

eman ta zabal zazu

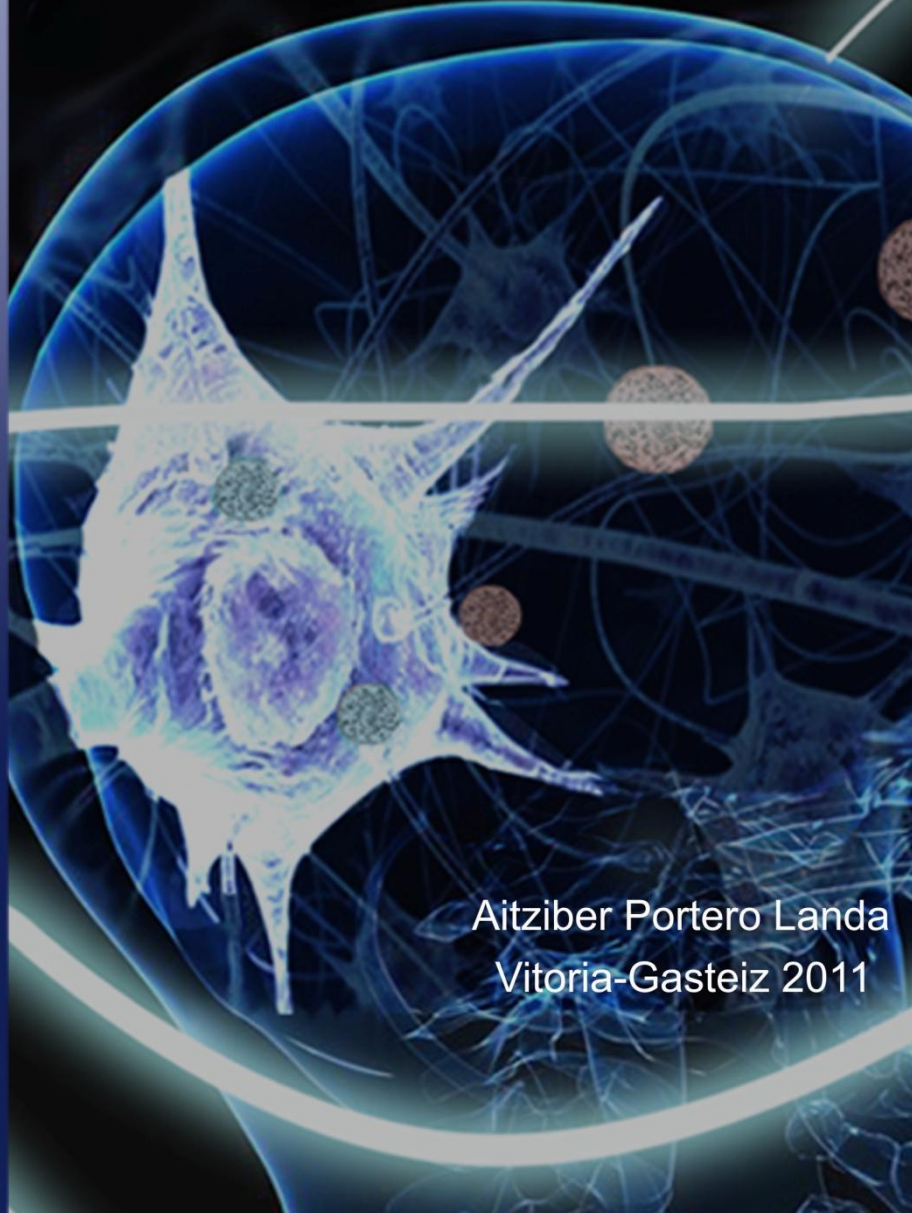


UPV EHU

Facultad de Farmacia

Laboratorio de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Terapia celular para el tratamiento  
de la enfermedad de Alzheimer:  
angiogénesis terapéutica inducida por  
células microencapsuladas secretoras  
del factor de crecimiento del endotelio vascular



Aitziber Portero Landa  
Vitoria-Gasteiz 2011



Reconocimiento – NoComercial – SinObrasDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.



UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO/ EUSKAL HERRIKO UNIBERTSITATEA  
FACULTAD DE FARMACIA  
Laboratorio de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

---

**Terapia celular para el tratamiento de la  
enfermedad de Alzheimer: angiogénesis  
terapéutica inducida por células  
microencapsuladas secretoras del factor de  
crecimiento del endotelio vascular**

**AITZIBER PORTERO LANDA**



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.



**AUTORIZACION DEL/LA DIRECTOR/A DE  
TESIS  
PARA SU PRESENTACION**

Dr/a. José Luis Pedraz Muñoz y Gorka Orive Arroyo  
como Directores/as de la Tesis Doctoral: **Terapia celular para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer: angiogénesis terapéutica inducida por células microencapsuladas secretoras del factor de crecimiento del endotelio vascular** realizada en el Departamento Farmacia y Ciencias de los Alimentos por la Doctorando Don/ña. Aitziber Portero Landa, autorizo la presentación de la citada Tesis Doctoral, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

En Vitoria-Gasteiz, a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

EL/LA DIRECTOR/A DE LA TESIS

Fdo.: José Luis Pedraz Muñoz

Fdo.: Gorka Orive Arroyo



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

**ACTA DE GRADO DE DOCTOR**  
**ACTA DE DEFENSA DE TESIS DOCTORAL**

DOCTORANDO DON/ÑA. Aitziber Portero Landa

TITULO DE LA TESIS: **Terapia celular para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer: angiogénesis terapéutica inducida por células microencapsuladas secretoras del factor de crecimiento del endotelio vascular.**

El Tribunal designado por la Subcomisión de Doctorado de la UPV/EHU para calificar la Tesis Doctoral arriba indicada y reunido en el día de la fecha, una vez efectuada la defensa por el doctorando y contestadas las objeciones y/o sugerencias que se le han formulado, ha otorgado por \_\_\_\_\_ la calificación de:  
*unanimidad ó mayoría*

Idioma/s defensa: Castellano

En Vitoria-Gasteiz, a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

EL/LA PRESIDENTE/A,

EL/LA SECRETARIO/A,

Fdo.:

Fdo.:

Dr/a: \_\_\_\_\_

Dr/a: \_\_\_\_\_

VOCAL 1º,

VOCAL 2º,

VOCAL 3º,

Fdo.:

Fdo.:

Fdo.:

Dr/a: \_\_\_\_\_ Dr/a: \_\_\_\_\_ Dr/a: \_\_\_\_\_

EL/LA DOCTORANDO/A,

Fdo.: \_\_\_\_\_



## CONFORMIDAD DEL DEPARTAMENTO

El Consejo del Departamento de Farmacia y Ciencias de los Alimentos en reunión celebrada el día \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ ha acordado dar la conformidad a la admisión a trámite de presentación de la Tesis Doctoral titulada: **Terapia celular para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer: angiogénesis terapéutica inducida por células microencapsuladas secretoras del factor de crecimiento del endotelio vascular** dirigida por los/las Drs/as. José Luis Pedraz Muñoz y Gorka Orive Arroyo y presentada por Don/ña. Aitziber Portero Landa ante este Departamento.

En Vitoria-Gasteiz, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Vº Bº DIRECTOR/A DEL DEPARTAMENTO SECRETARIO/A DEL DEPARTAMENTO

Fdo.: \_\_\_\_\_

Fdo.: Rosa María Hernández Martín

## AGRADECIMIENTOS

En estas líneas quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que de una forma u otra me han ayudado en la realización de esta Tesis Doctoral.

Quisiera agradecer a mis directores de tesis el Dr. José Luis Pedraz Muñoz, la Dra. Rosa María Hernández Martín y el Dr. Gorka Orive Arroyo la oportunidad que me brindaron hace ya más de seis años al entrar en el Departamento y ponerme así en contacto por primera vez con el mundo de la investigación.

A la Dra. Eva Carro, al Dr. Carlos Spuch así como a todas las personas del Laboratorio de Neurociencias del Centro de Investigación del Hospital 12 de Octubre por el gran trabajo realizado que ha permitido que esta memoria experimental sea mucho mejor.

Al Dr. Ignacio Melero y al Dr. Juan Dubrot por haberme dado la oportunidad de colaborar con su grupo de investigación.

A todo el Laboratorio de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, por el buen acogimiento, y por estar siempre dispuestos a ayudarme.

A los Departamentos de Farmacología y Neurociencias de la Universidad del País Vasco por haberme dado la oportunidad de trabajar con ellos y de aprender nuevas técnicas.

Quisiera hacer una mención especial a Paola, Edu, Susana y Garazi por vuestra ayuda y vuestra comprensión siempre que la he necesitado. Un placer haberos conocido.

A todas esas personas que de alguna forma u otra se han interesado por el trabajo que he realizado durante estos años.

A mi madre, por haberme dado la formación necesaria para llegar hasta aquí y por su apoyo y ayuda tanto en los buenos como en malos momentos surgidos durante la realización de esta Tesis Doctoral.

## Listado de Abreviaturas

- **EA:** Enfermedad de Alzheimer
- **A $\beta$ :**  $\beta$ -amiloide
- **A $\beta$ 40:**  $\beta$ -amiloide de 40 aminoácidos
- **A $\beta$ 42:**  $\beta$ -amiloide de 42 aminoácidos
- **$\beta$ -APP:** Proteína Precursora Amiloidea
- **APOE:** Apolipoproteína E
- **SNC:** Sistema Nervioso Central
- **LCR:** Líquido Cefalorraquídeo
- **BHE:** Barrera Hematoencefálica
- **NGF:** Factor de Crecimiento de las Células Nerviosas
- **TNF- $\alpha$ :** Factor de Necrosis Tumoral
- **RM:** Resonancia Magnética
- **VEGF:** Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular
- **LRP:** Receptor de la Lipoproteína de Baja Densidad
- **PS1:** Presenilina 1
- **PS2:** Presenilina 2
- **GSK-3 $\beta$ :** Glucógeno Sintasa Quinasa
- **RAP:** Proteína asociada al receptor
- **RAGE:** Receptor de los Productos Avanzados de la Glicosilación
- **BMVEC:** Células Endoteliales Microvasculares Cerebrales
- **GFAP:** Proteína Gliofibrilar Ácida
- **EPO:** Eritropoyetina

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	3
2. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	13
3. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y GENES	22
4. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y EL SISTEMA NEUROVASCULAR	24
5. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y VEGF	32
6. MODELOS MURINOS TRANSGÉNICOS PARA EL ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	35
6.1. Ratones con un único gen modificado	36
6.2. Ratones con dos genes modificados	42
6.3. Ratón con 3 genes modificados	48
7. NEUROGÉNESIS	49
8. TECNOLOGÍA DE LA MICROENCAPSULACIÓN DE CÉLULAS	53
<i>Artículo 1: Cell microencapsulation technology: Towards     clinical application</i>	55
9. ENCAPSULACIÓN DE CÉLULAS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	73
<i>Artículo 2: Encapsulación de células para el     tratamiento de enfermedades del sistema nervioso     central</i>	75



<b>OBJETIVOS</b>	<b>93</b>
<b>EXPERIMENTAL</b>	<b>97</b>
<i>Artículo 3: The effect of encapsulated VEGF-secreting cells on brain amyloid load and behavioral impairment in a mouse model of Alzheimer's disease</i>	<b>99</b>
<i>Artículo 4: Encapsulated VEGF-secreting cells enhance proliferation of neuronal progenitors in the hippocampus of APP/Ps1 mice</i>	<b>123</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>147</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>181</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>187</b>



## 1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa de demencia más común entre la población adulta. Debido al aumento de la esperanza de vida su prevalencia va a ir en aumento y se calcula que para el año 2050 el número de personas afectadas se habrá incrementado de los 35 millones actuales hasta los 115<sup>1</sup>. En España, ya se ha diagnosticado esta enfermedad a 600.000 personas y se estima que en el año 2025 habrá, aproximadamente, 1.200.000 enfermos.

El primer caso de esta enfermedad fue descrito en el año 1906 por el psiquiatra alemán Alois Alzheimer. En el año 1970 se descubrió que las neuronas que sintetizaban el neurotransmisor acetilcolina sufrían una severa degeneración y por ello todos los esfuerzos de los investigadores se centraron en aumentar la cantidad de acetilcolina en el cerebro. No obstante, en el año 1980, se observó que la síntesis de otros neurotransmisores también estaba afectada por lo que se llegó a la conclusión de que esta enfermedad actúa sobre distintos tipos de neuronas, no solo sobre las responsables de la síntesis de acetilcolina<sup>2</sup>.

El diagnóstico de la EA, hasta hace unos pocos años, solo podía realizarse con seguridad postmortem, cuando se analizaba el cerebro del paciente y se constataba la presencia de las placas de  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ). Hoy en día mediante la utilización de ligandos con isótopos emisores de positrones que se unen a las placas de  $A\beta$ , la medida de los niveles de ciertas moléculas en el fluido espinal y un estudio cognitivo puede realizarse un diagnóstico certero sin recurrir a la

---

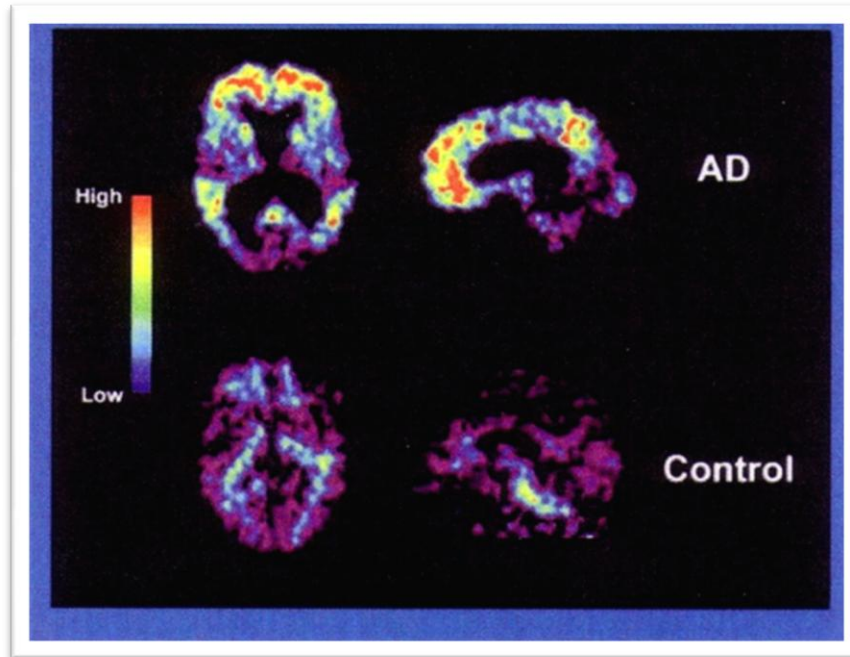
<sup>1</sup> Ashe KH, Zahs KR. Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. *Neuron*. 2010; 66: 631-645.

<sup>2</sup> Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins and therapy. *Physiol Rev*. 2001; 81: 741-766.

## 4 Introducción

---

autopsia<sup>3</sup>. En la figura 1 pueden apreciarse las diferencias, en los niveles de captación de A $\beta$  entre un cerebro sano y uno con la EA.



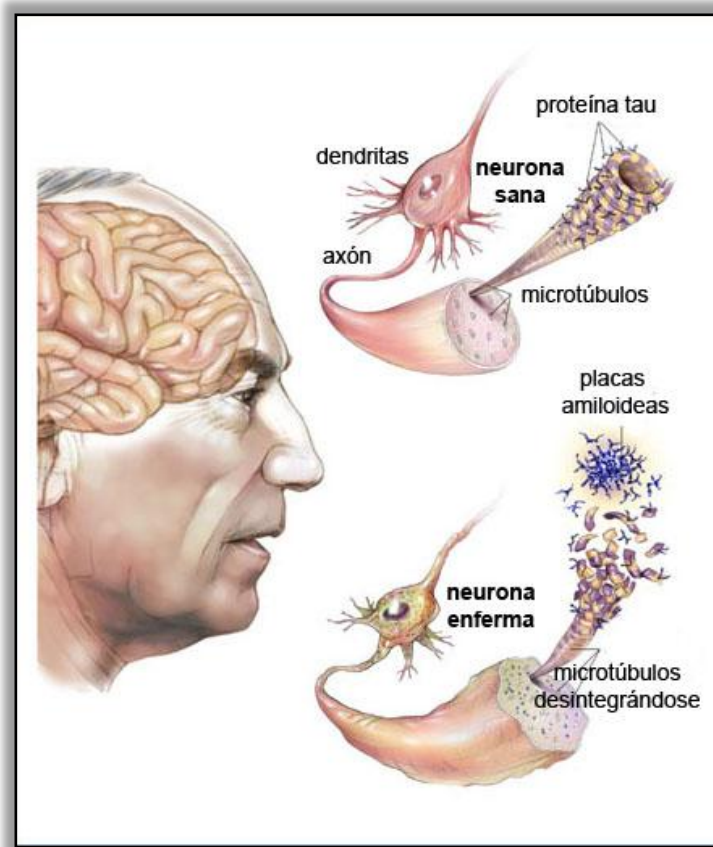
**Figura 1:** Niveles de A $\beta$ , medidos por tomografía axial computarizada, en un cerebro sano y en uno con la EA. (Origen: [www.neuropathologyblog.blogspot.com](http://www.neuropathologyblog.blogspot.com)).

