum could be the result of strong HPSE diffusion to neurodegenerative areas, even at early stages of disease. And finally, we have found the presence of HPSE principally in those NPs with a fragmented core, which may possibly contribute to breaking down plaques and exposing A $\beta$  to degradation [40–42].

We observed that HPSE2 was significantly overexpressed in AD cases following neurodegeneration, the same as HPSE, albeit with lower levels of ARNm expression. Similar again to the findings for HPSE, significant changes in HPSE2 were mostly AD-stage-dependent. Histologically, HPSE2 was found to be associated to NPs and neurofibrillary tangles. Furthermore, a mild diffuse neurophilic immunostaining was noted in AD-related areas and cerebellum. In this sense, HPSE2 binds to HSPGs but, unlike HPSE, it fails to become internalized, and remains on the cell surface for a relatively long period of time [20]. Detailed characterization of HPSE2 at the biochemical, cellular, and clinical levels is not available to date, and its role in normal physiology and pathological disorders is unclear. However, recent studies have shown that HPSE2 is an endogenous inhibitor of HPSE activity, likely due to its high affinity to HS and its ability to associate physically with HPSE [20]. In this light, HPSE2 could inhibit HPSE activity, facilitating the progression of AD pathology, by impeding the clearance of A $\beta$  deposits and giving rise to more internalization and propagation of pathologic tau throughout the brain.

In conclusion, our study reveals details of the behavior of both heparanases in AD, pointing to the combined overexpression of HPSE and HPSE2, mostly related to AD pathology. While HPSE activity would seem to either release A $\beta$  deposits or block tau intracellular fibril formation and propagation, HPSE2 appears to act as an inhibitor of HPSE. Finally, the relevance, both biological and clinical, for studying both heparanases is based on the fact that no other molecules are capable of performing the same function, making both enzymes an attractive potential target for medical treatment. In this regard, considering that HS-A $\beta$  interaction contributes to every stage of the A $\beta$  pathogenesis in AD, including production, clearance, accumulation, aggregation, and toxicity, it is rational to hypothesize that interfering in the HS-A $\beta$  interaction may have multiple beneficial effects.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by the Health Department of the Basque Country [grant 2014111060 to IFV]; the Government of the Principado de Asturias (Spain) for consolidated research groups [grant FC-15-GRUPIN14-141 to BG]; and the Fundación de Investigación Oftalmológica through the Fundación Cristina Masaveu Peterson [Instituto Universitario Fernández-Vega; to BG, JM, LQ].

Authors' disclosures available online (<http://j-alz.com/manuscript-disclosures/16-1298r1>).

## REFERENCES

- [1] Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H (2006) Alzheimer's disease. *Lancet* **368**, 387-403.
- [2] Sarkar A, Irwin M, Singh A, Riccetti M (2016) Alzheimer's disease: The silver tsunami of the 21(st) century. *Neural Regen Res* **11**, 693-697.
- [3] Hardy J (2009) The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: A critical reappraisal. *J Neurochem* **110**, 1129-1134.
- [4] Selkoe DJ, Hardy J (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* **8**, 595-608.
- [5] van Horsen J, Wesseling P, van den Heuvel LP, de Waal RM, Verbeek MM (2003) Heparan sulphate proteoglycans in Alzheimer's disease and amyloid-related disorders. *Lancet Neurol* **2**, 482-492.
- [6] Zhang GL, Zhang X, Wang XM, Li JP (2014) Towards understanding the roles of heparan sulfate proteoglycans in Alzheimer's disease. *Biomed Res Int* **2014**, 516028.
- [7] van Horsen J, Kleinnijenhuis J, Maass CN, Rensink AA, Otte-Holler I, David G, van den Heuvel LP, Wesseling P, de Waal RM, Verbeek MM (2002) Accumulation of heparan sulfate proteoglycans in cerebellar senile plaques. *Neurobiol Aging* **23**, 537-545.
- [8] Cui H, Freeman C, Jacobson GA, Small DH (2013) Proteoglycans in the central nervous system: Role in development, neural repair, and Alzheimer's disease. *IUBMB Life* **65**, 108-120.
- [9] Vlodayvsky I, Goldshmidt O, Zcharia E, Atzmon R, Rangini-Guatta Z, Elkin M, Peretz T, Friedmann Y (2002) Mammalian heparanase: Involvement in cancer metastasis, angiogenesis and normal development. *Semin Cancer Biol* **12**, 121-129.
- [10] Nasser NJ (2008) Heparanase involvement in physiology and disease. *Cell Mol Life Sci* **65**, 1706-1715.
- [11] Vlodayvsky I, Iozzo RV, Sanderson RD (2013) Heparanase: Multiple functions in inflammation, diabetes and atherosclerosis. *Matrix Biol* **32**, 220-222.
- [12] Fernandez-Vega I, Garcia O, Crespo A, Castanon S, Menendez P, Astudillo A, Quiros LM (2013) Specific genes involved in synthesis and editing of heparan sulfate proteoglycans show altered expression patterns in breast cancer. *BMC Cancer* **13**, 24.
- [13] Fernandez-Vega I, Garcia-Suarez O, Garcia B, Crespo A, Astudillo A, Quiros LM (2015) Heparan sulfate proteoglycans undergo differential expression alterations in right sided colorectal cancer, depending on their metastatic character. *BMC Cancer* **15**, 742.



- [14] García B, García-Suárez O, Fernández-Vega I, Vallina A, Astudillo A, Quirós LM (2016) Heparanase and heparanase 2 display differently deregulation in neuroendocrine tumors, depending on their differentiation grade. *Histol Histopathol* **31**, 73-81.
- [15] García B, Fernández-Vega I, García-Suárez O, Castañón S, Quirós LM (2014) The role of heparan sulfate proteoglycans in bacterial infections. *J Med Microbiol Diagn* **3**, 157-164.
- [16] Fernández-Vega I, García-Suárez GB, Castañón O, Quirós S, LM (2014) Alterations of heparan sulfate proteoglycans in cancer. *J Glycobiol* **3**, 109-114.
- [17] García-Suárez O, Fernández-Vega I, Quirós LM (2013) Multiple alterations of heparan sulphate in cancer. *OA Cancer* **1**, 1.
- [18] Jendresen CB, Cui H, Zhang X, Vlodavsky I, Nilsson LN, Li JP (2015) Overexpression of heparanase lowers the amyloid burden in amyloid-beta precursor protein transgenic mice. *J Biol Chem* **290**, 5053-5064.
- [19] Arvatz G, Barash U, Nativ O, Ilan N, Vlodavsky I (2010) Post-transcriptional regulation of heparanase gene expression by a 3' AU-rich element. *FASEB J* **24**, 4969-4976.
- [20] Levy-Adam F, Feld S, Cohen-Kaplan V, Shteingauz A, Gross M, Arvatz G, Naroditsky I, Ilan N, Doweck I, Vlodavsky I (2010) Heparanase 2 interacts with heparan sulfate with high affinity and inhibits heparanase activity. *J Biol Chem* **285**, 28010-28019.
- [21] Braak H, Braak E (1991) Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* **82**, 239-259.
- [22] Bame KJ, Danda J, Hassall A, Tumova S (1997) Abeta(1-40) prevents heparanase-catalyzed degradation of heparan sulfate glycosaminoglycans and proteoglycans *in vitro*. A role for heparan sulfate proteoglycan turnover in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* **272**, 17005-17011.
- [23] Leveugle B, Scanameo A, Ding W, Fillit H (1994) Binding of heparan sulfate glycosaminoglycan to beta-amyloid peptide: Inhibition by potentially therapeutic polysulfated compounds. *Neuroreport* **5**, 1389-1392.
- [24] O'Callaghan P, Sandwall E, Li JP, Yu H, Ravid R, Guan ZZ, van Kuppevelt TH, Nilsson LN, Ingelsson M, Hyman BT, Kalimo H, Lindahl U, Lannfelt L, Zhang X (2008) Heparan sulfate accumulation with Abeta deposits in Alzheimer's disease and Tg2576 mice is contributed by glial cells. *Brain Pathol* **18**, 548-561.
- [25] Gupta-Bansal R, Frederickson RC, Brunden KR (1995) Proteoglycan-mediated inhibition of A beta proteolysis. A potential cause of senile plaque accumulation. *J Biol Chem* **270**, 18666-18671.
- [26] Moretti M, Sinnappah-Kang ND, Toller M, Curcio F, Marchetti D (2006) HPSE-1 expression and functionality in differentiating neural cells. *J Neurosci Res* **83**, 694-701.
- [27] Wischik CM, Edwards PC, Lai RY, Roth M, Harrington CR (1996) Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11213-11218.
- [28] Sereno L, Coma M, Rodriguez M, Sanchez-Ferrer P, Sanchez MB, Gich I, Agullo JM, Perez M, Avila J, Guardia-Laguarta C, Clarimon J, Lleo A, Gomez-Isla T (2009) A novel GSK-3beta inhibitor reduces Alzheimer's pathology and rescues neuronal loss *in vivo*. *Neurobiol Dis* **35**, 359-367.
- [29] Lambracht-Washington D, Rosenberg RN (2013) Advances in the development of vaccines for Alzheimer's disease. *Discov Med* **15**, 319-326.
- [30] Winblad B, Andreasen N, Minthon L, Floesser A, Imbert G, Dumortier T, Maguire RP, Blennow K, Lundmark J, Staufenberg M, Orgogozo JM, Graf A (2012) Safety, tolerability, and antibody response of active Abeta immunotherapy with CAD106 in patients with Alzheimer's disease: Randomised, double-blind, placebo-controlled, first-in-human study. *Lancet Neurol* **11**, 597-604.
- [31] Sperling RA, Jack CR Jr, Black SE, Frosch MP, Greenberg SM, Hyman BT, Scheltens P, Carrillo MC, Thies W, Bednar MM, Black RS, Brashear HR, Grundman M, Siemers ER, Feldman HH, Schindler RJ (2011) Amyloid-related imaging abnormalities in amyloid-modifying therapeutic trials: Recommendations from the Alzheimer's Association Research Roundtable Workgroup. *Alzheimers Dement* **7**, 367-385.
- [32] Vellas B, Andrieu S, Sampaio C, Wilcock G, European Task Force g (2007) Disease-modifying trials in Alzheimer's disease: A European task force consensus. *Lancet Neurol* **6**, 56-62.
- [33] Schneider LS, Mangialasche F, Andreasen N, Feldman H, Giacobini E, Jones R, Mantua V, Mecocci P, Pani L, Winblad B, Kivipelto M (2014) Clinical trials and late-stage drug development for Alzheimer's disease: An appraisal from 1984 to 2014. *J Intern Med* **275**, 251-283.
- [34] Mangialasche F, Solomon A, Winblad B, Mecocci P, Kivipelto M (2010) Alzheimer's disease: Clinical trials and drug development. *Lancet Neurol* **9**, 702-716.
- [35] Aprahamian I, Stella F, Forlenza OV (2013) New treatment strategies for Alzheimer's disease: Is there a hope? *Indian J Med Res* **138**, 449-460.
- [36] Zhang X, Wang B, Li JP (2014) Implications of heparan sulfate and heparanase in neuroinflammation. *Matrix Biol* **35**, 174-181.
- [37] Brundin P, Melki R, Kopito R (2010) Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 301-307.
- [38] Holmes BB, DeVos SL, Kfoury N, Li M, Jacks R, Yanamandra K, Ouidja MO, Brodsky FM, Marasa J, Bagchi DP, Kotzbauer PT, Miller TM, Papy-Garcia D, Diamond MI (2013) Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E3138-E3147.
- [39] Zhang X, Wang B, O'Callaghan P, Hjerstrom E, Jia J, Gong F, Zcharia E, Nilsson LN, Lannfelt L, Vlodavsky I, Lindahl U, Li JP (2012) Heparanase overexpression impairs inflammatory response and macrophage-mediated clearance of amyloid-beta in murine brain. *Acta Neuropathol* **124**, 465-478.
- [40] Reilly CE (2000) Crucial role of heparan sulfate proteoglycan (agrin) in beta-amyloid formation in Alzheimer's disease. *J Neurol* **247**, 663-664.
- [41] Shimizu H, Ghazizadeh M, Sato S, Oguro T, Kawanami O (2009) Interaction between beta-amyloid protein and heparan sulfate proteoglycans from the cerebral capillary basement membrane in Alzheimer's disease. *J Clin Neurosci* **16**, 277-282.
- [42] Snow AD, Sekiguchi R, Noehlin D, Fraser P, Kimata K, Mizutani A, Arai M, Schreier WA, Morgan DG (1994) An important role of heparan sulfate proteoglycan (Perlecan) in a model system for the deposition and persistence of fibrillar A beta-amyloid in rat brain. *Neuron* **12**, 219-234.



## Anexo 2: Artículo publicado correspondiente al Capítulo II

*J Neuropathol Exp Neurol*  
Vol. 0, No. 0, 2020, pp. 1–10  
doi: 10.1093/jnen/nlaa016

OXFORD

ORIGINAL ARTICLE

## Heparan Sulfate Proteoglycans Undergo Differential Expression Alterations in Alzheimer Disease Brains

Laura Lorente-Gea, MD, Beatriz García, PhD, Carla Martín, PhD, Helena Ordiales, MSc, Olivia García-Suárez, PhD, Kelvin M. Piña-Batista, MD, PhD, Jesús Merayo-Llaves, MD, PhD, Luís M. Quirós, PhD, and Iván Fernández-Vega, MD, PhD

### Abstract

Previous studies have reported that heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) promote amyloid-beta peptide and tau fibrillization in Alzheimer disease (AD) and provide resistance against proteolytic breakdown. We compared the expression levels of 17 HSPG core proteins in 18 AD cases and 6 controls. RT-PCR was used to analyze transcription levels. Immunohistochemistry was performed to localize HSPGs in the brain tissue. We detected expression of all HSPG genes investigated. *SDC1*, *GPC3*, and *CD44v3* showed the lowest levels of expression, while *SDC3* and *GPC1* showed the highest. Remarkably, *SDC4* and *SRGN* were overexpressed in most of the areas analyzed. Immunohistochemistry revealed the presence of both *SDC4* and *SRGN* mostly associated with tau and amyloid- $\beta$  pathology throughout the AD brains. In conclusion, in view of the involvement of HSPGs in AD pathology, especially *SDC4* and *SRGN*, there would seem to be a relationship between the regulation of core protein expression and the pathological features suggesting HSPGs are potential inducers of the disease.

**Key Words:** Alzheimer disease, Amyloid, Amyloid-beta ( $A\beta$ ), Glycosaminoglycan, Glypicans, Heparan sulfate, Syndecans.

### INTRODUCTION

Alzheimer disease (AD) is the most common neurodegenerative disease. It is the main cause of dementia in older people worldwide and, therefore, one of the greatest health-care challenges of the 21st century. AD is characterized by irreversible pathologic alterations that start during midlife, although clinical manifestations are not usually evident until the age of 65 years and older. AD is characterized by progressive cognitive dysfunction and loss of memory. The disease inevitably leads to death, and patients frequently die of complications associated with chronic illness (1, 2). AD is principally produced by 2 types of abnormal protein deposition in the brain: the extracellular accumulation of cytotoxic amyloid- $\beta$  peptide ( $A\beta$ ) in senile plaques (SPs), and the intracellular accumulation of hyper-phosphorylated forms of a microtubule-associated protein, tau, in neurofibrillary tangles (NFTs) (3, 4). To date, little is known of how these 2 types of abnormal protein deposition in the human brain trigger the onset of neurodegeneration. The most common Alzheimer-related subtype of SP, neuritic plaques (NPs), contains accessory molecules such as heparan sulfate (HS), serum amyloid-P component, apolipoprotein E, and  $\alpha$ 1-antichymotrypsin. Previous work has suggested that heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) may promote  $A\beta$  or tau fibrillization and provide resistance against proteolytic breakdown (5). It has, therefore, been demonstrated that the HS- $A\beta$  interaction contributes to every stage of pathogenesis in AD, including the production, clearance, accumulation, aggregation, and toxicity of  $A$  (6–8). Moreover, work over the last decade indicates that tau pathology can propagate between cells in a prion-like manner that is mediated by HSPGs (9).

The HSPG family constitutes a heterogeneous group of complex biological macromolecules where HS glycosaminoglycan (GAG) chains are covalently attached to a core protein (10). HSPGs are polyanionic and have unusual hydrodynamic volumes because of the presence of long HS chains, sulfate groups, and uronic acids. Thus HSPGs are among the most highly negatively charged biopolymers in nature, and variation in their sulfatation, as well as the number and length of the chains involved, gives rise to very different biological properties (11). The cell-surface HSPGs are 4 membrane-spanning syndecans (*SDC1-4*) and 6 lipid-anchored glypicans (*GPC1-6*). There are 3 secreted extracellular matrix (ECM)

From the Department of Pathology, Hospital Universitario de Araba – Txagorritxu, Spain (LL-G, IF-V); Department of Functional Biology, University of Oviedo, Oviedo, Spain (BG, CM, HO, LMQ); Instituto Universitario Fernández-Vega, Oviedo, Spain (BG, CM, JM-L, LMQ, IF-V); Department of Neurosurgery, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain (KMP-B); Department of Pathology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo (IF-V) Biobank of Principality of Asturias, Health Research Institute of the Principality of Asturias, Oviedo, Spain (IF-V); and Biobanco Vasco para la Investigación (O+eHun), Brain Bank, Hospital Universitario Araba, Spain (IF-V).

Laura Lorente-Gea and Beatriz García contributed equally to this work.

Send correspondence to: Iván Fernández-Vega, MD, PhD, Department of Pathology, Hospital Universitario Central de Asturias, Avenida de Roma s/n, E-33011, Oviedo, Spain; E-mail: ivan\_fernandez\_vega@hotmail.com  
This study was funded by the Health Department of the Basque Country [201411060 to I.F.-V.]; the Government of the Principado de Asturias (Spain) for consolidated research groups [FC-15-GRUPIN14-141 to B.G.]; and the Fundación de Investigación Oftalmológica through the Fundación Cristina Masaveu Peterson [Instituto Universitario Fernández-Vega; to B. G., J.M.-L., L.M.Q.]

The authors have no duality or conflicts of interest to declare.