Esta enfermedad se caracteriza por la aparición en el cerebro, principalmente en el hipocampo y en la corteza, de dos estructuras patológicas tal y como se muestra en la figura 2:

- 1- Placas seniles extracelulares que en su mayor parte están compuestas de los péptidos de A $\beta$  de 40 (A $\beta$ 40) y 42 (A $\beta$ 42) aminoácidos rodeados de astrocitos y microglía.
- 2- Ovillos neurofibrilares intracelulares compuestos de proteína *tau* fosforilada conjugada con ubiquitina.

---

<sup>3</sup> Tarawneh R, Holtzman DM. Critical issues for successful immunotherapy in Alzheimer's disease: development of biomarkers and methods for early detection and intervention. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2009; 8: 144-159.



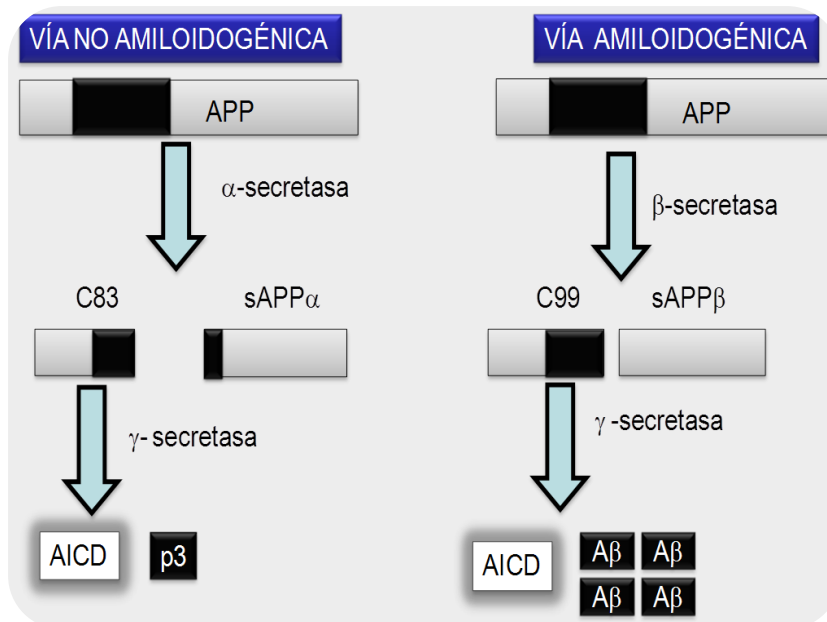
**Figura 2:** Representación de las estructuras más importantes en la EA. (Origen: [www.kenzensalut.com](http://www.kenzensalut.com)).

Los péptidos A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 provienen de una proteína denominada proteína precursora amiloidea ( $\beta$ -APP)<sup>4</sup>. Esta proteína es metabolizada por proteasas llamadas  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\alpha$  secretasas<sup>4</sup>. Como puede observarse en la figura 3, el metabolismo de dicha proteína puede producirse mediante dos vías distintas para generar péptidos biológicamente activos<sup>4</sup>. En la vía predominante, donde no se forman péptidos de A $\beta$ , la proteína  $\beta$ -APP es metabolizada por la enzima

<sup>4</sup> Pereira C, Agostinho P, Moreira PI, Cardoso SM, Oliveira CR. Alzheimer`s disease-associated neurotoxic mechanisms and neuroprotective strategies. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2005; 4: 383-403.

## 6 Introducción

$\alpha$ -secretasa dando lugar a una proteína de 83 aminoácidos. Dicha proteína es posteriormente metabolizada por la enzima  $\gamma$ -secretasa para dar a lugar a un péptido llamado p3 y al dominio intracelular de la  $\beta$ -APP (AICD)<sup>4</sup>. En la segunda ruta metabólica la proteína  $\beta$ -APP es metabolizada por la enzima  $\beta$ -secretasa dando lugar a un compuesto de 99 aminoácidos que en una segunda reacción, mediante la enzima  $\gamma$ -secretasa, origina los péptidos de A $\beta$  de distinto tamaño siendo la mayoría péptidos de 40 y de 42 aminoácidos junto al AICD<sup>4</sup>.



**Figura 3:** Vías metabólicas de la  $\beta$ -APP<sup>4</sup>.

Respecto a las placas de A $\beta$ , desde la incorporación de nuevas técnicas de diagnóstico, existen importantes interrogantes ya que en personas de edad avanzada sin demencia también se han detectado placas sin que se hayan desarrollado los síntomas cognitivos de la enfermedad. Esto podría indicar que existe un largo periodo de tiempo durante el cual se van acumulando los

péptidos de A $\beta$  sin llegar a provocar síntomas<sup>5</sup>. Pero lo más sorprendente es que en algunos casos de la EA dichas placas no han sido detectadas<sup>6</sup> aunque en estos pacientes la autopsia puede acabar revelando la existencia de estas.

Por otro lado, existe cierta controversia sobre el papel que pueden jugar los péptidos A $\beta$  en la EA, ya que son péptidos naturales sintetizados por muchos tipos de células y que ejercen funciones fisiológicas muy importantes para los procesos de aprendizaje y memoria<sup>7</sup>. Incluso algunos autores llegan a afirmar que en determinadas situaciones pueden llegar a ejercer una función neuroprotectora<sup>8</sup>. Sin embargo, en otros estudios si se ha podido demostrar que estos péptidos pueden ser en cierta medida perjudiciales para las neuronas afectando especialmente a la sinapsis<sup>9</sup>. No se sabe cuál es el mecanismo exacto mediante el cual ejercen su efecto tóxico, uno de los mecanismos propuesto podría ser activando la vía de las caspasas<sup>10</sup>, unas enzimas que están relacionadas con la apoptosis celular. La respuesta inflamatoria también explicaría el efecto tóxico de estos péptidos<sup>11</sup>. Por último, tal y como se muestra en la figura 4, se ha observado que la acumulación de las placas de A $\beta$  es capaz

---

<sup>5</sup> Price JL, McKeel DW, Buckles VD, Roe CM, Xiong C, Grundman M, et al. Neuropathology of nondemented aging: presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*. 2009; 30: 1026-1036.

<sup>6</sup> Pimplikar SW, Nixon RA, Robakis NK, Shen J, Tsai LH. Amyloid-independent mechanisms in Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci*. 2010; 30: 14946-14954.

<sup>7</sup> Maltsev AV, Bystryak S, Galzitskaya OV. The role of  $\beta$ -amyloid peptide in neurodegenerative diseases. *Ageing Res Rev*. 2011; 10: 440-452.

<sup>8</sup> Giuffrida ML, Caraci F, Pignataro B, Cataldo S, De Bona P, Bruno V, et al. Beta-amyloid monomers are neuroprotective. *J Neurosci*. 2009; 29: 10582-10587.

<sup>9</sup> Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, et al. Amyloid- $\beta$  protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med*. 2008; 14: 837-842.

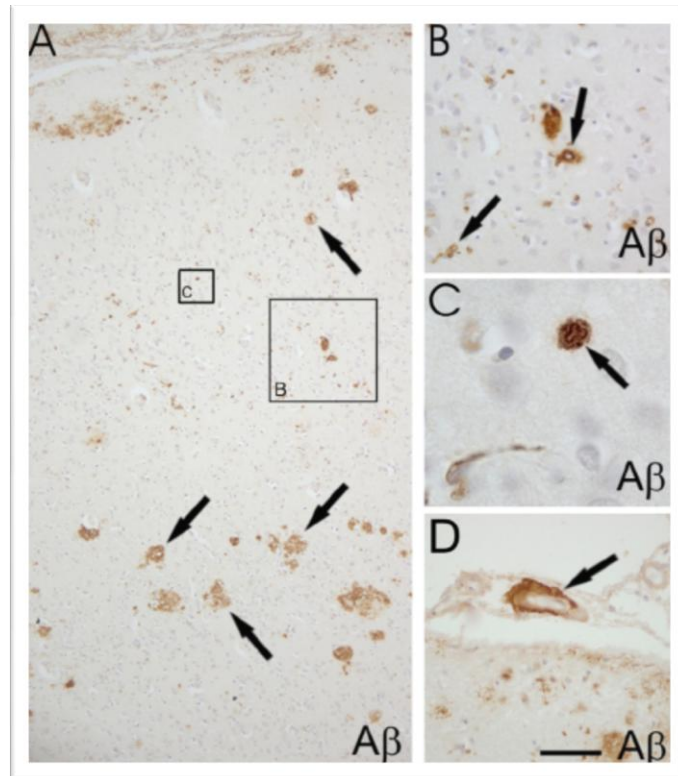
<sup>10</sup> Saeki K, Nose Y, Hirao N, Takasawa R, Tanuma S. Amyloid precursor protein binding protein Fe65 is cleaved by caspases during DNA damage-induced apoptosis. *Biol Pharm Bull*. 2011; 34: 290-294.

<sup>11</sup> Miao J, Vitek MP, Xu F, Previti ML, Davis J, Van Nostrand WE. Reducing cerebral microvascular amyloid- $\beta$  protein deposition diminishes regional neuroinflammation in vasculotropic mutant amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci*. 2005; 25: 6271-6277.

## 8 Introducción

---

de obstruir los vasos sanguíneos reduciendo el aporte sanguíneo que llega a las neuronas<sup>12</sup>.



**Figura 4:** (A) Angiopatía amiloide cerebral en la corteza occipital de una mujer de 89 años con EA. (B) Foto a mayor aumento de la angiopatía amiloide cerebral en los vasos sanguíneos pequeños. (C) Depósitos de Aβ en la pared de los capilares. (D) Vasos sanguíneos grandes en los que no se observa acúmulo de Aβ<sup>12</sup>.

---

<sup>12</sup> Thal DR, Capetillo-Zarate E, Larionov S, Staufenbiel M, Zurbuegg S, Beckmann N. Capillary cerebral amyloid angiopathy is associated with vessel occlusion and cerebral blood flow disturbances. *Neurobiol Aging*. 2009; 30: 1936-1948.



En varios estudios llevados a cabo con ratones transgénicos se ha descubierto que los síntomas cognitivos comienzan antes de que las placas de A $\beta$  sean detectadas<sup>13</sup>. Por ello se ha propuesto que los péptidos de A $\beta$  solubles que se acumulan dentro de las neuronas y los vasos sanguíneos nada más comenzar a desarrollarse la enfermedad, son los que presentan un mayor efecto tóxico, y no las placas de A $\beta$  insoluble que se forman al final de la enfermedad.

Otro de los componentes característicos de la EA son los ovillos neurofibrilares, compuestos de proteína *tau* fosforilada. La proteína *tau* es una proteína fosforilada que pertenece a la familia de las proteínas asociadas a los microtúbulos y tiene una localización axonal subcelular en el cerebro adulto normal<sup>14</sup>. Su función principal es unirse a la tubulina facilitando la polimerización de los túbulos, por lo que puede decirse que tiene una función fisiológica muy relevante<sup>15</sup> (figura 5).

Dicha función fisiológica ha sido puesta de manifiesto mediante la utilización de un modelo de ratón transgénico que tiene anulados los dos genes que codifican la proteína *tau*; en este modelo murino se ha observado que las neuronas del hipocampo no llegan a madurar por completo ya que sus axones son más cortos<sup>16</sup>. Esto dificultaría en gran medida el uso de posibles tratamientos que actúen sobre la proteína *tau*.

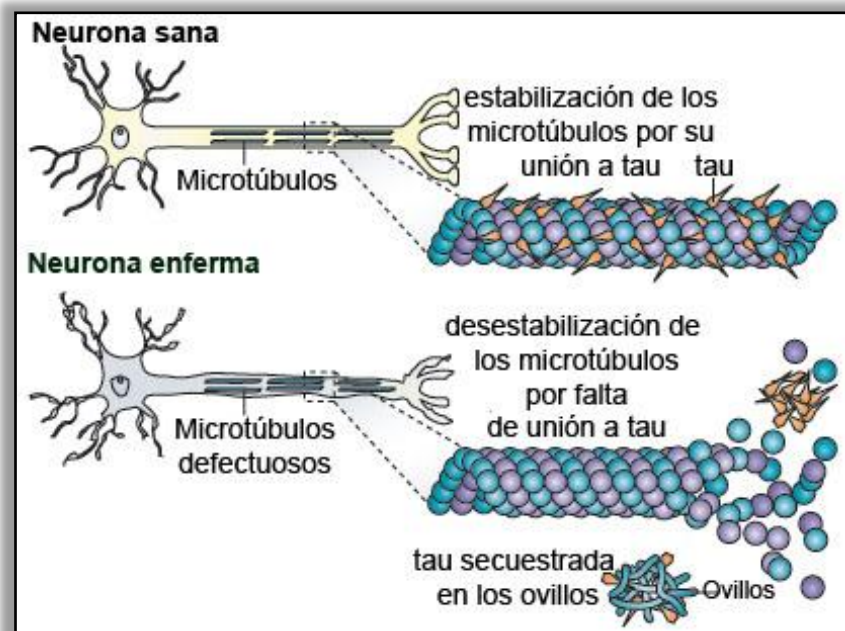
---

<sup>13</sup> Meyer-Luehmann M, Spires-Jones TL, Prada C, Garcia-Alloza M, de Calignon A, Rozkalne A, et al. Rapid appearance and local toxicity of amyloid- $\beta$  plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*. 2008; 451: 720-725.

<sup>14</sup> Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VMY. Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nat Rev Drug Discov*. 2009; 8: 783-793.

<sup>15</sup> Meraz-Ríos MA, Lira-De León KI, Campos-Peña V, De Anda-Hernández MA, Mena-López R. Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2010; 112: 1353-1367.

<sup>16</sup> Götz J, Deters N, Doldissen A, Bokhari L, Ke Y, Wiesner A, et al. A decade of tau transgenic animal models and beyond. *Brain Pathol*. 2007; 17: 91-103.



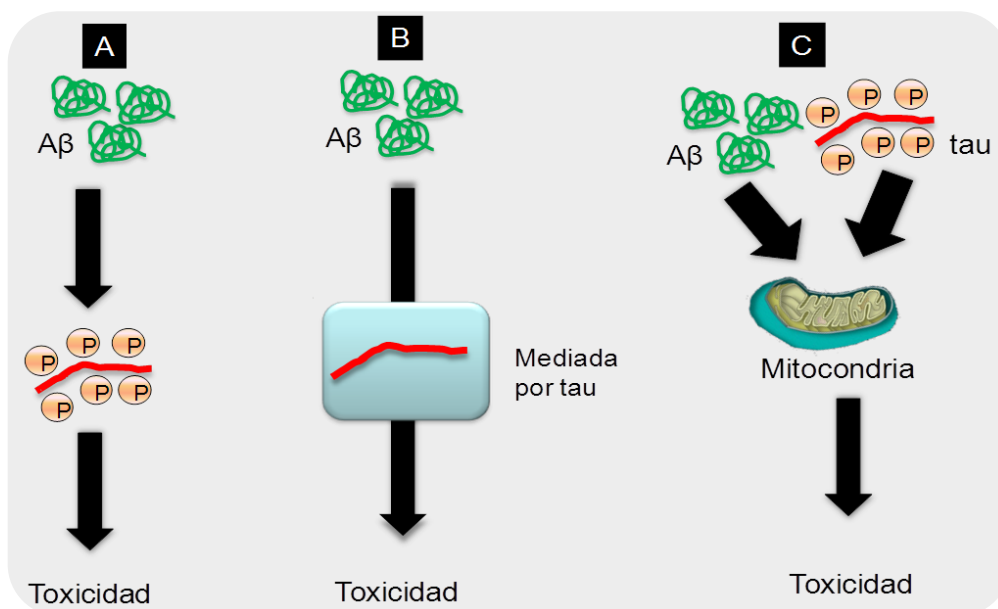
**Figura 5:** Función de la proteína tau en el caso de las neuronas sanas y de la EA<sup>14</sup>.