TABLE. Patient Characteristics and Statistics

	Patients				
	Total (n = 24)	Control (n = 6)	Mild AD (n = 6)	Moderate AD (n = 6)	Severe AD (n = 6)
Sex (%)					
Male	7 (30)	3 (50)	1 (17)	2 (33)	1 (17)
Female	17 (70)	3 (50)	5 (83)	4 (67)	5 (83)
Age (mean ± SD)	84 ± 11	79 ± 16	89 ± 5	89 ± 10	80 ± 12
Brain weight (grams)	1128 ± 111	1148 ± 57	1177 ± 26	1122 ± 31	967 ± 19
Postmortem interval (hours)	17 ± 5	18 ± 5	19 ± 5	15 ± 5	20 ± 4
MMSE	—	—	22 ± 3	14 ± 4	7 ± 3

AD, Alzheimer disease; Mild AD, I and II Braak and Braak classification; Moderate AD, III and IV Braak and Braak classification; Severe AD, V and VI Braak and Braak classification; MMSE, Mini-Mental State Examination.

HSPGs: agrin (AGRN), collagen type XVIII (COL18A1), and perlecan (PRCAN), and 1 secretory vesicle proteoglycan, serglycin (SRGN). Furthermore, because the stoichiometry of GAG chain substitution can vary depending on source and growth conditions; there are a number of “part-time” proteoglycans exist, which may or may not have a GAG chain, such as CD44v3, neuropilin (NRP1), and betaglycan (TFGBR3) (10). The functions of HSPGs ultimately rely on the fine structure of the chains. The binding sites for a variety of ligands, such as cytokines, chemokines, growth factors, enzymes, and ECM, are defined by specific sets of variably modified disaccharides. These networks of complex interactions at the molecular level mean that HSPGs participate actively in the control of many normal physiological functions (12). Because of these interactions, HS is also involved in many pathologies, including inflammation, amyloid diseases, infectious diseases, and cancer (13–18).

In a recent work performed in our laboratory, we observed the overexpression of heparanase (HPSE) and heparanase 2 (HPSE2) in affected areas of AD brains; the amount of expression was closely correlated with Braak and Braak stage (19). While HPSE cleaves specific linkages in the structure of HS, yielding biologically active fragments, HPSE2 is an HPSE homolog that lacks HS-degrading activity, although it is able to interact with HS with high affinity (20). As a result of this difference, we have previously suggested that HPSE2 could act as a natural competitive inhibitor of HPSE due to its ability to associate with HPSE and its apparent ability to modulate its enzymatic activity and signaling properties (19).

Previous studies have found variable expression of 4 distinct classes of PGs and GAGs associated with NFTs, NPs, and cerebral amyloid angiopathy (CAA). Keratan sulfate proteoglycans, dermatan sulfate proteoglycans, and chondroitin sulfate are found in the periphery of SPs only, whereas HSPGs are associated with all 3 types of AD lesions (8, 21, 22). This suggests that this latter class has an important role in the formation and persistence of lesions (5). In this study, we investigated the expression of HSPGs, the natural substrate of heparanase at different stages of AD using human brain tissue from different brain areas, primarily following the Braak and Braak (23) classification.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

The following materials were purchased from the manufacturers indicated: RNeasy Kit and RNase-Free DNase (Qiagen, Hilden, Germany); High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit and PowerSYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA); GenElute PCR clean-up kit and 3-3' diaminobenzidine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); EnVision FLEX/HRP and high pH EnVision FLEX target retrieval solution (Dako, Glostrup, Denmark). All other chemicals were obtained from commercial sources and were of analytical grade.

The following antibodies were used in this study: mouse monoclonal anti-syndecan-1 (CD138; Clone MI15, Dako), anti-syndecan-4 (H-140; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-glypican-4 (3E2C1; ThermoFisher, UK), anti-glypican-6 (ab170523; Abcam, Cambridge, UK), anti-perlecan (H-300; Santa Cruz Biotechnology), anti-neuropilin (ab81321; RabMab, Abcam), anti-betaglycan (3E2; sc-100857, Santa Cruz Biotechnology), and anti-serglycin (ab211515; Abcam, UK). All primary antibodies were properly validated as being specific to their respective proteins. Ready to use labeled polymer-HRP (Dako) was used as secondary antibody.

### Patients and Samples

Samples from 18 patients with AD and 6 controls (patients without cognitive impairment and normal neuropathology, diagnosed as Braak and Braak stage 0), collected at the Brain Biobank of the Hospital Universitario de Araba between February 2013 and October 2015 following approval from the same institute's Review Board on Ethical Procedures, and after informed consent for the research had been received from each patient or their relatives. Cognitive impairment levels measured by Mini-Mental State Examination were recorded for all cases. The diagnosis of AD was based on morphological and immunohistochemical criteria according to the most up-to-date grading classification (NIA-RI Consensus 1997). The characteristics of the patients studied (age, gender) and the timing of the postmortem of each sample were recorded (Table). Samples from the different brain areas were



collected following the Braak and Braak (23) classification. In addition, samples from basal ganglia (pallidum) and the cerebellum were used as an internal control, since they are assumed to not be altered in AD.

### Total RNA Isolation and cDNA Synthesis

To obtain the RNA, tissue fragments of between 20 and 30 mg in weight were homogenized using a polytron PT 2100 (Kinematica, Inc., Bohemia, NY), and RNA was isolated using the RNeasy kit, following the manufacturer's specifications. To ensure the removal of residual contaminating DNA, samples were subjected to treatment with RNase-free DNase during the purification process itself. The concentration of RNA obtained was determined spectrophotometrically by measuring absorbance using a Picodrop Microliter UV/Vis spectrophotometer (Picodrop Limited, Hinxton, UK). The samples were divided into aliquots of 10  $\mu$ L and either used for reverse transcription reactions or stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for future use.

cDNA synthesis was carried out using the High-Capacity cDNA Transcription Kit following the manufacturer's guidelines. The reactions were performed using an iCycler IQ thermocycler (Bio-Rad, Hercules, CA), using 2  $\mu$ g of RNA as starting material. The reaction products were cleaned using the PCR Clean-Up GenElute kit following the manufacturer's instructions. Finally, the aliquots containing the cDNA were diluted 1:20 with water and used for qRT-PCR assays or stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

### qRT-PCR Reactions

In all cases, specific oligonucleotides were designed on different exons or exon junctions, using the program Primer 3 ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)). The size of the amplicon in all cases was between 70 and 150 base pairs, and wherever possible  $T_m$  was above  $77^{\circ}\text{C}$ . The theoretical  $T_m$  for each amplicon was determined using the program Biomath (<http://www.promega.com/biomath/calc11>).

The primer sequences were: *SDC1* (Gene ID 6382) forward 5'-CTCAGGTGCAGGTGCTTTG-3', reverse 5'-CTGC GTGTCCTTCCAAGTG-3'; *SDC2* (Gene ID 6383) forward 5'-GATGACGATGACTACGCTTCTG-3', reverse 5'-TGGA AGTGGTCGAGATGTTG-3'; *SDC3* (Gene ID 9672) forward 5'-CTCCTTTCCCGATGATGAAC-3', reverse 5'-CGACTC CTGCTCGAAGTAGC-3'; *SDC4* (Gene ID 6385) forward 5'-GGCAGGAATCTGATGACTTTG-3', reverse 5'-TCTAGAG GCACCAAGGGATG-3'; *GPC1* (Gene ID 2817) forward 5'-CATCGGGTGTGGAGAGTG-3', reverse 5'-TGAGCGTGT CCCTGTTGTC-3'; *GPC2* (Gene ID 221914) forward 5'-CTGGGACACGACCTGGAC-3', reverse 5'-GCCATCCAG TCATCGCATAAC-3'; *GPC3* (Gene ID 2719) forward 5'-CTGCTTCAGTCTGCAAGTATGG-3', reverse 5'-GTGGAG TCAGGCTTGGGTAG-3'; *GPC4* (Gene ID 2239) forward 5'-AGTGTGGTCAGCGAACAGTG-3', reverse 5'-CAAACA TATCATTGAGGATTTCTC-3'; *GPC5* (Gene ID) forward 5'-GCCGCCCTGTAAGAACAC-3', reverse 5'-TCATTCCA TGCTTCTCTTTC-3'; *GPC6* (Gene ID 10082) forward

5'-CCAGGCATAAGAAATTTGACG-3', reverse 5'-CATG TACAGCATGCCATAGTTC-3'; *AGRN* (Gene ID 375790) forward 5'-ACTGTGTCTGCCCCGATGC-3', reverse 5'-GACTCGTTGCCGTATGTG-3'; *COL18A1* (Gene ID 80781) forward 5'-GTACAAGGGAGAGATTGGCTTTC-3', reverse 5'-TTTCTCTCCTTTCATCCGTTTC-3'; *PRCAN* (Gene ID 3339) forward 5'-TGGACACATTCGTACCTTTCT G-3', reverse 5'-CACTGCCAGGTCGTCTC-3'; *CD44v3* (Gene ID 960) forward 5'-TGGGAGCCAAATGAA GAAAATGAA-3', reverse 5'-TGGTTGAAATGGTGCTGG AGA-3'; *NRP1* (Gene ID 8829) forward 5'-CAACGGGGAA GACTGGATCAC-3', reverse 5'-AGTTGCAGGCTTGATTC GGA-3'; *SRGN* (Gene ID 5552) forward 5'-TCCTGGTT CTGGAATCCTCA-3', reverse 5'-TCTTGTGGATTACCC TGGAA-3'; *TGFBR3* (Gene ID 7049) forward 5'-AGTGTGA GCTGACGCTGTGTA-3', reverse 5'-GGGCTTAGTGAAC GTCTTCTTATTC-3'.