La acción ejercida por la proteína *tau* está regulada por un proceso de fosforilación-desfosforilación, uniéndose a los microtúbulos solo cuando se encuentra desfosforilada. En la EA, como antes se ha mencionado, se encuentra hiperfosforilada lo que hace pensar que no está desempeñando su función de la forma adecuada.

Aunque durante muchos años se ha pensado que el principal exponente de la EA era el A $\beta$ , a día de hoy no se sabe a ciencia cierta cuál de los dos factores (A $\beta$  o proteína *tau*) ejerce un papel más importante en el desarrollo de la EA. Algunos grupos de investigación opinan que el A $\beta$  potencia el efecto tóxico de la proteína *tau* aumentando su fosforilación (figura 6A)<sup>17</sup>. Otros creen que la proteína *tau* media en el efecto tóxico del A $\beta$  ya que sin esta proteína el A $\beta$  no

<sup>17</sup> Grueninger F, Bohrmann B, Czech C, Ballard TM, Frey JR, Weidensteiner C, et al. Phosphorylation of tau at S422 is enhanced by Abeta in TauPS2APP triple transgenic mice. *Neurobiol Dis.* 2010; 37: 294-306.

puede afectar al transporte axonal (figura 6B)<sup>18</sup>. Finalmente, también puede pensarse que existe sinergia entre ambos mecanismos y que por tanto el A $\beta$  y la proteína *tau* ejercerían, cada uno por su lado, un efecto perjudicial sobre las células (figura 6C)<sup>19</sup>. El hecho de que los dos puedan presentar cierto efecto tóxico podría explicar porque Oddo y cols. observaron que la disminución del A $\beta$  soluble y *tau*, mejoraba el déficit cognitivo sin embargo la disminución únicamente del A $\beta$  soluble no ejerció efecto alguno sobre este parámetro<sup>20</sup>. Tal vez, la disminución de un único factor no sea suficiente para conseguir mejoras a nivel cognitivo, ya que los dos tienen un efecto perjudicial.



**Figura 6:** Posibles mecanismos de interacción entre la proteína *tau* y el A $\beta$  para producir el daño neuronal<sup>19</sup>.

<sup>18</sup> Vossel KA, Zhang K, Brodbeck J, Daub AC, Sharma P, Finkbeiner S, et al. Tau reduction prevents Abeta-induced defects in axonal transport. *Science*. 2010; 330: 198.

<sup>19</sup> Ittner LM, Götz J. Amyloid- $\beta$  and tau-a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2011; 12: 67-72.

<sup>20</sup> Oddo S, Vasilevko V, Caccamo A, Kitazawa M, Cribbs DH, LaFerla FM. Reduction of soluble Abeta and tau, but not soluble Abeta alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles. *J Biol Chem*. 2006; 281: 39413-39423.

## 12 Introducción

---

También es importante destacar que cuando se ha realizado un seguimiento, mediante distintas técnicas, de la progresión de la patología relacionada con la proteína *tau* en pacientes con la EA esta se correlaciona en mayor medida con el deterioro cognitivo y neuronal que la progresión del propio A $\beta$ <sup>21</sup>.

En los últimos años se ha demostrado que la  $\beta$ -APP, uniéndose al receptor DR6, puede activar la vía de las caspasas y por tanto puede resultar perjudicial para las neuronas por si misma antes de metabolizarse para formar los péptidos de A $\beta$ <sup>22</sup>. Por otro lado, el AICD, otro metabolito proveniente del metabolismo de la  $\beta$ -APP, parece que puede provocar unas alteraciones similares a las que se detectan en la EA<sup>23</sup> y además, también se ha visto que es perjudicial para el proceso de neurogénesis<sup>24</sup>. Por otro lado, en varios trabajos de investigación ha quedado reflejado que la apolipoproteína E4 (APOE4), el factor de riesgo más relacionado con el Alzheimer de origen no genético, tiene una serie de efectos perjudiciales sobre las neuronas que son independientes del A $\beta$ <sup>25</sup>. Todo esto indica que en la EA están implicados múltiples factores; no solo el A $\beta$  y la proteína *tau* como se había pensado hasta hace muy pocos años.

---

<sup>21</sup> Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC. Classification and basic pathology of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2009; 118: 5-36.

<sup>22</sup> Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary DDM, Tessier-Lavigne M. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature.* 2009; 457: 981-990.

<sup>23</sup> Ghosal K, Vogt DL, Liang M, Shen Y, Lamb BT, Pimplikar SW. Alzheimer's disease-like pathological features in transgenic mice expressing the APP intracellular domain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106: 18367-18377.

<sup>24</sup> Ghosal K, Stathopoulos A, Pimplikar SW. APP intracellular domain impairs adult neurogenesis in transgenic mice by inducing neuroinflammation. *PLoS ONE.* 2010; 5: e11866.

<sup>25</sup> Huang Y. A $\beta$ -independent roles of apolipoprotein E4 in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Mol Med.* 2010; 16: 287-294.

## 2. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Actualmente, solo existen dos tratamientos aprobados para la EA<sup>26</sup>, por un lado y debido a la falta de acetilcolina, que es una característica de esta enfermedad, se han sintetizado ***inhibidores de la acetilcolinesterasa*** (tacrina, donezepilo, rivastigmina, galantamina) y por otro lado se ha sintetizado un antagonista del receptor N-metil-D-aspartato, la ***memantina***, para proteger a las neuronas del efecto tóxico del glutamato. En la EA la enzima glutamato sintetasa está más activada por lo que la cantidad de glutamato es mayor. La memantina está aprobada para su utilización en estadios más avanzados de la enfermedad.

En los últimos años se han desarrollado formulaciones más complejas de estos fármacos con la idea de evitar sus efectos secundarios y de facilitar el cumplimiento del tratamiento por parte del paciente disminuyendo el número de dosis diarias, lo que ha supuesto un gran avance para los enfermos de Alzheimer<sup>27</sup>. Sin embargo, es importante recordar, que el efecto de estos fármacos es temporal y no tienen ninguna acción sobre la progresión de la enfermedad.

Por otro lado, aunque todavía no han sido aprobadas para su uso en humanos, se están estudiando nuevas terapias en diversos ensayos clínicos **(Tabla 1):**

---

<sup>26</sup> Citron M. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. Nat Rev Drug Discov. 2010; 9: 387-398.

<sup>27</sup> Di Stefano A, Iannitelli A, Laserra S, Sozio P. Drug delivery strategies for Alzheimer's disease treatment. Expert Opin Drug Deliv. 2011; 8: 581-603.

Mecanismo de Acción	Principio Activo	Fase Ensayo Clínico	Ref.
Inmunoterapia Activa	-CAD 106	-Fase II	-30
	-ACC-001	-Fase II	-31
	-V-950	-Fase I	-31
	-AD-02	-Fase II	-31
Inmunoterapia Pasiva	-Bapineuzumab	-Fase III	-33
	-Solanezumab	-Fase III	-34
	-Inmunoglobulinas intravenosas	-Fase III	-35
Inhibición de la oligomerización	“Epigallocatechin-3-gallate”	-Fase III	-36
Inhibición $\gamma$ -secretasa	-BMS-708163	-Fase II	-39
	-CHF-5074	-Fase II	-40
Activación $\alpha$ -secretasa	-Briostatina-1	-Fase II	-42
	-Exebryl-1	-Fase I	-43
Proteína <i>tau</i>	-Nicotinamida	-Fase II	-44
Factores neurotróficos	-NGF	-Fase I	-46
Receptores muscarínicos y nicotínicos	-EVP-6124	-Fase II	-48
Disminución disfunción mitocondrial	-Latrepirdina	-Fase III	-50
Otros	-Etanercept	-Fase I	-52
	-Raloxifeno	-Fase II	-53
	-Carvedilol	-Fase IV	-53

**TABLA 1:** Principios activos en fase clínica para el tratamiento de la EA.

A continuación se recogen distintas terapias que están siendo estudiadas para el tratamiento de la EA.

- **Inmunoterapia activa contra los péptidos de A $\beta$ :** uno de los principales problemas para el desarrollo de esta estrategia terapéutica es que el cerebro es un órgano inmuno-privilegiado y solo el 0,11% de los anticuerpos circulantes acceden al sistema nervioso central (SNC)<sup>28</sup>. Uno de los primeros ensayos clínicos que

<sup>28</sup> Pan W, Solomon B, Maness LM, Kastin AJ. Antibodies to beta-amyloid decrease the blood to brain transfer of beta-amyloid peptide. *Exp Biol Med.* 2002; 227: 609-615.

se realizaron para la EA fue con inmunoterapia activa frente al péptido A $\beta$ 42. Pero este ensayo tuvo que ser suspendido cuando se encontraba en fase II porque el 6% de los pacientes que participaban en él sufrieron meningoencefalitis<sup>29</sup>. Además, la función cognitiva no mejoró aunque los niveles de A $\beta$  descendieron. A pesar de todas estas dificultades, hoy en día se están realizando varios ensayos clínicos con vacunas frente a la EA, entre ellos se encuentran: el CAD-106 que en las primeras fases de los estudios en humanos ha demostrado inducir una respuesta anti-A $\beta$  IgG sin provocar la aparición de meningoencefalitis<sup>30</sup>, el ACC-001 (fase II)<sup>31</sup> y el V-950 (fase I)<sup>31</sup>. Por otro lado, también se encuentra en fase clínica un péptido que reproduce tan solo una zona específica del péptido A $\beta$ 42; el AD-02 (fase II)<sup>31</sup>.

- **Inmunoterapia pasiva contra los péptidos de A $\beta$ :** uno de los mayores problemas que presenta la vacunación pasiva es que en estudios realizados con ratones transgénicos se ha observado un aumento en el número de hemorragias asociadas a la angiopatía amiloide cerebral<sup>32</sup>. A pesar de todo, se han desarrollado distintos anticuerpos monoclonales que están siendo

---

<sup>29</sup> Ferrer I, Boada Rovira M, Sánchez Guerra ML, Rey MJ, Costa-Jussá F. Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 2004; 14: 11-20.

<sup>30</sup> Winblad BG, Minthon L, Floesser A, Imbert G, Dumortier T, He Y, et al. Results of the first-in-man study with the active A $\beta$  immunotherapy CAD106 in Alzheimer patients. *Alzheimers Dement.* 2009; 5 (4suppl1): 113-114.

<sup>31</sup> Schneeberger A, Mandler M, Ottawa O, Zauner W, Mattner F, Schmidt W. Development of AFFITOPE vaccines for Alzheimer's disease (AD)-from concept to clinical testing. *J Nutr Health Aging.* 2009; 13: 264-267.

<sup>32</sup> Brody DL, Holtzman DM. Active and passive immunotherapy for neurodegenerative disorders. *Annu Rev Neurosci.* 2008; 31: 175-193.

ensayados en humanos: bapineuzumab (fase III)<sup>33</sup> y solanezumab (fase III)<sup>34</sup>. La inmunoterapia pasiva también puede conseguirse mediante la infusión intravenosa de inmunoglobulinas procedentes de donantes sanos que posean anticuerpos policlonales anti-A $\beta$ . De hecho, se realizó un estudio con un número reducido de pacientes, observándose una buena tolerancia, disminución de la concentración de A $\beta$  en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y mejora o estabilización de la función cognitiva. Basándose en estos buenos resultados se aprobó el inicio de un ensayo clínico<sup>35</sup>.

- **Inhibición de la oligomerización:** el principal objetivo es evitar que los péptidos de A $\beta$  se unan entre sí impidiendo por tanto, la formación de las placas. Con ello se evitaría el efecto tóxico de las placas sobre las neuronas. Lo importante es conseguir un producto que atraviese la barrera hematoencefálica (BHE) y presente baja inmunogenicidad y toxicidad. En la actualidad, el producto “epigallocatechin-3-gallate” está siendo estudiado en fase III<sup>36</sup>.

- **Inhibición de la enzima  $\gamma$ -secretasa:** las importantes funciones fisiológicas que posee la enzima  $\gamma$ -secretasa hace difícil el diseño de un tratamiento basado en ella ya que su inhibición total

---

<sup>33</sup> Salloway S, Sperling R, Gilman S, Fox NC, Blennow K, Raskind M, et al. A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology*. 2009; 73: 2061-2070.

<sup>34</sup> Siemers ER, Friedrich S, Dean RA, Sheturaman G, DeMattos R, Jennings D, et al. Safety, tolerability and biomarker effects of an Abeta monoclonal antibody administered to patients with Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2008; 4 (4suppl 2): T774.

<sup>35</sup> Relkin NR, Szabo P, Adamiak B, Burgut T, Monthe C, Lent RW, et al. 18-Month study of intravenous immunoglobulin for treatment of mild Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*. 2009; 30: 1728-36.

<sup>36</sup> Mandel SA, Amit T, Kalfon L, Reznichenko L, Weinreb O, Youdim MB. Cell signaling pathways and iron chelation in the neurorestorative activity of green tea polyphenols: special reference to epigallocatechin gallate (EGCG). *J Alzheimers Dis*. 2008; 15: 211-222.



podría causar graves alteraciones a nivel cerebral. Pese a todo, se han estudiado varios inhibidores de la  $\gamma$ -secretasa en diferentes ensayos clínicos. Entre ellos el begacestat<sup>37</sup> y el PF-3084014<sup>38</sup> que disminuyeron los niveles de A $\beta$  sanguíneos pero no los del LCR. Actualmente, hay dos nuevos inhibidores de  $\gamma$ -secretasa en fase clínica; el BMS-708163<sup>39</sup> y el CHF-5074, ambos en fase II<sup>40</sup>.

- **Activación de la  $\alpha$ -secretasa:** la activación de la  $\alpha$ -secretasa debería disminuir la producción de péptidos de A $\beta$  y podría presentar potencial terapéutico en la EA. Varios agentes farmacológicos que han sido utilizados para el tratamiento de otras enfermedades como los estrógenos y las estatinas han demostrado presentar dicha actividad, sin embargo los ensayos clínicos realizados con dichos compuestos no han generado resultados satisfactorios<sup>41</sup>. Actualmente se encuentran en fase clínica 2 activadores de dicha enzima: briostatina-1<sup>42</sup> (fase II) y exebryl-1

---

<sup>37</sup> Jacobsen S, Comery T, Kreft A, Mayer S, Zaleska M, Riddell D, et al. GSI-953 is a potent APP-selective gammasecretase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2009; 5 (4 suppl 1): P139.

<sup>38</sup> Soares H, Raha N, Sikpi M, Liston D, Brodney M, Coffman K, et al. A $\beta$  variability and effect of gamma secretase inhibition on cerebrospinal fluid levels of A $\beta$  in healthy volunteers. *Alzheimers Dement*. 2009; 5 (4 Suppl 1): P252-253.

<sup>39</sup> Imbimbo BP. Alzheimer's disease:  $\gamma$ -secretase inhibitors. *Drug Discov Today Ther Strateg*. 2008; 5: 169-175.

<sup>40</sup> Imbimbo BP, Hutter-Paier B, Villetti G, Facchinetti F, Cenacchi V, Volta R, et al. CHF5074, a novel gamma-secretase modulator, attenuates brain beta-amyloid pathology and learning deficit in a mouse model of Alzheimer's disease. *Br J Pharmacol*. 2009; 156: 982-93.

<sup>41</sup> Griffiths HH, Morten IJ, Hooper NM. Emerging and potential therapies for Alzheimer's disease. *Expert Opin Ther Targets*. 2008; 12: 693-704.

<sup>42</sup> Etcheberrigaray R, Tan M, Dewachter I, Kuiperi C, Van der Auwera I, Wera S, et al. Therapeutic effects of PKC activators in Alzheimer's disease transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 11141-11146.

(fase I)<sup>43</sup>. Cabe destacar que los inhibidores de la acetilcolinesterasa (uno de los pocos tratamientos aprobados para la EA) también presentan capacidad de activar la  $\alpha$ -secretasa<sup>41</sup>.

- **Tratamientos basados en la proteína *tau*:** uno de los mecanismos para tratar la EA puede ser actuar sobre la proteína *tau* debido a que los ovillos neurofibrilares intracelulares están compuestos principalmente por esta sustancia. Debido a que en un principio se le otorgó mayor importancia al A $\beta$  se han sintetizado pocas moléculas con capacidad para actuar sobre la proteína *tau*. Sin embargo una de ellas se encuentra en estudio a nivel clínico; la nicotinamida que actúa estabilizando los microtúbulos (fase II)<sup>44</sup>.

- **Uso de factores neurotróficos:** en los últimos años se ha sugerido una posible relación entre el déficit del factor de crecimiento de las células nerviosas (NGF) y la neurodegeneración que aparece en la EA<sup>45</sup>. Además las neuronas colinérgicas dependen del NGF para su supervivencia y crecimiento axonal. En la actualidad se está realizando un ensayo clínico en fase I utilizando células encapsuladas para la liberación del NGF. En dicho ensayo clínico las células inmovilizadas han demostrado ser seguras y bien toleradas, además en 3 de los 6 pacientes incluidos en el estudio se ha observado un aumento de los receptores nicotínicos corticales lo que demuestra la efectividad del tratamiento<sup>46</sup>.

---

<sup>43</sup> Snow AD, Cummings J, Lake T, Hu Q, Esposito L, Cam J, et al. Exebryl-1: A novel small molecule currently in human clinical trials as a disease-modifying drug for the treatment of Alzheimer`s disease. *Alzheimer Dement*. 2009; 5 (4 suppl 1): P418.

<sup>44</sup> [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) (11-10-2011).

<sup>45</sup> Cattaneo A, Capsoni S, Paoletti F. Towards non invasive nerve growth factor therapies for Alzheimer`s disease. *J Alzheimers Dis*. 2008; 15: 255-283.

<sup>46</sup> [www.nsgene.dk](http://www.nsgene.dk) (10-10-2011).

- **Receptores nicotínicos y muscarínicos:** en la EA se producen alteraciones en la transmisión colinérgica, por tanto en la búsqueda de tratamientos para esta enfermedad otra posibilidad es la actuación sobre los receptores de acetilcolina. Sin embargo, dichos receptores presentan el problema de la selectividad ya que se ha demostrado que lo importante es actuar sobre el subtipo M1 de los receptores muscarínicos y no sobre el subtipo M2<sup>47</sup>. En los últimos años se han estudiado a nivel clínico numerosos agonistas de los receptores nicotínicos y muscarínicos y algunos de ellos se están estudiando a nivel preclínico pero desgraciadamente ninguno ha demostrado ser eficaz. Actualmente, se está realizando un ensayo clínico con el agonista parcial nicotínico EVP-6124, que se encuentra en fase II<sup>48</sup>.

- **Disfunción mitocondrial:** durante los últimos años se ha postulado que el A $\beta$  podría entrar en la mitocondria de la célula afectando a sus componentes e incrementando el daño oxidativo<sup>49</sup>. La latrepirdina es un compuesto que parece tener capacidad de actuar sobre los poros mitocondriales disminuyendo su permeabilidad mientras incrementa la producción de ATP en la mitocondria. Por ello, dicho compuesto se está estudiando a nivel clínico junto con el donezepilo y la memantina<sup>50</sup>.

---

<sup>47</sup> Fisher A. Cholinergic treatments with emphasis on m1 muscarinic agonist as potential disease-modifying agents for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*. 2008; 5: 433-442.

<sup>48</sup> Mangialasche F, Solomon A, Winblad B, Mecocci P, Kivipelto M. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol*. 2010; 9: 702-716.

<sup>49</sup> Hansson Petersen CA, Alikhani N, Behbahani H, Wiehager B, Pavlov PF, Alafuzoff I, et al. The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 13145-13150.

<sup>50</sup> Tariot P, Sabbagh M, Flitman S, Reyes P, Taber L, Seely L. A safety, tolerability and pharmacokinetic study of dimebon in patients with Alzheimer's disease already receiving donepezil. *Alzheimer's Dement*. 2009; 5(suppl 1): P251.

- **Otras alternativas:** en un número importante de estudios se ha demostrado que el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) ejerce un papel importante en la EA, ya que incrementa la producción de A $\beta$  y además el bloqueo de sus receptores disminuye su toxicidad<sup>51</sup>. Por ello se está realizando un ensayo clínico con el inhibidor del TNF- $\alpha$  etanercept<sup>52</sup>. También se están estudiando, a nivel clínico, otro tipo de compuestos como el carvedilol<sup>53</sup> (fase IV) y el raloxifeno<sup>53</sup> (fase II).

Una de las principales causas para que la mayoría de los tratamientos ensayados hayan fracasado podría ser el diagnóstico tardío de la enfermedad. Por ello se está trabajando en la elaboración de técnicas que permitan diagnosticar la enfermedad en una etapa más precoz, facilitando de este modo el comienzo del tratamiento cuando el número de neuronas muertas no sea tan elevado. De esta manera, los tratamientos que a día de hoy no han sido efectivos podrían llegar a serlo. Una de esas técnicas es la resonancia magnética (RM) con la que se analizaría la atrofia cerebral<sup>54</sup>. Esto permitiría estudiar la neurodegeneración que ya es significativa en las fases preclínicas de la enfermedad. Cabe destacar que esta técnica se ha utilizado de manera complementaria, en algunos ensayos clínicos como el realizado con el tramiprosato y aunque el producto estudiado no mejoró el estado cognitivo del paciente, con el uso de la RM se observó que la pérdida del volumen hipocampal era menor en el grupo tratado. Como herramienta para una detección precoz de

---

<sup>51</sup> Medeiros R, Prediger RDS, Passos GF, Pandolfo P, Duarte FS, Franco JL, et al. Connecting TNF- $\alpha$  signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer disease: relevance for the behavioral and synaptic deficit induced by amyloid  $\beta$  protein. *J Neurosci*. 2007; 27: 5394-5404.

<sup>52</sup> Tobinick EL, Gross H. Rapid improvement in verbal fluency and aphasia following perispinal etanercept in Alzheimer`s disease. *BMC Neurol*. 2008; 8: 27.

<sup>53</sup> [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) (10-10-2011).

<sup>54</sup> McEvoy LK, Brewer JB. Quantitative structural MRI for early detection of Alzheimer`s disease. *Expert Rev Neurother*. 2010; 10: 1675-1688.

la EA, en otro estudio, se ha propuesto la utilización de la ecocardiografía de la arteria carótida junto a la imagen por ultrasonidos<sup>55</sup>. El principal objetivo de la aplicación de estas técnicas es el estudio de la circulación sanguínea cerebral, ya que en los pacientes con Alzheimer se suele encontrar alterada en las fases presintomáticas de la enfermedad.

Desafortunadamente, estas técnicas no han sido desarrolladas en profundidad y por tanto deberán transcurrir varios años hasta que se demuestre su aplicabilidad.

---

<sup>55</sup> De la Torre JC. Carotid artery ultrasound and echocardiography testing to lower the prevalence of Alzheimer's disease. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2009; 18: 319-328.

### 3. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y GENES

Solo el 10% de los casos de la EA están relacionados con factores genéticos<sup>56</sup>. Los genes estudiados en relación con la EA son numerosos pero los resultados a día de hoy no son nada clarificadores<sup>57,58</sup>. En la figura 7 se recogen los genes identificados que podrían tener alguna relación con la EA. En los casos en los que el Alzheimer tiene un origen genético, los genes que han sufrido modificaciones guardan relación con la  $\beta$ -APP o con las enzimas que la metabolizan<sup>59</sup>.

Sin embargo, cuando el Alzheimer no está originado por una alteración genética, aunque se han estudiado numerosos genes sospechosos de aumentar el riesgo de padecer la EA, los resultados no han sido nada consistentes<sup>60</sup>. El gen que más relacionado parece estar con esta enfermedad es el de la APOE<sup>56,57,58</sup>. Este gen presenta 3 polimorfismos y las personas que tienen el alelo 4, aunque este no haya sufrido mutación alguna, tienen más posibilidades de desarrollar la enfermedad. Este gen está relacionado con el colesterol siendo este precisamente uno de los productos relacionados con la eliminación de los péptidos de A $\beta$ <sup>58</sup>. En los últimos años, se han identificado varios genes que aumentan el riesgo de padecer la enfermedad como son: el CLU que codifica la

---

<sup>56</sup> Waring SC, Rosenberg RN. Genome-wide association studies in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2008; 65: 329-334.

<sup>57</sup> Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet.* 2007; 39: 17-23.

<sup>58</sup> Llorca J, Rodríguez-Rodríguez E, Dierssen-Sotos T, Delgado-Rodríguez M, Berciano J, Combarros O. Meta-analysis of genetic variability in the  $\beta$ -amyloid production, aggregation and degradation metabolic pathways and the risk of Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand.* 2008; 117: 1-14.

<sup>59</sup> Bettens K, Sleegers K, Van Broeckhoven C. Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future. *Hum Mol Genet.* 2010; 19: 4-11.

<sup>60</sup> Wollmer MA. Cholesterol-related genes in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1801: 762-773.

apolipoproteína J<sup>61</sup>, el CR1 que codifica proteínas relacionadas con el complemento<sup>62</sup> y el PICALM<sup>61</sup>. Cabe destacar que los 3 genes están estrechamente relacionados con el metabolismo de los péptidos de A $\beta$ .

Recientemente se ha demostrado que un gen relacionado con el sistema vascular, debido a que su función es modular la diferenciación celular, tiene su expresión alterada en la EA<sup>63,64</sup>. En los ensayos realizados con animales transgénicos la inhibición de la expresión de este gen disminuía la densidad capilar afectando al flujo sanguíneo cerebral<sup>64</sup>. Además, uno de los receptores del A $\beta$  en las células endoteliales de la BHE estaba menos expresado<sup>64</sup> afectando por tanto a su eliminación. Esto fortalecería más si cabe la teoría vascular antes explicada.

Por último, existen algunos trabajos que han estudiado la relación existente entre los polimorfismos de los genes del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) con la posibilidad de desarrollar la EA. Entre los distintos grupos de investigación que estudian esta relación se ha producido cierta controversia dado que mientras algunos grupos no han encontrado ninguna relación<sup>65,66</sup> otros grupos, han encontrado que ciertos polimorfismos de los genes de VEGF aumentan la posibilidad de padecer la EA<sup>67,68</sup>.

---

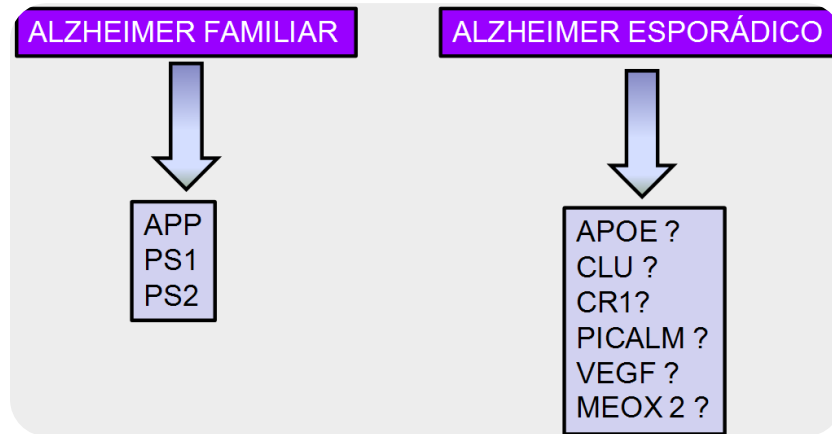
<sup>61</sup> Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2009; 41: 1088-1093.

<sup>62</sup> Lambert JC, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2009; 41: 1094-1099.

<sup>63</sup> De la Torre JC. Cerebrovascular gene linked to Alzheimer's disease pathology. *Trends Mol Med.* 2005; 11: 534-536.

<sup>64</sup> Wu Z, Guo H, Chow N, Sallstrom J, Bell RD, Deane R, et al. Role of the MEOX2 homeobox gene in neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Med.* 2005; 11: 959-965.

<sup>65</sup> Chapuis J, Tian J, Shi J, Bensemain F, Cottel D, Lendon C, et al. Association study of the vascular endothelial growth factor gene with the risk of developing Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2006; 27:1212-1215.



*Figura 7: Genes que podrían tener alguna relación con la EA.*

## 4. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y EL SISTEMA NEUROVASCULAR

Cuando comenzó a estudiarse la EA se le concedió el papel principal a las placas de A $\beta$  al pensar que estas provocaban la degeneración de las neuronas colinérgicas. Pero en los últimos años se ha visto que antes de que pueda observarse la aparición de las placas, el daño neuronal ya se ha producido y también se ha demostrado que los péptidos de A $\beta$  solubles son neurotóxicos<sup>69</sup>.

---

<sup>66</sup> Landgren S, Palmér MS, Skoog I, Minthon L, Wallin A, Andreasen N, et al. No association of VEGF polymorphisms with Alzheimer's disease. *Neuromol Med.* 2010; 12: 224-228.

<sup>67</sup> Del Bo R, Scarlato M, Ghezzi S, Martinelli Boneschi F, Fenoglio C, Galbiati S, et al. Vascular endothelial growth factor gene variability is associated with increased risk for AD. *Ann Neurol.* 2005; 57: 373-380.

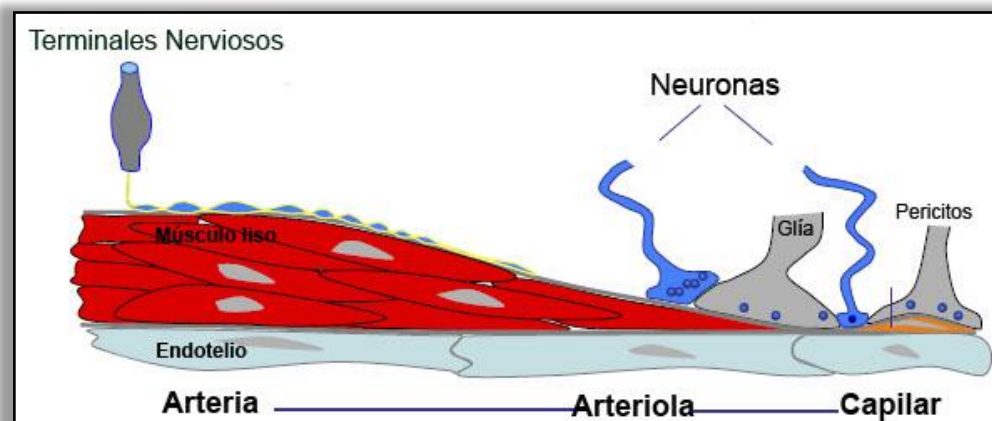
<sup>68</sup> Smach MA, Charfeddine B, Othman LB, Lammouchi T, Ltaief A, Nafati S, et al. -1154G/A and -2578C/A polymorphisms of the vascular endothelial growth factor gene in Tunisian Alzheimer patients in relation to  $\beta$ -amyloid (1-42) and total tau protein. *Neurosci Lett.* 2010; 472: 139-142.

<sup>69</sup> Jin M, Shepardson N, Yang T, Chen G, Walsh D, Selkoe DJ. Soluble amyloid  $\beta$ -protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108: 5819-5824.



Por ello se ha comenzado a estudiar una posible relación entre la EA y el sistema neurovascular.

A nivel cerebral, las neuronas, las células gliales, los astrocitos, las células endoteliales y las células del músculo liso vascular están unidos entre sí formando el denominado sistema neurovascular<sup>70</sup> (figura 8), esto supone que una alteración en uno de ellos podría afectar a todos los demás.



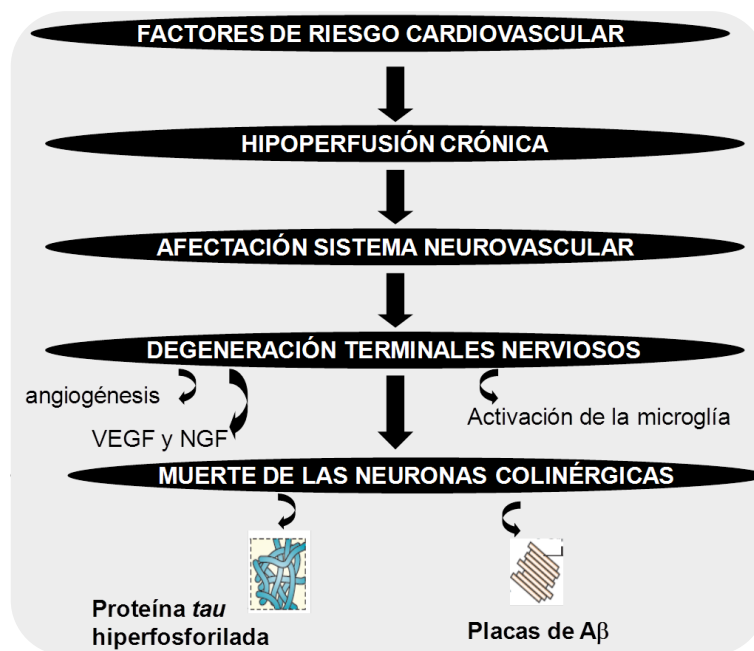
**Figura 8:** Representación del sistema neurovascular<sup>70</sup>.