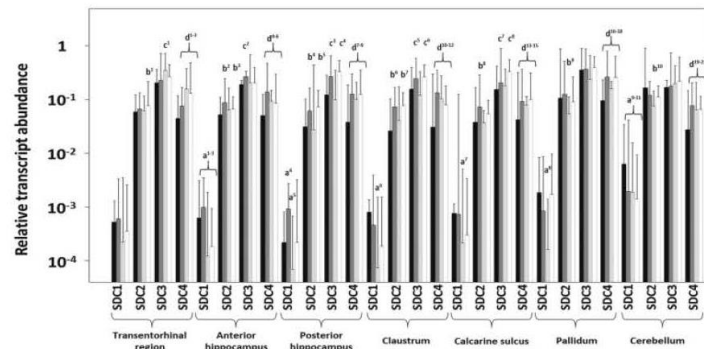
A minimum of 3 repetitions of each of the qRT-PCR reactions were carried out in a final volume of 10  $\mu$ L, in accordance with the manufacturer's specifications, using 1  $\mu$ L of the cDNA dilution as template, with 2  $\mu$ L of primer pair mix (200 nM final concentration) and 5  $\mu$ L of SYBR Green mix, assembled in 96-well microtiter plates. The plates were sealed with optical film and centrifuged at 2500 rpm for 5 minutes before being placed in a Real-Time ABI Prism Detection System device (Applied Biosystems) with the following cycle conditions:  $95^{\circ}\text{C}$  for 10 minutes, 40 cycles of  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 seconds followed by  $60^{\circ}\text{C}$  for 60 seconds. Following the thermal cycle and data collection steps, amplifier products were analyzed using a melt curve program ( $95^{\circ}\text{C}$  for 1 minute,  $55^{\circ}\text{C}$  for 1 minute, then increments of  $0.5^{\circ}\text{C}$  per cycle for 80 cycles of 10 seconds each). For each amplification the presence of a single peak with a  $T_m$  corresponding to the theoretical value previously calculated was verified. Actin was included on each plate as a control gene to compare run variation and to normalize individual gene expression.

### Data Analysis

To calculate the efficiency of amplification for each gene we used the program LinRegPCR (<http://www.genequantification.de/download.html>), taking the best correlation coefficient (after considering a minimum of 3 points within the window of linearity) and establishing the average of all positive amplifications. The expression values of the genes of interest were calculated as  $(1 + \text{efficiency})^{-\Delta\text{Ct}}$  (relative to actin as the housekeeping gene).

### Immunohistochemistry

Tissue sections were dewaxed and rehydrated sections were rinsed in phosphate buffered saline containing 1% Tween-20. Sections were heated in high pH Envision FLEX target retrieval solution at  $65^{\circ}\text{C}$  for 20 minutes and then incubated for 20 minutes at room temperature in the same solution. Endogenous peroxidase activity (3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and nonspecific binding (33% fetal calf serum) were blocked and the sections were incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with primary antibodies using the following experimental concentrations: SDC1 at 1:100



**FIGURE 1.** Differential transcription of syndecans (1–4) in cases of Alzheimer disease (AD). Relative abundance for controls (black bars), mild AD (dark gray bars), moderate AD (light gray bars), and severe AD (white bars) is plotted on a log scale for each gene assayed and the spreads represent standard deviations (upper limit shown). Genes and zones that display significant differences in their transcription levels are highlighted.  $a^1$ ,  $p=0.013871$ ;  $a^2$ ,  $p=0.004970$ ;  $a^3$ ,  $p=0.017621$ ;  $a^4$ ,  $p=0.000196$ ;  $a^5$ ,  $p=0.000386$ ;  $a^6$ ,  $p=0.000738$ ;  $a^7$ ,  $p=0.038580$ ;  $a^8$ ,  $p=0.000233$ ;  $a^9$ ,  $p=0.042859$ ;  $a^{10}$ ,  $p=0.038580$ ;  $a^{11}$ ,  $p=0.002853$ ;  $b^1$ ,  $p=0.003779$ ;  $b^2$ ,  $p=0.006491$ ;  $b^3$ ,  $p=0.003090$ ;  $b^4$ ,  $p=0.000536$ ;  $b^5$ ,  $p=0.001370$ ;  $b^6$ ,  $p=0.000196$ ;  $b^7$ ,  $p=0.000655$ ;  $b^8$ ,  $p=0.037990$ ;  $b^9$ ,  $p=0.012275$ ;  $b^{10}$ ,  $p=0.000536$ ;  $c^1$ ,  $p=0.001177$ ;  $c^2$ ,  $p=0.000233$ ;  $c^3$ ,  $p=0.000196$ ;  $c^4$ ,  $p=0.000536$ ;  $c^5$ ,  $p=0.047531$ ;  $c^6$ ,  $p=0.003286$ ;  $c^7$ ,  $p=0.003143$ ;  $c^8$ ,  $p=0.001177$ ;  $d^1$ ,  $p=0.015648$ ;  $d^2$ ,  $p=0.000196$ ;  $d^3$ ,  $p=0.000276$ ;  $d^4$ ,  $p=0.001002$ ;  $d^5$ ,  $p=0.000713$ ;  $d^6$ ,  $p=0.019118$ ;  $d^7$ ,  $p=0.000536$ ;  $d^8$ ,  $p=0.005685$ ;  $d^9$ ,  $p=0.000629$ ;  $d^{10}$ ,  $p=0.001184$ ;  $d^{11}$ ,  $p=0.003600$ ;  $d^{12}$ ,  $p=0.002264$ ;  $d^{13}$ ,  $p=0.003772$ ;  $d^{14}$ ,  $p=0.015648$ ;  $d^{15}$ ,  $p=0.005685$ ;  $d^{16}$ ,  $p=0.000196$ ;  $d^{17}$ ,  $p=0.001847$ ;  $d^{18}$ ,  $p=0.000327$ ;  $d^{19}$ ,  $p=0.000864$ ;  $d^{20}$ ,  $p=0.000738$ ;  $d^{21}$ ,  $p=0.022232$ . Values on the y-axis are represented on a logarithmic scale.

dilution; SDC4 at 1:100 dilution; GPC4 at 1:100 dilution; GPC6 at 1:50 dilution; NRP1 at 1:50 dilution; and SRGN at 1:200 dilution. Ready to use labeled polymer-HRP (Dako, Spain) was used as secondary antibody, and 3-3' diaminobenzidine was employed as a chromogen. Finally, samples were counterstained with hematoxylin, dehydrated, and mounted in Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). The sections were studied and photographed under a light microscope (Nikon—Eclipse 80i).

### Immunohistochemistry Assessment

Immunohistochemistry was performed to demonstrate the presence and location of proteins in tissue sections. Results were evaluated by 2 independent experts (and in the case of disagreement, a third) comparing AD cases and controls. Immunohistochemistry images were taken from the external pyramidal layer of the neocortex from the temporal lobe to better distinguish neurons from glial cells.

### Statistical Analysis

A nonparametric Wilcoxon test to compare controls and AD cases for every gene was used for the statistical analysis of the experiments with the level of significance set at  $p < 0.05$ . All analyses were performed using the Statistics for Windows program (Statsoft, Inc., Tulsa, OK).

## RESULTS

Initially, we used qRT-PCR to perform a quantitative analysis of the differential transcription of the coding genes using samples of 7 different tissue types from various encephalic areas. Mild AD cases (Braak and Braak, I and II);

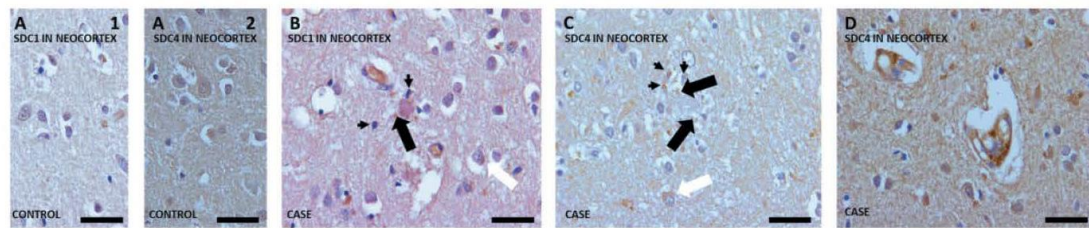
moderate AD cases (Braak and Braak, III and IV); and severe AD cases (Braak and Braak, V and VI) were analyzed and compared to healthy controls (Braak and Braak, 0). The samples corresponded to patients of both sexes aged between 52 and 103 years. Determination of the presence and localization of syndecan-1, syndecan-4, glypican-4, glypican-6, perlecan, neuropilin, betaglycan, and serglycin from hippocampus and neocortex of AD brains was also performed by immunohistochemistry. Findings were strongly related to either tau and/or amyloid- $\beta$  pathology, mostly colocalizing with NPs, CAA, or NFTs in all the regions studied. Results are shown in cerebral neocortex from the temporal lobe.