En el caso de la EA podría darse el caso de que cuando la circulación sanguínea cerebral está alterada el A $\beta$  no se elimine bien, y esto active a la microglía provocando una respuesta inflamatoria. Esta respuesta inflamatoria en un principio podría entenderse como un mecanismo de defensa ya que la microglía expresa varias enzimas con capacidad para degradar el A $\beta$ <sup>71</sup>. Sin embargo, esta respuesta con el avance de la enfermedad se vuelve perjudicial porque la microglía deja de producir las enzimas que degradan el A $\beta$  a la vez que comienza a producir citoquinas que afectan a las neuronas.

<sup>70</sup> Bell RD, Zlokovic BV. Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2009; 118: 103-113.

<sup>71</sup> Hickman SE, Allison EK, El Khoury J. Microglial dysfunction and defective  $\beta$ -Amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci.* 2008; 28: 8354-8360.

Una posible unión entre el sistema vascular y la EA viene dada por la llamada **hipótesis vascular**<sup>72</sup> (Figura 9). Según dicha hipótesis los factores de riesgo vasculares tales como la hipercolesterolemia, la hipoglucemia o la hipertensión podrían provocar una hipoperfusión crónica que dañaría el sistema neurovascular. En un primer momento afectaría a la sinapsis neuronal pero con el tiempo podría acabar provocando una degeneración de los terminales nerviosos. Todo esto podría desencadenar la actuación de diferentes mecanismos de defensa como son la activación de la microglía, la liberación de factores neurotróficos (VEGF y NGF) y la angiogénesis. Si con esto no se corrigiera la situación, las neuronas colinérgicas acabarían muriéndose. Finalmente, se acumularía la proteína *tau* y se formarían las placas de A $\beta$  características de la EA.



**Figura 9:** Esquema de la hipótesis vascular<sup>72</sup>.

<sup>72</sup> Humpel C, Marksteiner J. Cerebrovascular damage as a cause for Alzheimer's disease. *Curr Neurovasc Res.* 2005; 2: 341-347.

Esta teoría podría dar una explicación al hecho de que el A $\beta$  aún siendo un producto fisiológico secretado por distintas células, y que está presente en el plasma y en el LCR, se acumula en el cerebro en la EA<sup>73</sup>. En la EA, al estar el sistema neurovascular afectado, la eliminación del A $\beta$  estaría disminuida acumulándose por tanto a nivel cerebral. Además, esta alteración vascular puede provocar la entrada en el cerebro de una mayor cantidad de A $\beta$  proveniente del plasma. Cada vez son más los estudios que demuestran que la BHE se encuentra alterada en la EA dificultando la eliminación del A $\beta$ <sup>74</sup> y permitiendo su paso del plasma al cerebro<sup>75</sup>. También cabe mencionar que en los últimos años ha quedado demostrado que el alelo 4 de la APOE, elimina el A $\beta$  más lentamente y precisamente ese alelo es uno de los mayores factores de riesgo para EA de origen no genético<sup>76</sup>.

Un hecho importante a destacar es que en la mayoría de los pacientes no se ha detectado una sobreproducción de A $\beta$  pero si se ha visto que varios receptores relacionados con su eliminación están alterados<sup>77</sup>. Además, mediante el uso de varias técnicas como son la RM, el doppler transcraneal y la tomografía computarizada se ha demostrado que, en los pacientes con Alzheimer, la circulación sanguínea está disminuida desde los inicios de la

---

<sup>73</sup> Zlokovic BV. Vascular disorder in Alzheimer's disease: role in pathogenesis of dementia and therapeutic targets. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002; 54: 1553-1559.

<sup>74</sup> Dickstein DL, Walsh J, Brautigam H, Stockton SD, Gandy S, Hof PR. Role of vascular risk factors and vascular dysfunction in Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med.* 2010; 77: 82-102.

<sup>75</sup> Thal DR. The precapillary segment of the blood-brain barrier and its relation to perivascular drainage in Alzheimer's disease and small vessel disease. *Scientific World Journal.* 2009; 9: 557-563.

<sup>76</sup> Deane R, Sagare A, Hamm K, Parisi M, Lane S, Finn MB, et al. ApoE isoform-specific disruption of amyloid  $\beta$  peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest.* 2008; 118: 4002-4013.

<sup>77</sup> Deane R, Wu Z, Zlokovic BV. RAGE (Yin) versus LRP (Yang) balance regulates Alzheimer amyloid  $\beta$ -peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke.* 2004; 35: 2628-2631.

enfermedad<sup>78</sup> y esta falta de flujo sanguíneo afecta también a las síntesis de proteínas cerebrales dificultando los procesos de aprendizaje y de memoria. También es importante mencionar que, aunque en las arterias cerebrales con mayor diámetro no se han detectado placas si se ha visto que sufren aterosclerosis lo que podría estar afectando el flujo sanguíneo y provocando hipoperfusión<sup>79</sup>.

Aunque no se sabe a ciencia cierta si la alteración vascular es causa o efecto de la enfermedad, el daño neuronal por sí solo no podría justificar ciertas alteraciones que se han detectado en la EA<sup>79</sup>. Entre estas alteraciones estarían la aterosclerosis en las arterias intracerebrales, la respuesta inflamatoria, la senescencia vascular y las alteraciones detectadas en los receptores de los péptidos de A $\beta$  o en la reparación vascular. Además, se ha demostrado que el A $\beta$  solo tiene capacidad de afectar a la memoria si el flujo sanguíneo cerebral se encuentra disminuido<sup>80</sup>.

Uno de los trabajos epidemiológicos más importantes realizados fue el estudio Róterdam en el que se estudió la relación entre varios factores de riesgo y la EA y contó con la participación de más de 7000 pacientes<sup>81,82</sup>. En este estudio se demostró que todos los factores de riesgo que aumentaban la probabilidad de padecer la EA (figura 10) estaban relacionados con el sistema neurovascular porque reducían la perfusión cerebral. Además, dichos factores en muchos casos estaban presentes mucho antes de que la enfermedad

---

<sup>78</sup> Johnson NA, Jahng GH, Weiner MW, Miller BL, Chui HC, Jagust WJ, et al. Pattern of cerebral hypoperfusion in Alzheimer disease and mild cognitive impairment measured with arterial spin-labeling MR imaging: initial experience. *Radiology*. 2005; 234: 851-859.

<sup>79</sup> Zlokovic BV. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci*. 2005; 28: 202-208.

<sup>80</sup> Sun MK, Alkon DL. Cerebral hypoperfusion and amyloid-induced synergistic impairment of hippocampal CA1 synaptic efficacy and spatial memory in young adult rats. *J Alzheimers Dis*. 2004; 6: 355-366.

<sup>81</sup> Breteler MMB. Vascular risk factors for Alzheimer's disease: An epidemiologic perspective. *Neurobiol Aging*. 2000; 21: 153-160.

<sup>82</sup> De la Torre JC. Alzheimer disease as a vascular disorder. *Stroke*. 2002; 33: 1152-1162.

empiece a desarrollarse. En dicho estudio también se vio que los pacientes con menor flujo cerebral sanguíneo tienen más posibilidades de padecer demencia por lo que puede afirmarse que la hipoperfusión precede a la demencia e incluso puede contribuir a ella<sup>83</sup>. En un modelo de ratón transgénico, el J20, se ha estudiado el efecto de la hipoperfusión y se ha demostrado que esta aceleraba la pérdida de memoria y del número de neuronas en el hipocampo<sup>84</sup>. Estos datos demuestran de manera directa los efectos nocivos de los factores de riesgo sobre el sistema neurovascular.



*Figura 10: Principales factores de riesgo para la EA.*

En otros estudios<sup>85,86</sup> se ha observado que procesos patológicos que alteran el sistema vascular, como la isquemia cerebral, provocan el aumento en la producción de los péptidos de A $\beta$ .

<sup>83</sup> Ruitenbergh A, den Heijer T, Bakker SLM, van Swieten JC, Koudstaal PJ, Hofman A, et al. Cerebral hypoperfusion and clinical onset of dementia: The Rotterdam study. *Ann Neurol*. 2005; 57: 789-794.

<sup>84</sup> Yamada M, Ihara M, Okamoto Y, Maki T, Washida K, Kitamura A, et al. The influence of chronic cerebral hypoperfusion on cognitive function and amyloid  $\beta$  metabolism in APP overexpressing mice. *PLoS ONE*. 2011; 6: e16567

<sup>85</sup> Qi JP, Wu H, Yang Y, Wang DD, Chen YX, Gu YH, et al. Cerebral ischemia and Alzheimer's disease: The expression of Amyloid- $\beta$  and Apolipoprotein E in human hippocampus. *J Alzheimers Dis*. 2007; 12: 335-341.

Estudios epidemiológicos más recientes han servido para corroborar los resultados del estudio Róterdam, ya que la mayoría de los factores que afectan al sistema cardiovascular incrementan las posibilidades de padecer Alzheimer<sup>87,88</sup>. Dos claros ejemplos de que los factores de riesgo cardiovasculares afectan a la función cognitiva podrían ser: 1. La mejora de esta cuando se administró el antihipertensivo olmersartán a un modelo agudo inducido de Alzheimer<sup>89</sup>. 2. La hipercolesterolemia afecta al sistema colinérgico provocando problemas de memoria e inflamación<sup>90</sup>

En algunos casos la hipoperfusión puede estar generada por motivos genéticos, ya que varios productos que tienen como función contraer las arterias se producen en una cantidad más elevada provocando la disminución del flujo sanguíneo. Este fenómeno se manifiesta de forma más notoria en las células del músculo liso vascular en la EA<sup>91</sup>. Además, se ha visto que en estos casos también se produce una hipoexpresión del receptor de la lipoproteína de baja densidad (LRP) que serviría para transportar el A $\beta$  del cerebro al plasma<sup>92</sup>.

---

<sup>86</sup> Cole SL, Vassar R. Linking vascular disorders and Alzheimer's disease: Potential involvement of BACE1. *Neurobiol Aging*. 2009; 30: 1535-1544.

<sup>87</sup> Altman R, Rutledge JC. The vascular contribution to Alzheimer's disease. *Clin Sci (Lond)*. 2010; 119: 407-421.

<sup>88</sup> Qui C, Xu W, Fratiglioni L. Vascular and psychosocial factors in Alzheimer's disease: epidemiological evidence toward intervention. *J Alzheimers Dis*. 2010; 20: 689-697.

<sup>89</sup> Takeda S, Sato N, Takeuchi D, Kurinami H, Shinohara M, Niisato K, et al. Angiotensin receptor blocker prevented  $\beta$ -Amyloid-induced cognitive impairment associated with recovery of neurovascular coupling. *Hypertension*. 2009; 54: 1345-1352.

<sup>90</sup> Ullrich C, Pirchl M, Humpel C. Hypercholesterolemia in rats impairs the cholinergic system and leads to memory deficits. *Mol Cell Neurosci*. 2010; 45: 408-417.

<sup>91</sup> Chow N, Bell RD, Deane R, Streb JW, Chen J, Brooks A, et al. Serum response factor and myocardin mediate arterial hypercontractility and cerebral blood flow dysregulation in Alzheimer's phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 823-828.

<sup>92</sup> Bell RD, Deane R, Chow N, Long X, Sagare A, Singh I, et al. SRF and myocardin regulate LRP-mediated amyloid-beta clearance in brain vascular cells. *Nat Cell Biol*. 2009; 11: 143-153.

Por otro lado, algunos de los factores que disminuyen el riesgo de padecer EA como son la estimulación cognitiva y física han demostrado aumentar la angiogénesis<sup>93</sup>.

Por último, un hecho más que relevante es que en varios estudios<sup>94,95</sup> se ha demostrado que los fármacos que estimulan el sistema colinérgico también incrementan el flujo sanguíneo del cerebro por lo que su efecto podría estar más relacionado con el aumento de la perfusión sanguínea y no tanto con el aumento de los niveles de acetilcolina. En otro trabajo se vio que en los pacientes en los que los fármacos colinérgicos mostraron efecto la perfusión sanguínea mejoró y en los pacientes que no respondieron al tratamiento la perfusión sanguínea se mantuvo constante<sup>95</sup>. Un ejemplo que demuestra lo anteriormente mencionado es la capacidad del Donezepilo, uno de los inhibidores de la acetilcolinesterasa, de promover la angiogénesis en un modelo de isquemia (figura 11). Esto hace pensar que su efecto no solo se debe al incremento de la cantidad de acetilcolina en el cerebro, sino que mediante la angiogénesis estaría favoreciendo la eliminación de los péptidos de A $\beta$ <sup>96</sup>.

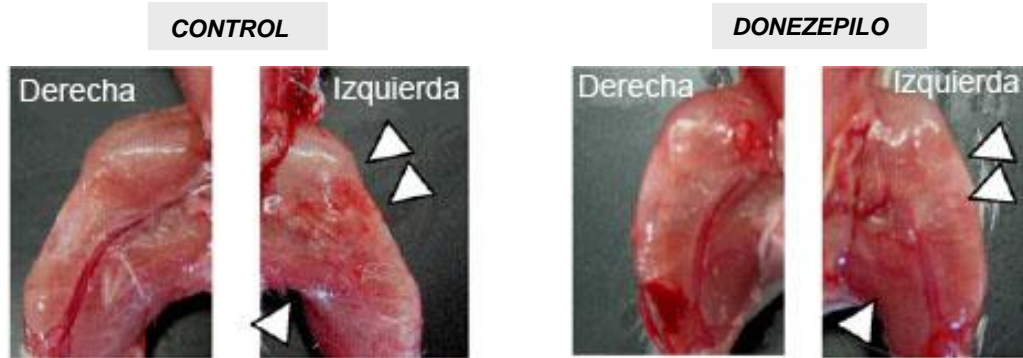
---

<sup>93</sup> Herring A, Yasin H, Ambrée O, Sachser N, Paulus W, Keyvani K. Environmental enrichment counteracts Alzheimer's neurovascular dysfunction in tgCRND8 mice. *Brain Pathol.* 2008; 18: 32-39.

<sup>94</sup> Rosengarten B, Paulsen S, Burr O, Kaps M. Neurovascular coupling in Alzheimer patients: Effect of acetylcholine-esterase inhibitors. *Neurobiol Aging.* 2009; 30: 1918-1923.

<sup>95</sup> Claassen JAHR, Jansen RWMM. Cholinergically mediated augmentation of cerebral perfusion in Alzheimer's disease and related cognitive disorders: The cholinergic-vascular hypothesis. *J Gerontol.* 2006; 61A: 267-271.

<sup>96</sup> Kakinuma Y, Furihata M, Akiyama T, Arikawa M, Handa T, Katare RG, et al. Donezepil, an acetylcholinesterase inhibitor against Alzheimer's dementia, promotes angiogenesis in an ischemic hindlimb model. *J Mol Cell Cardiol.* 2010; 48: 680-693.



**Figura 11:** El donezepilo induce angiogénesis en ratones C57 BL6/J con isquemia a la vez que suprime la atrofia muscular inducida por esta<sup>96</sup>.

## 5. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER Y VEGF

El VEGF presenta fundamentalmente una función angiogénica. Pero en los últimos años se ha visto que también posee efectos neuroprotectores<sup>97,98</sup> y neurogénicos<sup>99,100,101,102</sup>. En la figura 12 pueden observarse los diversos efectos que tiene el VEGF sobre distintos tipos de células.

---

<sup>97</sup> Storkebaum E, Lambrechts D, Carmeliet P. VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *BioEssays*. 2004; 26: 943-954.

<sup>98</sup> Ortuzar N, Argandoña EG, Bengoetxea H, Lafuente JV. Combination of intracortically administered VEGF and environmental enrichment enhances brain protection in developing rats. *J Neural Transm*. 2011; 118: 135-144.

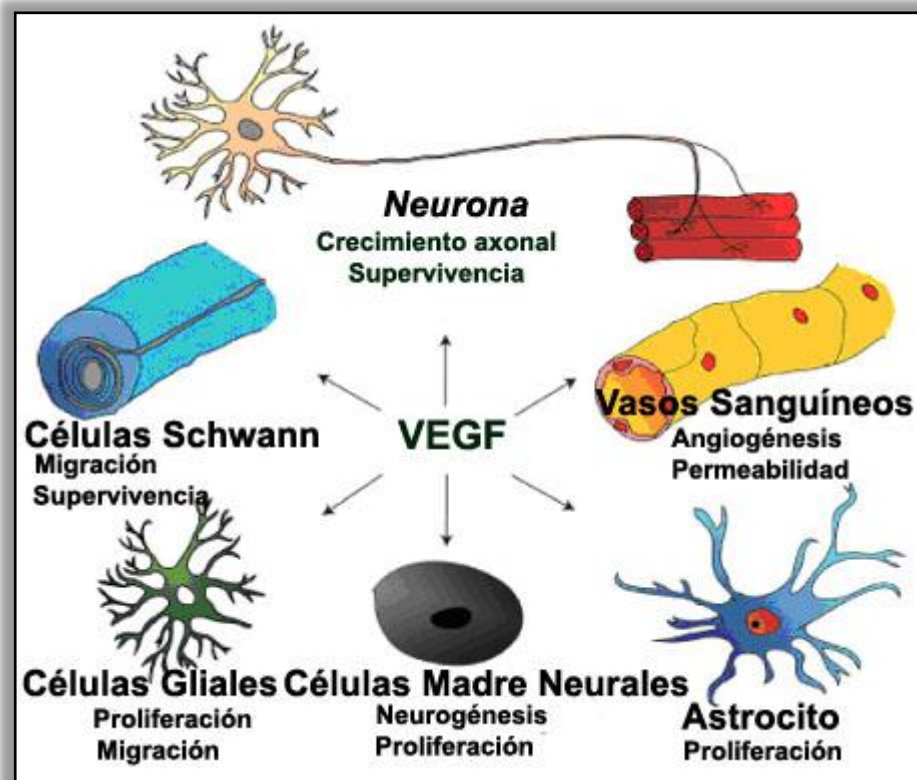
<sup>99</sup> Galvan V, Greenberg DA, Jin K. The role of vascular endothelial growth factor in neurogenesis in adult brain. *Mini Rev Med Chem*. 2006; 6: 667-669.

<sup>100</sup> Wang Y, Jin K, Mao XO, Xie L, Banwait S, Marti HH, et al. VEGF-overexpressing transgenic mice show enhanced post-ischemic neurogenesis and neuromigration. *J Neurosci Res*. 2007; 85: 740-747.

<sup>101</sup> Wang YQ, Guo X, Qiu MH, Feng XY, Sun FY. VEGF overexpression enhances striatal neurogenesis in brain of adult rat after a transient middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Res*. 2007; 85: 73-82.

<sup>102</sup> Lee C, Agoston DV. Vascular endothelial growth factor is involved in mediating increased *de novo* hippocampal neurogenesis in response to traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2010; 27: 541-553.





**Figura 12:** Efectos del VEGF sobre varias líneas celulares<sup>97</sup>.

En un estudio realizado por Moser y Humpel el VEGF contrarrestó el efecto tóxico que el N-metil-D-aspartato ejerce sobre las neuronas colinérgicas del núcleo basal de Meynert, tanto en los ensayos *in vitro* como en los realizados *in vivo*<sup>103</sup>.

En otros estudios<sup>100,101</sup> se ha demostrado igualmente que el VEGF, en caso de isquemia, aumenta la neurogénesis en la zona subventricular del cerebro y esas neuronas que se han formado tienen capacidad para llegar a la zona dañada del cerebro<sup>99</sup>.

<sup>103</sup> Moser KV, Humpel C. Vascular endothelial growth factor counteracts NMDA-induced cell death of adult cholinergic neurons in rat basal nucleus of Meynert. *Brain Res Bull.* 2005; 65: 125-131.

Algunos estudios<sup>104</sup> revelan que los niveles tanto cerebrales como séricos de VEGF están alterados en la EA. Los niveles séricos de VEGF estarían disminuidos mientras los niveles cerebrales estarían aumentados.

Varios grupos de investigación<sup>105,106</sup> defienden el uso de la terapia anti-angiogénica al estar elevados los niveles de VEGF. Estos grupos defienden la hipótesis de que en la EA se produce una angiogénesis excesiva, es decir patológica, que vendría acompañada por una secreción de factores neurotóxicos que acabarían generando daño neuronal.

Sin embargo, un hecho demostrado es que en la EA, a pesar de estar aumentados los niveles cerebrales de VEGF, la formación de vasos sanguíneos está disminuida<sup>107</sup>. Esto puede ser debido a varias causas: en primer lugar, a que el VEGF que se produce a nivel cerebral no sea funcional y en segundo lugar, a que el VEGF al tener afinidad por los péptidos de A $\beta$  se una a ellos no pudiendo realizar su función angiogénica<sup>108</sup>.

Al estar la formación de los vasos sanguíneos disminuida la eliminación de los péptidos de A $\beta$  podría verse afectada acumulándose estos en el cerebro aunque la cantidad que se produzca sea la misma. Además, teniendo en cuenta la función neurogénica y neuroprotectora del VEGF, una alteración funcional de este factor no solo afectaría a la eliminación de los péptidos de A $\beta$  sino también afectaría a la supervivencia de las neuronas.

---

<sup>104</sup> Mateo I, Llorca J, Infante J, Rodríguez-Rodríguez E, Fernández-Viadero C, Peña N, et al. Low serum VEGF levels are associated with Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand.* 2007; 116: 56-58.

<sup>105</sup> Vagnucci AH, Li WW. Alzheimer's disease and angiogenesis. *Lancet.* 2003; 361: 605-608.

<sup>106</sup> Thirumangalakudi L, Samany PG, Owoso A, Wiskar B, Grammas P. Angiogenic proteins are expressed by brain blood vessels in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2006; 10: 111-118.

<sup>107</sup> Girouard H, Iadecola C. Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke and Alzheimer disease. *J Appl Physiol.* 2006; 100: 328-335.

<sup>108</sup> Yang SP, Bae DG, Kang HJ, Gwag BJ, Gho YS, Chae CB. Co-accumulation of vascular endothelial growth factor with beta-amyloid in the brain of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2004; 25: 283-290.

En los últimos años se ha visto que el VEGF y los péptidos de A $\beta$  guardan cierta relación entre ellos. El A $\beta$  puede bloquear uno de los receptores del VEGF impidiendo que ejerza su función correctamente<sup>109</sup>, mientras que el VEGF tiene capacidad de actuar sobre el metabolismo de la  $\beta$ -APP<sup>110,111</sup> de la cual provienen los péptidos de A $\beta$ . Estos estudios demuestran, la ya conocida relación existente entre el VEGF y el A $\beta$ .

## 6. MODELOS MURINOS TRANSGÉNICOS PARA EL ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Tal y como se ha comentado anteriormente aunque la EA no tenga una etiología genética se han descubierto algunos genes que podrían tener cierta relación con la enfermedad. Por ello, se han desarrollado varios modelos de ratones transgénicos en los cuales se han modificado aquellos genes que podrían estar relacionados con la enfermedad. En muchos casos se ha modificado un único gen pero también se ha llegado a modificar 2 ó 3 genes en el mismo ratón.

---

<sup>109</sup> Patel NS, Mathura VS, Bachmeier C, Beaulieu-Abdelahad D, Laporte V, Weeks O, et al. Alzheimer's  $\beta$ -amyloid peptide blocks vascular endothelial growth factor mediated signaling via direct interaction with VEGFR-2. *J Neurochem.* 2010; 112: 66-76.

<sup>110</sup> Bürger S, Noack M, Kirazov LP, Kirazov EP, Naydenov CL, Kouznetsova E, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) affects processing of amyloid precursor protein and  $\beta$ -amyloidogenesis in brain slice cultures derived from transgenic Tg2576 mouse brain. *Int J Dev Neurosci.* 2009; 27: 517-523.

<sup>111</sup> Bürger S, Yafai Y, Bigl M, Wiedemann P, Schliebs R. Effect of VEGF and its receptor antagonist SU-5416, an inhibitor of angiogenesis, on processing of the  $\beta$ -amyloid precursor protein in primary neuronal cells derived from brain tissue of Tg2576 mice. *Int J Dev Neurosci.* 2010; 28: 597-604.

## 6.1. Ratones con un único gen modificado

### **Modelos de la $\beta$ -APP**

La  $\beta$ -APP humana presenta 3 isoformas, las cuales están constituidas por 695, 751 y 770 aminoácidos y las mutaciones del gen que codifica la  $\beta$ -APP humana que se han utilizado más frecuentemente para generar los modelos transgénicos son 7: Swedish que está formada por 2 mutaciones contiguas (K670N & M671L), London (V717I), Indiana (V717F), Flemish (A692G), Dutch (E693Q), Artic (E693G) y Iowa (D694N)<sup>112</sup>.

En función de la mutación y de la isoforma de la  $\beta$ -APP utilizados se han desarrollado distintos ratones transgénicos<sup>113</sup>.

- Ratón transgénico PDAPP: este ratón expresa la  $\beta$ -APP humana con la mutación Indiana (V717F). Fue el 1º ratón en el que se observó una acumulación patológica significativa de los péptidos de A $\beta$ .
- Ratón transgénico Tg2576: este ratón expresa la isoforma 695 de la  $\beta$ -APP humana con la mutación de Swedish.
- Ratón transgénico APP23: en este ratón se ha utilizado la isoforma 751 de la  $\beta$ -APP humana con la mutación de Swedish.
- Ratón transgénico Tg CRND8: este ratón expresa la isoforma 695 de la  $\beta$ -APP humana pero en este caso lleva 2 mutaciones; la de Swedish y la de Indiana.
- Ratones transgénicos J9 y J20: estos ratones expresan la isoforma 770 de la  $\beta$ -APP con la mutación de Swedish y la de Indiana.

---

<sup>112</sup> Radde R, Duma C, Goedert M, Jucker M. The value of incomplete mouse models of Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2008; 35(Suppl 1): S70-S74.

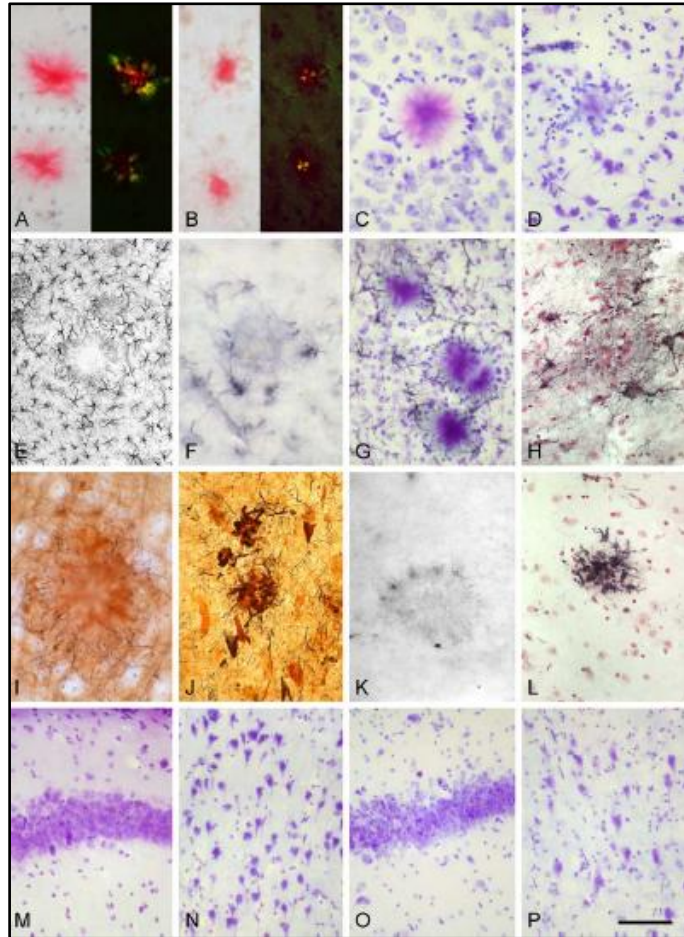
<sup>113</sup> Duyckaerts C, Potier MC, Delatour B. Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol*. 2008; 115: 5-38.

- Ratón transgénico H6: este ratón expresa la  $\beta$ -APP humana con la mutación de Indiana.
- Ratón transgénico Dutch line APP: este ratón expresa la isoforma 751 de la  $\beta$ -APP humana con la mutación E693Q.
- Ratones transgénicos ARC6 y ARC48: en este caso los ratones expresan la  $\beta$ -APP con la mutación de Artic, la de Indiana y la de Swedish.

Estos ratones son un modelo incompleto ya que se ha demostrado que tienen importantes diferencias al compararlos con cerebros humanos que han desarrollado la enfermedad. En la figura 13 quedan reflejadas las diferencias más importantes entre las que cabe destacar que la respuesta inflamatoria y la muerte neuronal son mucho más pronunciadas en el caso de la enfermedad humana que en el ratón. Además, en este modelo de ratón transgénico las estructuras helicoidales formadas por proteína *tau* no se producen<sup>114</sup>. Como ya se ha mencionado anteriormente, la proteína *tau* podría tener una gran importancia en esta enfermedad, por lo tanto la falta de las estructuras helicoidales en estos modelos limita en gran medida su utilidad.

---

<sup>114</sup> Schwab C, Hosokawa M, McGeer PL. Transgenic mice overexpressing amyloid beta protein are an incomplete model of Alzheimer disease. *Exp Neurol*. 2004; 118: 52-64.



**Figura 13:** Comparación histoquímica e inmunohistoquímica de los depósitos de A $\beta$  en ratones transgénicos (APP23: A, C, E, G, I, K, M, O) y en la EA (B, D, F; H, J, L, N, P). (A y B) Tinción de rojo de congo que demuestra la aparición de los depósitos de A $\beta$  en el ratón transgénico APP23 (A) y en la EA (B). (C y D) Tinción de violeta de cresyl que muestra que en el ratón transgénico (C) los depósitos desplazan las neuronas mientras que en la enfermedad aparecen alrededor de las neuronas. (E-H) Tinción de GFAP. Los astrocitos rodean los depósitos de A $\beta$  en los ratones transgénicos y en la EA. (K y L) Tinción de CD11b. En la EA la microglía está muy activada (L) pero en los ratones transgénicos está muy poco activada (K). (M-P) Tinción de violeta de cresyl. La región hipocámpal en la EA muestra una disminución pronunciada en la densidad neuronal comparada con el control (P y N). La pérdida neuronal no es claramente visible cuando se comparan el ratón transgénico y el ratón normal (M y O)<sup>114</sup>.

### **Ratones con el gen de la Presenilina (PS) modificado**

La enzima  $\gamma$ -secretasa está constituida por 5 proteínas distintas: Presenilina1 (PS1), Presenilina2 (PS2), Pen 2, Nicastrina y APH1. Los genes que están relacionados con la EA son los que codifican las proteínas PS1 y PS2. Se han desarrollado modelos animales “knockout” para la PS constatándose que los ratones sufren una gran degeneración neuronal si estas proteínas no se expresan<sup>115,116</sup>.

### **Ratón transgénico que sobreexpresa el metabolito AICD**

El AICD es uno de los metabolitos que proviene de la  $\beta$ -APP, al igual que el A $\beta$ . En los ratones que expresan una mayor cantidad de dicho metabolito se ha observado una alteración similar a la que se produce en el Alzheimer<sup>117</sup> y la neurogénesis también se encuentra afectada<sup>118</sup>.

### **Ratones transgénicos de la proteína tau**

En los últimos años a medida que se ha ido demostrando la importancia de la proteína *tau*, se han ido generando distintos modelos de ratones transgénicos basados en ella. En la EA no se han detectado mutaciones en los genes que codifican la proteína *tau* pero si se han detectado mutaciones en otras

---

<sup>115</sup> Wines-Samuelson M, Schulte EC, Smith MJ, Aoki C, Liu X, Kelleher RJ, et al. Characterization of age-dependent and progressive cortical neuronal degeneration in *Presenilin* conditional mutant mice. PLoS ONE. 2010; 5: e10195.

<sup>116</sup> Zhang C, Wu B, Beglopoulos V, Wines-Samuelson M, Zhang D, Dragatsis I, et al. Presenilins are essential for regulating neurotransmitter release. Nature. 2009; 460: 632-637.

<sup>117</sup> Ghosal K, Vogt DL, Liang M, Shen Y, Lamb BT, Pimplikar SW. Alzheimer's disease-like pathological features in transgenic mice expressing the APP intracellular domain. Proc Natl Acad Sci USA. 2009; 106: 18367-18377.

<sup>118</sup> Ghosal K, Stathopoulos A, Pimplikar SW. APP transgenic domain impairs adult neurogenesis in transgenic mice by inducing neuroinflammation. PLoS ONE. 2010; 5: e11866.

enfermedades como el Parkinson o la Demencia Frontotemporal<sup>119</sup> y estas mutaciones son las que han sido utilizadas para desarrollar los ratones transgénicos.