### Differential Expression of Syndecans

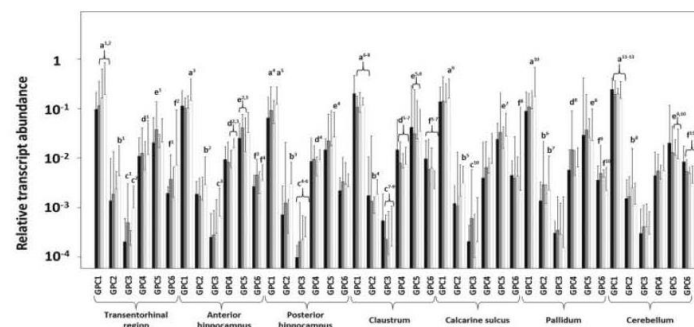
Analysis of the transcription levels of syndecan genes by means of qRT-PCR detected the expression of all 4 isoforms; however, levels varied widely depending on the particular species examined (Fig. 1) and transcription levels of *SDC1* in both control and AD brains were between 1 and 2 orders of magnitude lower than the rest.

There were a number of statistically significant differences in levels between AD stages as defined by Braak and Braak classification. *SDC4* was consistently overexpressed in all brain areas studied, that is at all stages of AD. Transcription levels of *SDC3* were overexpressed mostly in mild and severe stages. *SDC2* behaved similarly to *SDC3* in most brain areas with the exceptions of the pallidum and cerebellum, where *SDC2* was significantly underexpressed in moderate cases. *SDC1* transcription levels tended to be underexpressed but the difference was only statistically significant mainly in moderate cases of AD.





**FIGURE 2.** Immunohistochemical staining of syndecans 1 and 4 in the cerebral neocortex (temporal lobe) in cases of Alzheimer disease. **(A)** No relevant expression of syndecan-1 (A1) or syndecan-4 (A2) in neurons and glial cells in control brain samples. **(B)** Dispersed deposits of syndecan-1 around the dense cores of neuritic plaques (NPs) (black arrow). Presence of syndecan-1 in some neurons in the cortex with neurofibrillary tangles (NFTs) (white arrow) compared to controls. Moderate increase of syndecan-1 in glial cells surrounding NPs (arrowheads). **(C)** Weak to moderate increase of syndecan-4 in the neuropil and in degenerated neurons in the cortex with NFTs (white arrow). NPs show some deposits of syndecan-4 on the periphery of the dense core (black arrows). Moderate increase of syndecan-4 in glial cells surrounding NPs (arrowheads). **(D)** Syndecan-4 in walls of arterioles in cerebral amyloid angiopathy. Bar in A–D = 20  $\mu$ m.



**FIGURE 3.** Differential transcription of glypicans (1–6) in cases of Alzheimer disease (AD). Relative abundance for controls (black bars), mild AD (dark gray bars), moderate AD (light gray bars), and severe AD (white bars) is plotted on a log scale for each gene assayed and the spreads represent standard deviations (upper limit shown). Genes and zones that display significant differences in their transcription levels are highlighted.  $a^1$ ,  $p=0.002472$ ;  $a^2$ ,  $p=0.000455$ ;  $a^3$ ,  $p=0.047531$ ;  $a^4$ ,  $p=0.042859$ ;  $a^5$ ,  $p=0.003779$ ;  $a^6$ ,  $p=0.000196$ ;  $a^7$ ,  $p=0.007399$ ;  $a^8$ ,  $p=0.001847$ ;  $a^9$ ,  $p=0.042859$ ;  $a^{10}$ ,  $p=0.005685$ ;  $a^{11}$ ,  $p=0.045672$ ;  $a^{12}$ ,  $p=0.022232$ ;  $a^{13}$ ,  $p=0.034671$ ;  $b^1$ ,  $p=0.000536$ ;  $b^2$ ,  $p=0.008419$ ;  $b^3$ ,  $p=0.001009$ ;  $b^4$ ,  $p=0.012275$ ;  $b^5$ ,  $p=0.000276$ ;  $b^6$ ,  $p=0.013871$ ;  $b^7$ ,  $p=0.003286$ ;  $b^8$ ,  $p=0.022232$ ;  $c^1$ ,  $p=0.001009$ ;  $c^2$ ,  $p=0.000196$ ;  $c^3$ ,  $p=0.000233$ ;  $c^4$ ,  $p=0.031105$ ;  $c^5$ ,  $p=0.022232$ ;  $c^6$ ,  $p=0.003779$ ;  $c^7$ ,  $p=0.000196$ ;  $c^8$ ,  $p=0.002472$ ;  $c^9$ ,  $p=0.002139$ ;  $c^{10}$ ,  $p=0.005685$ ;  $d^1$ ,  $p=0.006491$ ;  $d^2$ ,  $p=0.042859$ ;  $d^3$ ,  $p=0.000738$ ;  $d^4$ ,  $p=0.019810$ ;  $d^5$ ,  $p=0.009563$ ;  $d^6$ ,  $p=0.000629$ ;  $d^7$ ,  $p=0.009563$ ;  $d^8$ ,  $p=0.014773$ ;  $e^1$ ,  $p=0.000629$ ;  $e^2$ ,  $p=0.003286$ ;  $e^3$ ,  $p=0.027858$ ;  $e^4$ ,  $p=0.001847$ ;  $e^5$ ,  $p=0.012275$ ;  $e^6$ ,  $p=0.001847$ ;  $e^7$ ,  $p=0.006491$ ;  $e^8$ ,  $p=0.001177$ ;  $e^9$ ,  $p=0.001931$ ;  $e^{10}$ ,  $p=0.004337$ ;  $f^1$ ,  $p=0.001592$ ;  $f^2$ ,  $p=0.000196$ ;  $f^3$ ,  $p=0.000864$ ;  $f^4$ ,  $p=0.012275$ ;  $f^5$ ,  $p=0.002472$ ;  $f^6$ ,  $p=0.002853$ ;  $f^7$ ,  $p=0.000196$ ;  $f^8$ ,  $p=0.003779$ ;  $f^9$ ,  $p=0.031105$ ;  $f^{10}$ ,  $p=0.005685$ ;  $f^{11}$ ,  $p=0.015648$ ;  $f^{12}$ ,  $p=0.007399$ ;  $f^{13}$ ,  $p=0.000386$ . Values on the  $y$ -axis are represented on a logarithmic scale.

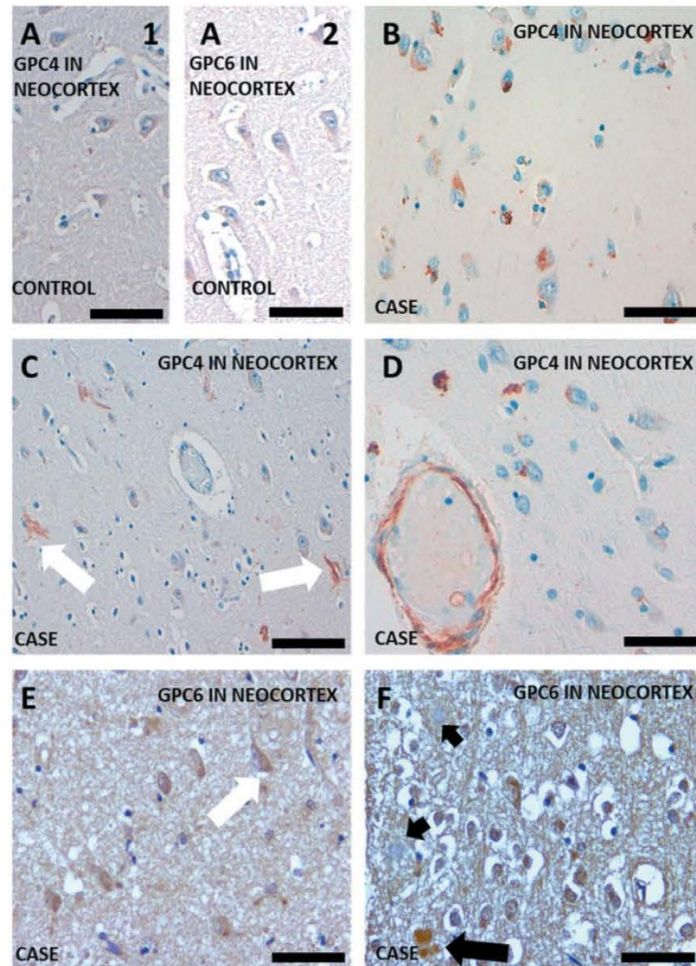
Comparing diseased and healthy tissue, immunohistochemistry showed the presence of dispersed deposits of SDC1 in some unfragmented cores of NPs and mostly weak immunorexpression in some neurons in cortex samples with NFTs. In addition, SDC4 showed weak to moderate immunorexpression in the neuropil and all 3 types of AD lesions including NPs, CAA (microvascular plaques), and NFTs (Fig. 2).

### Differential Expression of Glypicans

Levels of mRNA for all 6 different isoforms of glypican were detected by means of qRT-PCR (Fig. 3). Significant differences were found for glypican expression depending on

AD stage. Notably, all glypicans were significantly underexpressed in the claustrum, and *GPC1*, *GPC5*, and *GPC6* were also underexpressed in the cerebellum. Interestingly, *GPC1*, *GPC2*, and *GPC3* were overexpressed in limbic areas of the brain, most noticeably in severe AD stages. *GPC2* and *GPC4* showed fewer significant alterations in their transcription levels in AD than other family members.