En uno de los modelos se anularon los dos genes que codifican la proteína *tau*<sup>120</sup> y con ello se pudo constatar la importancia de esta proteína para las neuronas. En otro modelo se incluyó el gen que codifica la proteína *tau* doblemente modificado observándose afectación de la sinapsis neuronal y neuronas con signos de neurodegeneración y por ello, los ratones llegaron a sufrir déficit en las funciones de memoria y aprendizaje<sup>121</sup>.

En un modelo de ratón que expresaba la proteína *tau* humana y que además dicho gen podía ser inhibido mediante la administración de doxiciclina se observó que cuando se expresaba se producía muerte neuronal y déficit cognitivo pero cuando se inhibía la expresión del gen el ratón se recuperaba de esas lesiones aunque el número de ovillos neurofibrilares iba en aumento. Esto podría indicar que, como sucede con los péptidos de A $\beta$ , no son los ovillos neurofibrilares los responsables de la muerte neuronal sino la proteína *tau* fosforilada soluble<sup>122</sup>.

También se ha desarrollado<sup>123</sup> un modelo de ratón basado en la enzima glucógeno sintasa quinasa (GSK-3 $\beta$ ), ya que es una de las principales enzimas que fosforila *tau*, en este caso la expresión del gen se podía controlar mediante

---

<sup>119</sup> Götz J, Ittner LM. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci.* 2008; 9: 532-544.

<sup>120</sup> Götz J, Deters N, Doldissen A, Bokhari L, Ke Y, Wiesner A, et al. A decade of tau transgenic animal models and beyond. *Brain Pathol.* 2007; 17: 91-103.

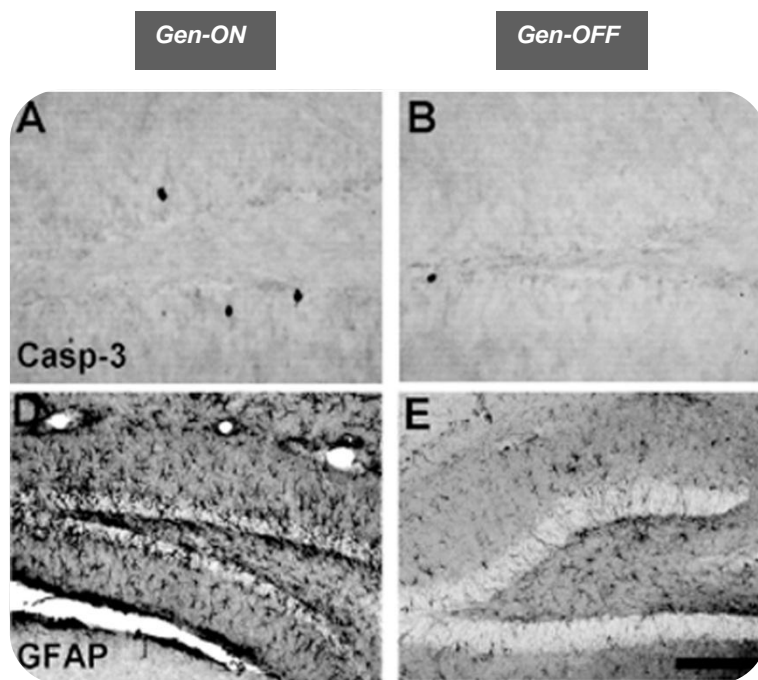
<sup>121</sup> Rosenmann H, Grigoriadis N, Eldar-Levy H, Avital A, Rozenstein L, Touloumi O, et al. A novel transgenic mouse expressing double mutant tau driven by its natural promoter exhibits tauopathy characteristics. *Exp Neurol.* 2008; 212: 71-84.

<sup>122</sup> SantaCruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M et al. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science.* 2005; 309: 476-481.

<sup>123</sup> Engel T, Hernández F, Avila J, Lucas JJ. Full reversal of Alzheimer's disease-like phenotype in a mouse model with conditional overexpression of glycogen synthase kinase-3. *J Neurosci.* 2006; 26: 5083-5090.



la administración de tetraciclina. Tal y como se aprecia en la figura 14, en este ratón mientras la expresión del gen estaba activada la cantidad de *tau* fosforilada era superior y se producía muerte neuronal y gliosis pero cuando se inhibía la expresión del gen la cantidad de *tau* fosforilada disminuía y con ello la muerte neuronal y la gliosis. Estos resultados podrían indicar que los daños producidos por la proteína *tau* son reversibles.



**Figura 14:** Disminución de la apoptosis y de la astrogliosis en el ratón *Tet/GSK-3 $\beta$*  tratado con doxiciclina (*Gen-off*). Análisis inmunohistoquímico realizado en el hipocampo de ratones *Tet/ GSK-3 $\beta$*  *Gen-ON* y *Gen-OFF*. Caspasa-3 (A-B) y GFAP (C-D)<sup>123</sup>.

## 6.2. Ratones con dos genes modificados

En la mayoría de los casos a parte de modificar el gen que codifica la  $\beta$ -APP se ha modificado un segundo gen.

En varios modelos transgénicos los ratones tenían modificados los genes que codifican la  $\beta$ -APP y la  $\beta$ -secretasa. En uno de los modelos la cantidad de  $A\beta$  depositado en el parénquima cerebral aumentó mientras la angiopatía amiloide cerebrovascular disminuyó<sup>124</sup>. En otro de los modelos la neurodegeneración fue mayor aunque los niveles de  $A\beta$  disminuyeron<sup>125</sup>. En otro modelo relacionado con la  $\beta$ -secretasa se utilizó un ratón que expresaba la  $\beta$ -APP humana pero que en este caso no estaba mutada y tenía anulados los genes que codificaban la  $\beta$ -secretasa<sup>126</sup>. En estos ratones se observó que sufrían déficit de memoria. En función de los resultados y en contra de lo esperado parece ser que los productos provenientes del metabolismo de la  $\beta$ -APP por parte de la  $\beta$ -secretasa tienen alguna función fisiológica a nivel cerebral. Esto podría dificultar el uso de los inhibidores de la  $\beta$ -secretasa para tratar la EA. Una posible solución podría ser la inhibición parcial de la  $\beta$ -secretasa. Cuando se utilizó un ratón PDAPP con uno de los dos genes que codifican la  $\beta$ -secretasa inhibidos, tal y como se observa en la figura 15, se apreció que aunque la cantidad de  $A\beta$  no disminuyó en una cantidad relevante, la patología asociada al

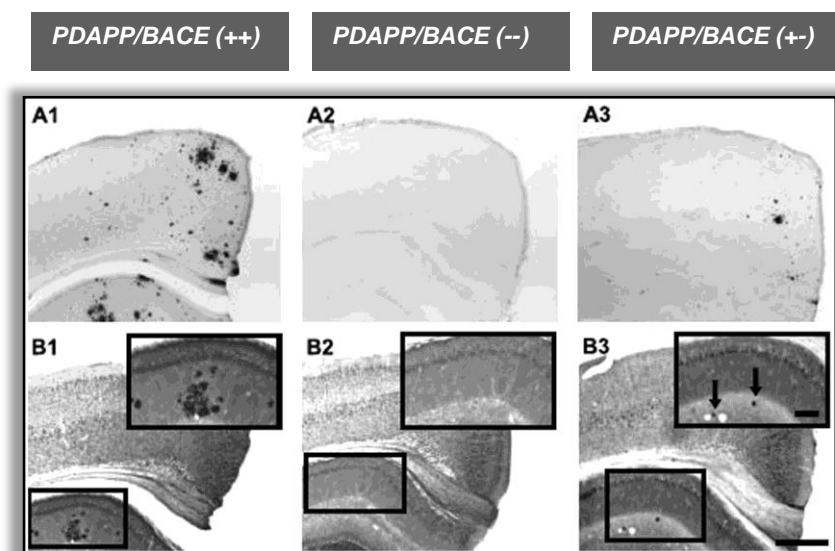
---

<sup>124</sup> Willen M, Dewachter I, Smyth N, Van Dooren T, Borghgraef P, Haass C, et al.  $\beta$ -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 increases amyloid deposition in brain parenchyma but reduces cerebrovascular amyloid angiopathy in aging BACE x APP[V717I] Double-transgenic mice. *Am J Pathol.* 2004; 165: 1621-1631.

<sup>125</sup> Rockenstein E, Mante M, Alford M, Adame A, Crews L, Hashimoto M, et al. High  $\beta$ -secretase activity elicits neurodegeneration in transgenic mice despite reductions in amyloid- $\beta$  levels. *J Biol Chem.* 2005; 280: 32957-32967.

<sup>126</sup> Ma H, Lesné S, Kotilinek L, Steidl-Nichols JV, Sherman M, Younkin L, et al. Involvement of  $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) in amyloid precursor protein-mediated enhancement of memory and activity-dependent synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104: 8167-8172.

A $\beta$  si disminuyó mientras que la alteración producida en la sinapsis neuronal sufría un retraso significativo<sup>127</sup>.



**Figura 15:** Las placas de A $\beta$  y los ovillos neurofibrilares no se desarrollaron en el ratón PDAPP/BACE (-/-) y se redujeron en el ratón PDAPP/BACE (+/-). Las figuras A1-A3 muestran las placas de A $\beta$  y las figuras B1-B3 muestran los ovillos neurofibrilares. Las flechas en la figura B3 muestra los ovillos neurofibrilares<sup>127</sup>.

También, se han desarrollado ratones transgénicos a los que se les han modificado tanto los genes que codifican la  $\beta$ -APP como la PS1 (APP/PS1)<sup>128</sup> ó la PS2 (APP/PS2)<sup>129,130</sup>. En estos ratones la aparición de las placas de A $\beta$  es

<sup>127</sup> McConlogue L, Buttini M, Anderson JP, Brigham EF, Chen KS, Freedman SB, et al. Partial reduction of BACE1 has dramatic effects on Alzheimer plaque and synaptic pathology in APP transgenic mice. *J Biol Chem* 2007; 282: 26326-26334.

<sup>128</sup> Priller C, Mitteregger G, Paluch S, Vassallo N, Staufenberg M, Kretschmar HA, et al. Excitatory synaptic transmission is depressed in cultured hippocampal neurons of APP/PS1 mice. *Neurobiol Aging*. 2009; 30: 1227-1237.

<sup>129</sup> Richards JG, Higgings GA, Ouagazzal AM, Ozmen L, Kew JNC, Bohrmann B, et al. PS2APP transgenic mice, coexpressing hPS2mut and hAPPswe, show age-related cognitive deficits associated with discrete brain amyloid deposition and inflammation. *J Neurosci*. 2003; 23: 8989-9003.

más rápida en comparación con los ratones que solo tienen modificado el gen de la  $\beta$ -APP. En estos modelos también se detecta proteína *tau* fosforilada pero siguen sin observarse las estructuras helicoidales que se observan en la EA. En el caso de los ratones APP/PS1 se ha visto que la sinapsis neuronal estaba disminuida<sup>128</sup> y en algún modelo se ha llegado a ver reacción inflamatoria y muerte neuronal cerca de las placas pero mucho menor que en el caso de la EA humana<sup>131</sup>. En los ratones APP/PS2, sin embargo, no se observó muerte neuronal ni tampoco disminución de la sinapsis neuronal<sup>129</sup>.

Otra de las enzimas responsables de metabolizar la  $\beta$ -APP es la  $\alpha$ -secretasa y en este caso no se formarían péptidos de A $\beta$ . Para probar si la sobreproducción de esta enzima era útil para disminuir la cantidad de placas se utilizó un ratón que sobreexpresaba la  $\beta$ -APP humana y la  $\alpha$ -secretasa bovina<sup>132</sup>. En estos ratones disminuyeron la cantidad de placas y los niveles de A $\beta$ 40 y A $\beta$ 42 mientras mejoraron algunas funciones cognitivas. Aparte de las enzimas que metabolizan la proteína  $\beta$ -APP también hay enzimas encargadas de metabolizar el A $\beta$  una vez que se ha formado. Para comprobar si aumentando la actividad de estas enzimas la cantidad de A $\beta$  disminuía se desarrolló un ratón que sobreexpresaba la  $\beta$ -APP humana y el gen de la neprilisina humana (una de las enzimas encargadas de metabolizar el A $\beta$ ). En estos ratones los niveles de A $\beta$  disminuyeron y las funciones cognitivas mejoraron<sup>133</sup>.

---

<sup>130</sup> Carro E, Trejo JL, Gerber A, Loetscher H, Torrado J, Metzger F, et al. Therapeutic actions of insulin-like growth factor I on APP/PS2 mice with severe brain amyloidosis. *Neurobiol Aging*. 2006; 27: 1250-1257.

<sup>131</sup> Howlett DR, Bowler K, Soden PE, Riddell D, Davis JB, Richardson JC, et al. A $\beta$  deposition and related pathology in an APP x PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Histol Histopathol*. 2008; 23: 67-76.

<sup>132</sup> Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, et al. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest*. 2004; 113: 1456-1464.

<sup>133</sup> Poirier R, Wolf DP, Welzl H, Tracy J, Galsworthy MJ, Nitsch RM, et al. Neuronal neprilysin overexpression is associated with attenuation of A $\beta$ -related spatial memory deficit. *Neurobiol Dis*. 2006; 24: 475-483.

Otro de los genes que parece tener relación con el Alzheimer es el que codifica la APOE el cual presenta 3 polimorfismos. Para estudiar el efecto de los distintos polimorfismos se desarrolló un modelo de ratón transgénico que sobreexpresaba la  $\beta$ -APP humana y el polimorfismo 3 o 4 de la APOE humana<sup>134</sup>.

Otro de los posibles motivos por los que el A $\beta$  se acumula en el cerebro es que este no se elimine adecuadamente a través de la BHE y para estudiar su importancia se han desarrollado varios modelos transgénicos. Uno de los modelos utilizados fue el denominado hAPP/RAP<sup>-/-</sup> que sobreexpresaba la  $\beta$ -APP humana a la vez que tiene inhibidos los genes que codificaban la proteína asociada al receptor (RAP). En estos ratones el LRP, el cual es uno de los responsables de la eliminación cerebral del A $\beta$ , se expresaba menos provocando una mayor acumulación del A $\beta$  en el cerebro<sup>135</sup>. También se utilizó un modelo que sobreexpresaba la  $\beta$ -APP humana y tenía anulados los genes que codificaban los receptores de los productos avanzados de la glicosilación (RAGE). Se vio que cuando se anulaban los receptores RAGE los efectos tóxicos del A $\beta$  no aparecían lo que puso de manifiesto la importancia de los receptores de los péptidos de A $\beta$ <sup>136</sup>. En otro de los modelos el ratón sobreexpresaba la  $\beta$ -APP humana y tenía inhibidos los 2 genes que codifican la

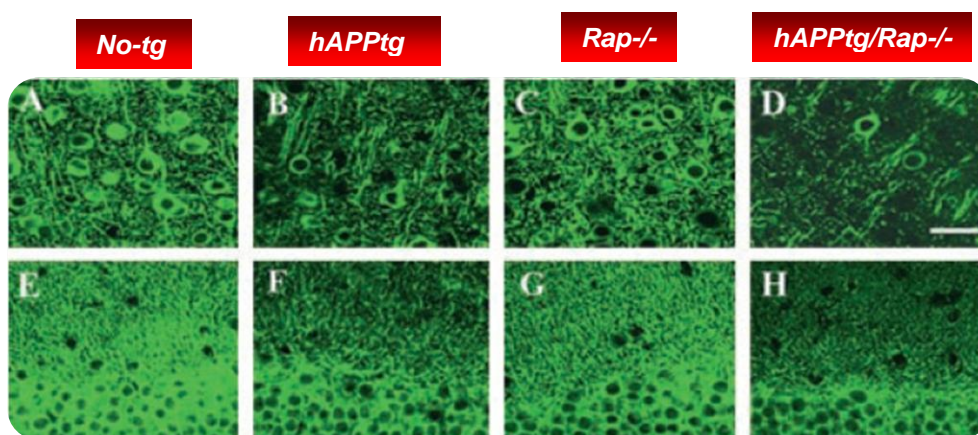
---

<sup>134</sup> Fryer JD, Simmons K, Parsadanian M, Bales KR, Paul SM, Sullivan PM, et al. Human apolipoprotein E4 alters the amyloid- $\beta$  40:42 ratio and promotes the formation of cerebral amyloid angiopathy in an amyloid precursor protein transgenic model. *J Neurosci.* 2005; 25: 2803-2810.

<sup>135</sup> Van Uden E, Mallory M, Veinbergs I, Alford M, Rockenstein E, Masliah E. Increased extracellular amyloid deposition and neurodegeneration in human amyloid precursor protein transgenic mice deficient in receptor-associated protein. *J Neurosci.* 2002; 22: 9298-9304.