A weak to moderate presence of *GPC4* immunorexpression was noted in some neurons in the cortex of AD cases in association with both neurofibrillary pretangles and tangles. We also noticed deposits of *GPC4* in the walls of CAA arterioles. In addition, we observed the diffuse weak immunorexpression of *GPC6* in the neuropil and its mostly moderate



**FIGURE 4.** Immunohistochemical staining of glypicans 4 and 6 in the cerebral neocortex (temporal lobe) in cases of Alzheimer disease. **(A)** No relevant expression of glypican-4 (A1) or glypican-6 (A2) in neurons and glial cells in control brain samples. **(B, C)** Weak to moderate increase of glypican-4 in some neurons in the cortex with neurofibrillary pretangles **(B)** and tangles (white arrow) compared to controls **(C)**. **(D)** Glypican-4 is deposited in walls of arterioles in cerebral amyloid angiopathy. **(E)** Weak increase of glypican-6 in some neurons in the cortex with neurofibrillary pretangles and tangles (white arrow). **(F)** Variable immunoreactivity of glypican-6 in neuritic plaques (NPs). Black arrow indicates strong deposits of glypican-6 in 1 NP. Arrowheads indicate 2 NPs without deposits of glypican-6. Scale bars: A, B = 20  $\mu$ m; C = 40  $\mu$ m; D–F = 20  $\mu$ m.

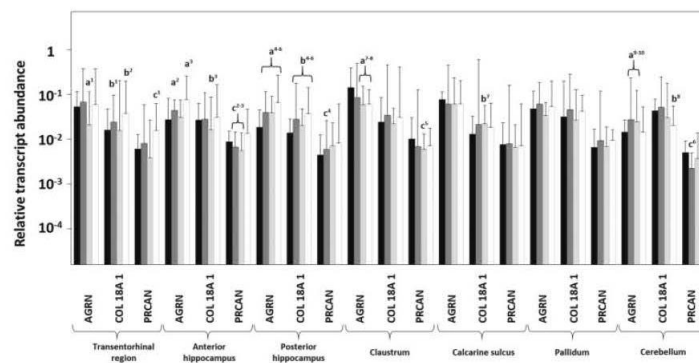
immunoreactivity in some neurons in the cortex with neurofibrillary pretangles and tangles. A variable immunoreactivity of GPC6 in NPs was also detected (Fig. 4).

#### Differential Expression of Agrin, Collagen XVIII, and Perlecan

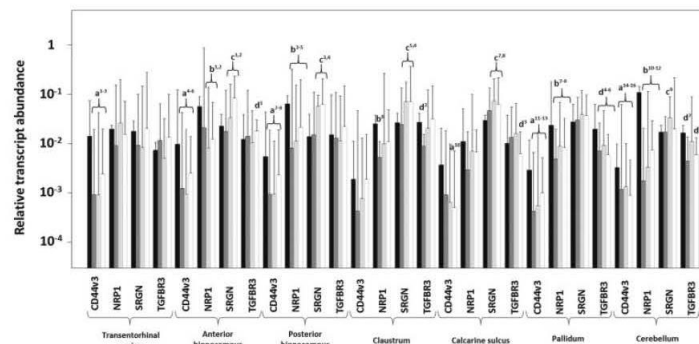
Examination of the transcription levels of ECM molecules by means of qRT-PCR identified varied levels of

expression for each of them (Fig. 5). In general, these genes were less altered than those encoding cell-surface HSPGs (Fig. 5). *COL18A1* was significantly upregulated in the transentorhinal region and hippocampus in severe cases of AD. As with the glypicans, most ECM HSPGs tended to be underexpressed in the claustrum and cerebellum. The immunohistochemical study of PRCAN showed no changes in AD cases when compared to healthy brain tissue (data not shown).





**FIGURE 5.** Differential transcription of agrin, collagen XVIII, and perlecan in cases of Alzheimer disease (AD). Relative abundance for controls (black bars), mild AD (dark gray bars), moderate AD (light gray bars), and severe AD (white bars) is plotted on a log scale for each gene assayed and the spreads represent standard deviations (upper limit shown). Genes and zones that display significant differences in their transcription levels are highlighted.  $a^1$ ,  $p=0.004970$ ;  $a^2$ ,  $p=0.002139$ ;  $a^3$ ,  $p=0.000276$ ;  $a^4$ ,  $p=0.000233$ ;  $a^5$ ,  $p=0.002139$ ;  $a^6$ ,  $p=0.001177$ ;  $a^7$ ,  $p=0.000713$ ;  $a^8$ ,  $p=0.000196$ ;  $a^9$ ,  $p=0.047625$ ;  $a^{10}$ ,  $p=0.006491$ ;  $b^1$ ,  $p=0.013871$ ;  $b^2$ ,  $p=0.004645$ ;  $b^3$ ,  $p=0.031105$ ;  $b^4$ ,  $p=0.001177$ ;  $b^5$ ,  $p=0.042859$ ;  $b^6$ ,  $p=0.004970$ ;  $b^7$ ,  $p=0.017621$ ;  $b^8$ ,  $p=0.000276$ ;  $c^1$ ,  $p=0.001177$ ;  $c^2$ ,  $p=0.010844$ ;  $c^3$ ,  $p=0.000327$ ;  $c^4$ ,  $p=0.001370$ ;  $c^5$ ,  $p=0.034671$ ;  $c^6$ ,  $p=0.001397$ . Values on the y-axis are represented on a logarithmic scale.



**FIGURE 6.** Differential transcription of CD44v3, neuropilin, serglycin, and TGFBR3 in cases of Alzheimer disease (AD). Relative abundance for controls (black bars), mild AD (dark gray bars), moderate AD (light gray bars), and severe AD (white bars) is plotted on a log scale for each gene assayed and the spreads represent standard deviations (upper limit shown). Genes and zones that display significant differences in their transcription levels are highlighted.  $a^1$ ,  $p=0.001592$ ;  $a^2$ ,  $p=0.002853$ ;  $a^3$ ,  $p=0.007399$ ;  $a^4$ ,  $p=0.002853$ ;  $a^5$ ,  $p=0.000536$ ;  $a^6$ ,  $p=0.010844$ ;  $a^7$ ,  $p=0.004337$ ;  $a^8$ ,  $p=0.041627$ ;  $a^9$ ,  $p=0.047531$ ;  $a^{10}$ ,  $p=0.022232$ ;  $a^{11}$ ,  $p=0.000629$ ;  $a^{12}$ ,  $p=0.012275$ ;  $a^{13}$ ,  $p=0.009563$ ;  $a^{14}$ ,  $p=0.039186$ ;  $a^{15}$ ,  $p=0.010844$ ;  $a^{16}$ ,  $p=0.000196$ ;  $b^1$ ,  $p=0.002162$ ;  $b^2$ ,  $p=0.000655$ ;  $b^3$ ,  $p=0.008972$ ;  $b^4$ ,  $p=0.009844$ ;  $b^5$ ,  $p=0.023096$ ;  $b^6$ ,  $p=0.000805$ ;  $b^7$ ,  $p=0.002611$ ;  $b^8$ ,  $p=0.007599$ ;  $b^9$ ,  $p=0.002162$ ;  $b^{10}$ ,  $p=0.000655$ ;  $b^{11}$ ,  $p=0.002162$ ;  $b^{12}$ ,  $p=0.000655$ ;  $c^1$ ,  $p=0.017621$ ;  $c^2$ ,  $p=0.000536$ ;  $c^3$ ,  $p=0.000455$ ;  $c^4$ ,  $p=0.000536$ ;  $c^5$ ,  $p=0.000327$ ;  $c^6$ ,  $p=0.000536$ ;  $c^7$ ,  $p=0.000536$ ;  $c^8$ ,  $p=0.006491$ ;  $c^9$ ,  $p=0.000233$ ;  $d^1$ ,  $p=0.001177$ ;  $d^2$ ,  $p=0.000196$ ;  $d^3$ ,  $p=0.004970$ ;  $d^4$ ,  $p=0.001592$ ;  $d^5$ ,  $p=0.024908$ ;  $d^6$ ,  $p=0.001370$ ;  $d^7$ ,  $p=0.004566$ ;  $d^8$ ,  $p=0.002254$ . Values on the y-axis are represented on a logarithmic scale.

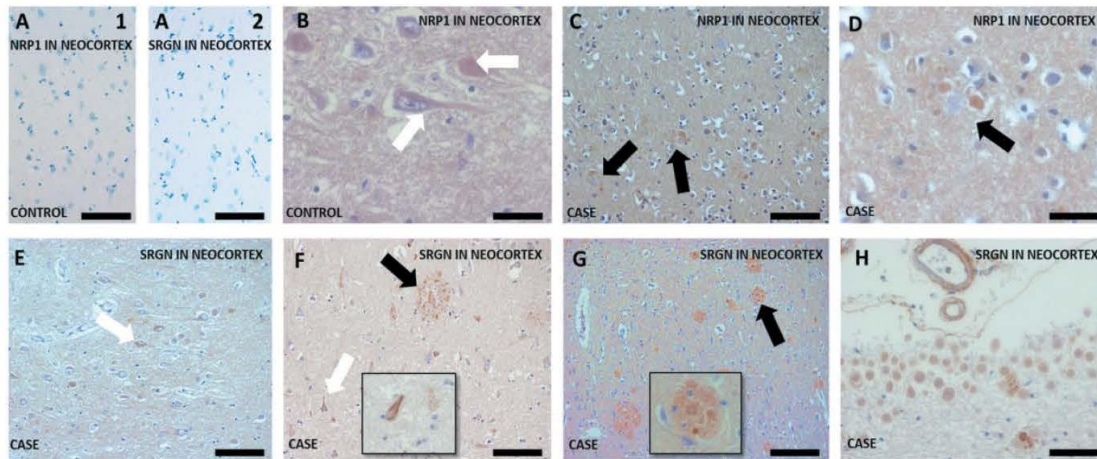
### Differential Expression of CD44v3, Neuropilin, Serglycin, and TGFBR3

The study of the transcription levels of “part-time” HSPGs and *SRGN* encoding genes by means of qRT-PCR showed all of them to be expressed, with some important variations (Fig. 6). The alterations which were statistically significant are shown in Figure 6. *CD44v3* and *NRPI* were significantly underexpressed in most of the brain areas

analyzed and for almost all AD stages. *TGFBR3* showed significant downregulation in the pallidum and cerebellum for all AD stages. In contrast, it is of note that we found the consistent significant overexpression of *SRGN* in almost all areas for brains with moderate and severe AD.

Immunohistochemistry showed the presence of weak to moderate immunoreactivity of NRP1 in the neuropil, in some neurons in the neocortex with neurofibrillary pretangles and





**FIGURE 7.** Immunohistochemical staining of neuropilin and serglycin in the cerebral neocortex (temporal lobe) in cases of Alzheimer disease. **(A)** No relevant expression of neuropilin (A1) or serglycin (A2) in neurons and glial cells in control brain samples. **(B)** Weak to moderate increase of neuropilin in the neuropil and in some neurons in the cortex with neurofibrillary pretangles and tangles (white arrows) compared to controls. **(C, D)** Moderate increase of neuropilin in neuritic plaques (NPs) (black arrows). **(E, F)** Moderate to strong immunoreactivity of serglycin in some neurons in the cortex with neurofibrillary pretangles and tangles (white arrows). Inset image shows 1 atrophic neuron with moderate intracytoplasmic positivity for neuropilin. **(G)** NPs are strongly positive for serglycin. Inset image shows 1 NP with huge deposits of serglycin. **(H)** Serglycin is deposited in walls of arterioles in cerebral amyloid angiopathy. Scale bars: A = 60  $\mu\text{m}$ ; B = 20  $\mu\text{m}$ ; C = 40  $\mu\text{m}$ ; D = 20  $\mu\text{m}$ ; E–G = 60  $\mu\text{m}$ ; H = 40  $\mu\text{m}$ .

tangles, as well as in NPs. Immunohistochemistry against SRGN showed a moderate to strong immunoreactivity in all 3 types of AD lesions (Fig. 7). Immunohistochemistry against TGFBR3 showed there to be no changes in AD cases in comparison with healthy brain tissue (data not shown).

## DISCUSSION

Snow et al. (24, 25) were the first to demonstrate the presence of HSPGs in all 3 types of AD lesions: NPs, CAA, and NFTs through the use of immunohistochemistry. Several *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that HS molecules are preferentially colocalized with A $\beta$  around the dense cores of SPs (26, 27), and it has been proposed that the A $\beta$ -HS interaction is mutually protective in that A $\beta$  is protected from protease degradation and HS is protected from HPSE degradation (28, 29). In addition, work over the last decade indicates that tau pathology can propagate between cells in a prion-like manner mediated by HSPGs (30). In this study, we have focused on the analysis of the expression levels of the 17 genes that encode the core proteins of HSPGs at different stages of AD using RT-PCR, and then localized certain significant proteins in the tissue through immunohistochemistry.

With respect to cell-surface HSPGs (syndecans and glypicans), little is known about the molecular expression of these families as a whole in AD. The most interesting finding in this work is the consistent overexpression of *SDC4* observed in every brain area in samples from all AD stages. Immunohistochemistry indicated the presence of mild to moderate

expression of *SDC4*, mostly related to tau pathology and A $\beta$  deposits. In fact, overexpression of mRNA of *SDC4* does not imply strong immunoreactivity of the protein in the tissue. Some regulatory mechanism such as microRNAs or even increased protein degradation could lower protein concentration. Although it is known to be involved in endocytosis, to date, very little is known about the function of *SDC4* in AD. A recently published work using *in vitro* techniques with human IPSC neurons suggested the involvement of *SDC4* in tau cellular internalization, and postulated the use of *SDC4* as a novel therapeutic strategy to inhibit the spread of tau pathology (31). This work found the variable expression of cell-surface HSPGs in AD brains depending on Braak and Braak stage, which is in line with previous studies that have characterized the presence of these family members in all 3 types of AD lesions, and that they have a particular affinity for fibrillar A $\beta$  (8, 24, 25). As such, it has been described that *SDC1-3* is present in NPs and tangles (5, 32, 33), which is supported by our data in relation to *SDC1*, and the results of this work found *SDC2* to also be present in CAA. Furthermore, this work also found *SDC4* to be present in all 3 types of AD lesion. As far as glypicans are concerned, it is worth highlighting the downregulation of most of these genes in the claustrum, and the overexpression of *GPC1*, *GPC2*, and *GPC3* in limbic areas of the brain, most notably in severe stages of AD. Several studies have demonstrated the involvement of *GPC1* in AD, with *GPC1* having been localized in brain amyloid plaques, as well as in tangles (33, 34). In addition, *GPC1* and *SDC3* were found in glia associated with amyloid deposits proximal to the site of



HS accumulation. This result is consistent with our finding that expression of HSPGs is elevated in neurons and glia of AD patients, further supporting the notion that HSPGs codeposited with amyloid plaques may be derived from glia and that they may be produced in response to the accumulation of A $\beta$  (26, 35). The majority of the findings of published research concerning the tissue localization of cell-surface HSPGs in brains with AD have been summarized in a recent review (6). In this light, we tried to improve the available knowledge on the localization of previously not well-characterized cell-surface HSPGs in AD by performing immunohistochemistry against SDC4, GPC4, and GPC6.

In regard to ECM HSPGs, most changes were observed in the limbic area, particularly the transentorhinal region and the hippocampus, as has previously been reported. AGRN and COL18A1 have been described as being involved in all 3 types of AD lesions (5). Although some articles have pointed to the presence of PRCAN in NPs, NFTs, and amyloid-laden vessels, others, including this study, have been unable to confirm these observations using monoclonal antibodies against the core protein of perlecan (8, 24, 33). In addition, recent studies have demonstrated that HSPGs are preferentially accumulated around the dense cores of amyloid plaques, but they remain largely absent from diffuse plaques (26).

With respect to “part-time” HSPGs in AD, very little data has been published. One interesting finding here is the significant underexpression of *CD44v3* and *NRP1* in almost all brain areas analyzed. However, other researchers have described that in hippocampal samples the expression of *CD44v3* was significantly higher in AD patients compared to controls (36). As for *NRP1*, to the best of our knowledge, no previous reports have been published regarding this HSPG and AD. Although *NRP1* was found to be mostly downregulated, immunohistochemistry indicated the accumulation of *NRP1* in degenerative neurons, neuropil, and NPs. It is worth noting that *NRP1* is a receptor for semaphorin 3A, and the accumulation of an internalized form of this molecule is associated with degeneration of neurons in vulnerable fields of the hippocampus during AD (37). *TFGBR3*, as well as *PRCAN* and others, is considered a vascular cell-derived proteoglycan (38). The significant changes observed in our study for *TGFBR* were mostly in terms of downregulation. A previous study detected that *TGFBR3* was upregulated in familial AD, while it was markedly downregulated in sporadic AD fibroblasts. Furthermore, this differential expression of *TGFBR3* in familial AD and sporadic AD cells was associated with the severity of AD (39, 40).

*SRGN*, the only intracellular HSPG, is located in the granules of connective tissue-type mast cells, where the high negative charge of its HS chains facilitates the packaging of positively charged proteases, histamine, and other inflammatory mediators (41). We demonstrate in this work, for the first time, the presence of *SRGN* in all 3 types of AD lesion. Furthermore, we also describe a consistent significant overexpression of *SRGN* in almost all areas of brains with moderate and severe AD. HS has been shown to bind and affect aggregation, intracellular internalization, and clearance of tau and APP (8). In addition, HS enhances and stabilizes A $\beta$  fibril formation, dependent on the degree of sulfation of the HS (42).

In addition, several studies have shown that heparin may promote the phosphorylation of tau by protein kinases, which prevents tau from binding to microtubules and induces rapid microtubule disassembly in a sulfation-dependent manner (43, 44). In a more in-depth study, Sepulveda-Diaz et al found that the enzyme HS (glucosamine) 3-O-sulphotransferase 2 (*HS3ST2*) is predominantly expressed in neurons. They observed that *HS3ST2* is overexpressed in the hippocampus of AD brains compared with controls, where it generates infrequent 3-O-sulfated domains in HS chains. In addition, by interacting with tau at the intracellular level, their findings indicate that the 3-O-sulfated HS domains produced by *HS3ST2* might act as molecular chaperones which permit the abnormal phosphorylation of tau (45). In this light, considering that *SRGN* is the only intracellular HSPG, this molecule could play a central role in AD stabilization and progression throughout 3-O-sulfated domains in their HS chains. However, the lack of technology to quantify the 3-O-sulfate group and the difficulty of obtaining large quantities of HS for structural analyses hinder attempts to establish the true prevalence of 3-O-sulfation in the HS chains of every HSPG (46).

Although HSPGs are either ECM or cell-surface proteins, some positive immunoexpression has been detected in the cytoplasm. This could be due to the respective roles of HSPG core protein and HS chain structure specificity for macromolecular cargo endocytosis, the downstream intracellular signaling events involved in HSPG-dependent membrane invagination and vesicle formation, and the biological effects of internalized ligands (47).

It is our view that the lack of progress in AD treatment could be influenced by the fact that studies have barely estimated either the functional or the structural roles of HS molecules (48). In this regard, considering that HS-A $\beta$  interaction contributes to every stage of the A $\beta$  pathogenesis in AD—including production, clearance, accumulation, aggregation, and toxicity—it seems rational to hypothesize that interfering in the HS-A $\beta$  interaction could have multiple beneficial effects.

In conclusion, alterations in the levels of some HSPG core proteins are associated with typical AD lesions. We also observed the differential association of certain of these core proteins with NFTs, NPs, and CAA. We therefore conclude that the specific subtypes may have different roles with regard to the pathogenesis of the different AD lesions, especially for *SDC4* and *SRGN*, the transcriptional levels of which are increased even in those areas that do not have histological lesions, highlighting both as potential inducers of the disease.

## REFERENCES

1. Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet* 2006;368:387–403
2. Sarkar A, Irwin M, Singh A, et al. Alzheimer's disease: The silver tsunami of the 21(st) century. *Neural Regen Res* 2016;11:693–7
3. Hardy J. The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: A critical reappraisal. *J Neurochem* 2009;110:1129–34
4. Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 2016;8:595–608
5. van Horssen J, Wesseling P, van den Heuvel LP, et al. Heparan sulphate proteoglycans in Alzheimer's disease and amyloid-related disorders. *Lancet Neurol* 2003;2:482–92



6. Zhang GL, Zhang X, Wang XM, et al. Towards understanding the roles of heparan sulfate proteoglycans in Alzheimer's disease. *Biomed Res Int* 2014;2014:516028
7. van Horssen J, Kleijnijenhuis J, Maass CN, et al. Accumulation of heparan sulfate proteoglycans in cerebellar senile plaques. *Neurobiol Aging* 2002;23:537-45
8. Cui H, Freeman C, Jacobson GA, et al. Proteoglycans in the central nervous system: Role in development, neural repair, and Alzheimer's disease. *IUBMB Life* 2013;65:108-20
9. Holmes BB, DeVos SL, Kfoury N, et al. Heparan sulfate proteoglycans mediate internalization and propagation of specific proteopathic seeds. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:E3138-47
10. Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD. Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3:pii: a004952
11. Esko JD, Kimata K, Lindahl U, Proteoglycans and sulfated glycosaminoglycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME, eds. *Essentials of Glycobiology*. New York, NY: Cold Spring Harbor 2009
12. Whitelock JM, Iozzo RV. Heparan sulfate: A complex polymer charged with biological activity. *Chem Rev* 2005;105:2745-64
13. Fernandez-Vega I, Garcia O, Crespo A, et al. Specific genes involved in synthesis and editing of heparan sulfate proteoglycans show altered expression patterns in breast cancer. *BMC Cancer* 2013;13:24
14. Fernandez-Vega I, Garcia-Suarez O, Garcia B, et al. Heparan sulfate proteoglycans undergo differential expression alterations in right sided colorectal cancer, depending on their metastatic character. *BMC Cancer* 2015;15:742
15. Garcia-Suarez O, Garcia B, Fernandez-Vega I, et al. Neuroendocrine tumors show altered expression of chondroitin sulfate, glypican 1, glypican 5, and syndecan 2 depending on their differentiation grade. *Front Oncol* 2014;4:15
16. Crespo A, Garcia-Suarez O, Fernandez-Vega I, et al. Heparan sulfate proteoglycans undergo differential expression alterations in left sided colorectal cancer, depending on their metastatic character. *BMC Cancer* 2018;18:687
17. Fernández-Vega I, Garcia B, Suárez OG, et al. Alterations of heparan sulfate proteoglycans in cancer. *J Glycobiol* 2014;3:109
18. García B, Fernández-Vega I, García-Suárez O, et al. The Role of Heparan Sulfate Proteoglycans in Bacterial Infections. *J Med Microb Diagn* 2014;3:157
19. Lorente-Gea L, Garcia B, Martin C, et al. Heparan sulfate proteoglycans and heparanases in Alzheimer's disease: Current outlook and potential therapeutic targets. *Neural Regen Res* 2017;12:914-5
20. Vlodaysky I, Iozzo RV, Sanderson RD. Heparanase: Multiple functions in inflammation, diabetes and atherosclerosis. *Matrix Biol* 2013;32:220-2
21. DeWitt DA, Silver J, Canning DR, et al. Chondroitin sulfate proteoglycans are associated with the lesions of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 1993;121:149-52
22. Snow AD, Mar H, Nochlin D, et al. Peripheral distribution of dermatan sulfate proteoglycans (decorin) in amyloid-containing plaques and their presence in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *J Histochem Cytochem* 1992;40:105-13
23. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 1991;82:239-59
24. Snow AD, Mar H, Nochlin D, et al. The presence of heparan sulfate proteoglycans in the neuritic plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1988;133:456-63
25. Perry G, Siedlak SL, Richey P, et al. Association of heparan sulfate proteoglycan with the neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 1991;11:3679-83
26. O'Callaghan P, Sandwall E, Li JP, et al. Heparan sulfate accumulation with Abeta deposits in Alzheimer's disease and Tg2576 mice is contributed by glial cells. *Brain Pathol* 2008;18:548-61
27. Jendresen CB, Cui H, Zhang X, et al. Overexpression of heparanase lowers the amyloid burden in amyloid-beta precursor protein transgenic mice. *J Biol Chem* 2015;290:5053-64
28. Bame KJ, Danda J, Hassall A, et al. Abeta(1-40) prevents heparanase-catalyzed degradation of heparan sulfate glycosaminoglycans and proteoglycans in vitro. A role for heparan sulfate proteoglycan turnover in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 1997;272:17005-11
29. Gupta-Bansal R, Frederickson RC, Brunden KR. Proteoglycan-mediated inhibition of A beta proteolysis. A potential cause of senile plaque accumulation. *J Biol Chem* 1995;270:18666-71
30. Holmes BB, Diamond MI. Prion-like properties of Tau protein: The importance of extracellular Tau as a therapeutic target. *J Biol Chem* 2014;289:19855-61
31. Usenovic M, Gretzula C, Parmentier-Batteur S. Novel targets for blocking the uptake of tau oligomers in HIPSC neurons. *Alzheimers Dement* 2018;14:1140-1
32. Horssen J, Otte-Höller I, David G, et al. Heparan sulfate proteoglycan expression in cerebrovascular amyloid beta deposits in Alzheimer's disease and hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch) brains. *Acta Neuropathol* 2001;102:604-14
33. Verbeek MM, Otte-Holler I, van den Born J, et al. Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan accumulating in Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol* 1999;155:2115-25
34. Watanabe N, Araki W, Chui DH, et al. Glypican-1 as an Abeta binding HSPG in the human brain: Its localization in DIG domains and possible roles in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *FASEB J* 2004;18:1013-5
35. Su JH, Cummings BJ, Cotman CW. Localization of heparan sulfate glycosaminoglycan and proteoglycan core protein in aged brain and Alzheimer's disease. *Neuroscience* 1992;51:801-13
36. Pinner E, Gruper Y, Ben Zinra M, et al. CD44 splice variants as potential players in Alzheimer's disease pathology. *JAD* 2017;58:1137-49
37. Good PF, Alapat D, Hsu A, et al. A role for semaphorin 3A signaling in the degeneration of hippocampal neurons during Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2004;91:716-36
38. Snow AD, Kinsella MG, Parks E, et al. Differential binding of vascular cell-derived proteoglycans (perlecan, biglycan, decorin, and versican) to the beta-amyloid protein of Alzheimer's disease. *Arch Biochem Biophys* 1995;320:84-95
39. Bellucci C, Lilli C, Baroni T, et al. Differences in extracellular matrix production and basic fibroblast growth factor response in skin fibroblasts from sporadic and familial Alzheimer's disease. *Mol Med* 2007;13:542-50
40. Hu W, Lin X, Chen K. Integrated analysis of differential gene expression profiles in hippocampi to identify candidate genes involved in Alzheimer's disease. *Mol Med Rep* 2015;12:6679-87
41. Kolset SO, Pejler G. Serglycin: A structural and functional chameleon with wide impact on immune cells. *J Immunol* 2011;187:4927-33
42. Bruinsma IB, te Riet L, Gevers T, et al. Sulfation of heparan sulfate associated with amyloid-beta plaques in patients with Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2010;119:211-20
43. Goedert M, Jakes R, Spillantini MG, et al. Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature* 1996;383:550-3
44. Perez M, Valpuesta JM, Medina M, et al. Polymerization of tau into filaments in the presence of heparin: The minimal sequence required for tau-tau interaction. *J Neurochem* 1996;67:1183-90
45. Sepulveda-Diaz JE, Alavi Naini SM, Huynh MB, et al. HS3ST2 expression is critical for the abnormal phosphorylation of tau in Alzheimer's disease-related tau pathology. *Brain* 2015;138:1339-54
46. Thacker BE, Xu D, Lawrence R, et al. Heparan sulfate 3-O-sulfation: A rare modification in search of a function. *Matrix Biol* 2014;35:60-72
47. Christianson HC, Belting M. Heparan sulfate proteoglycan as a cell-surface endocytosis receptor. *Matrix Biol* 2014;35:51-5
48. Aprahamian I, Stella F, Forlenza OV. New treatment strategies for Alzheimer's disease: Is there a hope? *Indian J Med Res* 2013;138:449-60