<sup>136</sup> Deane R, Yan SD, Subramanian RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, et al. RAGE mediates amyloid- $\beta$  peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med.* 2003; 9: 907-913.

glicoproteína-P<sup>137</sup>. Se demostró que en este modelo se acumulaba más cantidad de A $\beta$  en el cerebro que en el ratón transgénico simple (solo sobreexpresaba la  $\beta$ -APP humana). Esto es importante porque la glicoproteína-P aparte de ser una proteína encargada de eliminar los compuestos tóxicos que entran en el cerebro puede verse alterada por muchos fármacos usados de manera rutinaria. En la figura 16 puede observarse la degeneración dendrítica que se produce en el ratón hAPP/RAP<sup>-/-</sup>.



**Figura 16:** Degeneración dendrítica en un ratón hAPPtg/RAP<sup>-/-</sup>. Las imágenes fueron obtenidas con un microscopio confocal con un anticuerpo contra MAP2. A-D, Neocortex; E-H Hipocampo<sup>135</sup>.

Finalmente se han desarrollado varios modelos transgénicos dobles basados en la  $\beta$ -APP y en la proteína *tau*. En algunas ocasiones se desarrollaron modelos en los que se introdujo el gen que codifica la  $\beta$ -APP y se anularon uno ó los dos alelos que codifican la proteína *tau* endógena. Con estos ratones se obtuvieron resultados contradictorios, en uno de los casos la supresión de la

<sup>137</sup> Cirrito JR, Deane R, Fagan AM, Spinner ML, Parsadanian M, Finn MB, et al. P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid- $\beta$  deposition in an Alzheimer disease mouse model. J Clin Invest. 2005; 115: 3285-3290.

proteína *tau* era beneficiosa para las neuronas<sup>138</sup>, ya que el estado cognitivo mejoraba pero en otro estudio se observó que dicha supresión aumentaba el daño cognitivo<sup>139</sup>.

En otro trabajo se utilizaron dos tipos de ratones transgénicos; uno que expresaba la  $\beta$ -APP humana y la proteína *tau* humana y otro que expresaba la *tau* humana y la GSK-3 $\beta$  humana<sup>140</sup>. En este estudio se obtuvieron varias conclusiones: 1. En los dos modelos murinos los daños cognitivos aparecen antes de que tanto las placas de A $\beta$  como las de proteína *tau* se detecten lo que indica que en el caso de la proteína *tau* también son sus derivados solubles y no las placas los que provocan el daño neuronal. 2. En ninguno de los 2 modelos hay muerte neuronal o reacción inflamatoria como si sucede en el caso de la enfermedad humana.

Recientemente se ha publicado un estudio utilizando un modelo de ratón que expresaba la  $\beta$ -APP y tan solo una parte específica de la proteína *tau*. Con este modelo de ratón pudo demostrarse que es una parte específica de la proteína *tau* la que interacciona con los péptidos de A $\beta$  para acabar provocando el daño neuronal<sup>141</sup>.

---

<sup>138</sup> Roberson ED, Scarce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Chen IH, Wu T, et al. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science*. 2007; 316: 750-754.

<sup>139</sup> Dawson HN, Cantillana V, Jansen M, Wang H, Vitek MP, Wilcock DM, et al. Loss of tau elicits axonal degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2010; 169: 516-531.

<sup>140</sup> Terwel D, Muyllaert D, Dewachter I, Borghgraef P, Croes S, Devijver H, et al. Amyloid activates GSK-3 $\beta$  to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice. *Am J Pathol*. 2008; 172: 786-798.

<sup>141</sup> Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, et al. Dendritic function of tau mediates amyloid- $\beta$  toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell*. 2010; 142: 387-397.

### 6.3. Ratón con tres genes modificados

Son los modelos más completos y en ellos se han modificado 3 genes: el gen que codifica la  $\beta$ -APP, el que codifica la  $\gamma$ -secretasa y el que codifica la proteína *tau*<sup>142,143,144</sup>. En estos ratones si se generan las estructuras helicoidales de proteína *tau*, concretamente después de la aparición de las placas de A $\beta$ . Además, también se observa, que como sucede en la EA, el daño neuronal se produce antes de que las placas de A $\beta$  sean detectadas lo que pone de manifiesto la importancia de los péptidos de A $\beta$  solubles. Este daño neuronal está generado en su mayor parte por el estrés oxidativo ya que en estos ratones una de las primeras señales detectadas es que los antioxidantes como la vitamina E y el glutati6n reducido est1n disminuidos y la actividad de las enzimas antioxidantes como la super6xido dismutasa y la glutati6n peroxidasa se encuentra incrementada.

No obstante, a d1a de hoy se considera que los ratones transg6nicos simulan, tan solo, una fase de la enfermedad en la que en el ser humano todav1a no se han comenzado a detectar los s1ntomas<sup>145</sup> (figura 17). Esto explicaría por qu6 la mayor1a de los productos terap6uticos que han mostrado eficacia en ratones no lo son en los ensayos cl1nicos ya que en el ser humano la enfermedad comienza a tratarse en una fase mucho m1s avanzada.

En los 6ltimos a1os, se est1n dise1ando t6cnicas y biomarcadores que permitan hacer un estudio m1s exhaustivo en los ratones transg6nicos con el

---

<sup>142</sup> Resende R, Moreira PI, Proen7a T, Deshpande A, Busciglio J, Pereira C, et al. Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med.* 2008; 4: 2051-2057.

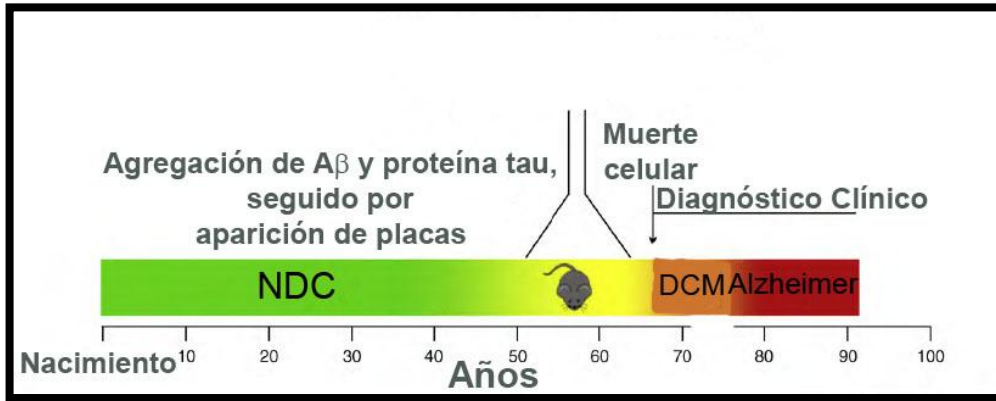
<sup>143</sup> Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: Intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction. *Neuron.* 2003; 39: 409-421.

<sup>144</sup> Ciavardelli D, Silvestri E, Del Visco A, Bomba M, De Gregorio D, Moreno M, et al. Alterations of brain and cerebellar proteomes linked to A $\beta$  and tau pathology in a female triple-transgenic murine model of Alzheimer's disease. *Cell Death Dis.* 2010; 1: e90

<sup>145</sup> Ashe KH, Zahs KR. Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. *Neuron.* 2010; 66: 631-645.



objetivo de que pueda predecirse con una mayor exactitud lo que pueda suceder cuando el mismo producto se administre a nivel clínico<sup>146</sup>.



**Figura 17:** Los modelos de ratones transgénicos para la EA tan solo llegan a simular una fase muy temprana de la enfermedad<sup>145</sup>. (NDC: no deterioro cognitivo, DCM: deterioro cognitivo medio).

## 7. NEUROGÉNESIS

Hasta la década de los años 60 se pensaba que las neuronas no tenían capacidad para regenerarse pero actualmente se ha podido poner de manifiesto la existencia de zonas específicas en el cerebro donde se encuentran células madre con capacidad para diferenciarse a neuronas, además de, a astrocitos y a células gliales<sup>147</sup>. La neurogénesis (formación de nuevas neuronas) es un proceso fisiológico que con la edad va decayendo<sup>147</sup> y que responde a varios tipos de estímulos, tanto intrínsecos (factores neurotróficos, citoquinas) como

<sup>146</sup> Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol.* 2010; 9: 119-128.

<sup>147</sup> Fernández-Verdecia CI, Díaz del Guante MA, Castillo-Díaz L, Álvarez-Blanco J. Neurogénesis como diana terapéutica para la enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol.* 2009; 49: 193-201.

extrínsecos (entrenamiento motor, cognitivo) y además se cree que tiene una gran importancia en los procesos de aprendizaje y memoria<sup>148</sup>.

Los datos de los que se dispone, tras analizar cerebros humanos de enfermos de Alzheimer postmortem, son bastante contradictorios, ya que mientras unos grupos de investigación han observado un mayor número de neuronas con el avance de enfermedad<sup>149</sup>, otros han observado un menor número de estas<sup>150</sup>. Los resultados obtenidos en animales transgénicos tampoco son mucho más clarificadores, en algunos ratones la neurogénesis está aumentada<sup>151</sup>, en otros está disminuida desde edades muy tempranas<sup>152</sup> tal y como se muestra en la figura 18, y finalmente en otros estudios se ha visto que aunque la neurogénesis no está afectada la supervivencia de las neuronas de nueva formación disminuye<sup>153</sup>.

---

<sup>148</sup> Thuret S, Toni N, Aigner S, Yeo GW, Gage FH. Hippocampus-dependent learning is associated with adult neurogenesis in MRL/MpJ mice. *Hippocampus*. 2009; 19: 658-669.

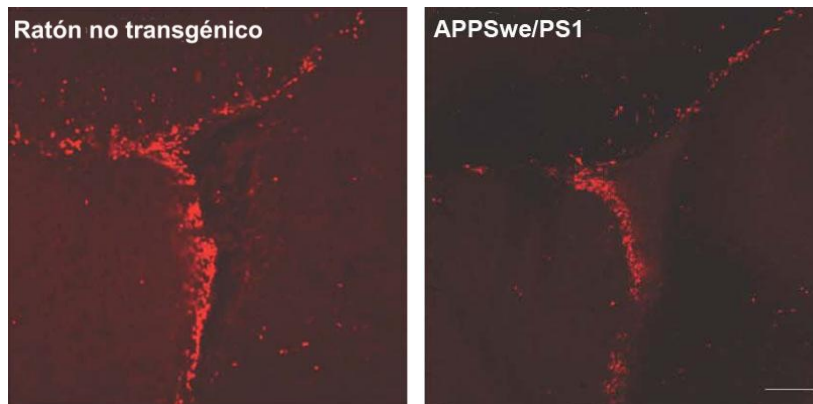
<sup>149</sup> Jin K, Peel AL, Mao XO, Xie L, Cottrell BA, Henshall DC, et al. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 343-347.

<sup>150</sup> Ziabreva I, Perry E, Perry R, Minger SL, Ekonomou A, Przyborski S, et al. Altered neurogenesis in Alzheimer's disease. *J Psychosom Res*. 2006; 61: 311-316.

<sup>151</sup> Jin K, Galvan V, Xie L, Mao XO, Gorostiza OF, Bredesen DE, et al. Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APPsw,Ind) mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 13363-13367

<sup>152</sup> Demars M, Hu YS, Gadadhar A, Lazarov O. Impaired neurogenesis is an early event in the etiology of familial Alzheimer's disease in transgenic mice. *J Neurosci Res*. 2010; 88: 2103-2117.

<sup>153</sup> Verret L, Jankowsky JL, Guilian MX, Borchelt DR, Rampon C. Alzheimer's type amyloidosis in transgenic mice impairs survival of newborn neurons derived from adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci*. 2007; 27: 6771-6780.



**Figura 18:** Imagen representativa de inmunoreactividad a BrdU en la zona subventricular de ratones no transgénicos (izquierda) y transgénicos (derecha)<sup>152</sup>.

La comunidad científica teniendo en cuenta el gran daño neuronal existente en la EA y que uno de los principales lugares donde tiene lugar la neurogénesis está en el hipocampo, es decir, en una de las zonas más afectadas por dicha enfermedad, cree que incrementar la neurogénesis podría ser una buena alternativa para hacer frente a la enfermedad<sup>154</sup>.

Los metabolitos de la  $\beta$ -APP parecen guardar cierta relación con el proceso de neurogénesis ya que se ha demostrado que el A $\beta$  puede provocar la proliferación de las células madre embrionarias, sin embargo los metabolitos que se generan por la vía denominada no amiloidogénica provocan que las células madre embrionarias tiendan principalmente a diferenciarse a neuronas, en vez de proliferar<sup>155</sup>.

<sup>154</sup> Lopez-Toledano MA, Ali Faghihi M, Patel NS, Wahlestedt C. Adult neurogenesis: a potential tool for early diagnosis in Alzheimer's disease?. J Alzheimers Dis. 2010; 20: 395-408.

<sup>155</sup> Porayette P, Gallego MJ, Kaltcheva MM, Bowen RL, Meethal SV, Atwood CS. Differential processing of amyloid- $\beta$  precursor protein directs human embryonic stem cell proliferation and differentiation into neuronal precursor cells. J Biol Chem. 2009; 284: 23806-23817.



## **8. TECNOLOGÍA DE LA MICROENCAPSULACIÓN DE CÉLULAS**

### **ARTÍCULO 1**

**Cell microencapsulation technology: Towards  
clinical application  
J Control Release; 132: 76-83**





Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Controlled Release

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jconrel](http://www.elsevier.com/locate/jconrel)

Review

## Cell microencapsulation technology: Towards clinical application

Ainhoa Murua<sup>1</sup>, Aitziber Portero<sup>1</sup>, Gorka Orive, Rosa M<sup>a</sup> Hernández, María de Castro, José Luis Pedraz<sup>\*</sup>*Faculty of Pharmacy, Laboratory of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, University of the Basque Country, Vitoria-Gasteiz, Spain*

### Article history:

Received 28 April  
2008 Accepted 6  
August 2008  
Available online 27  
August 2008

### Keywords:

Alginate  
Biocompatibility  
Controlled delivery  
Microencapsula-  
tion  
Polymeric drug  
delivery system  
Cell line

### A B S T R A C T

The pharmacokinetic properties of a drug can be significantly improved by the delivery process. Scientists have understood that developing suitable drug delivery systems that release the therapeutically active molecule at the level and dose it is needed and during the optimal time represents a major advance in the field. Cell microencapsulation is an alternative approach for the sustained delivery of therapeutic agents. This technology is based on the immobilization of different types of cells within a polymeric matrix surrounded by a semipermeable membrane for the long-term release of therapeutics. As a result, encapsulated cells are isolated from the host immune system while allowing exchange of nutrients and waste and release of the therapeutic agents. The versatility of this approach has stimulated its use in the treatment of numerous medical diseases including diabetes, cancer, central nervous system diseases and endocrinological disorders among others. The aim of this review article is to give an overview on the current state of the art of the use of cell encapsulation technology as a controlled drug delivery system. The most important advantages of this type of “living” drug release strategy are highlighted, but also its limitations pointed out, and the major challenges to be addressed in the forthcoming years are described.

### Contents

1. Introduction	57
2. Cell encapsulation technology	58
2.1. Biomaterials	58
2.2. Requirements of the technology	59
2.2.1. Biocompatibility	60
2.2.2. Searching for the optimal delivery site	61
2.2.3. Other issues	62
3. The versatility of cell encapsulation technology	62
3.1. Bioorgans: primary cells	64
3.2. Living drug factories: genetically modified cells	64
3.3. Stem cell technology	66
4. Concluding remarks. Future directions and challenges.	67
Acknowledgments	67
References	67



## 1. Introduction

During the past decades, significant advantages have been made in the development of delivery systems for biomedical applications. Each of these applications demands biomaterials with specific physical, chemical, biological, biomechanical and degradation properties to provide efficient therapy, one of the major driving forces being the long-term ability of the material to perform with an appropriate host response in a given application, specifically in the case of diseases requiring chronic treatments based on a continuous delivery of the drug. Consequently, a wide range of natural and synthetic polymers are being investigated for this purpose.

Advances in both synthetic organic chemistry and biological chemistry are enabling the development of a wide range of novel polymeric materials as candidates for developing drug delivery vehicles. The success of polymer-based drug delivery systems lies in the ability to custom design or modify existing biomaterials to achieve appropriate biocompatibility, degradation and physical properties to elicit favorable biological responses [1].

An ideal system should be able to achieve an effective drug concentration at the target tissue for an extended period of time, while minimizing systemic exposure. In addition, the system should provide a tight control over the device in case of side-effects. Encapsulation of therapeutic agents into polymeric carriers provides several advantages over traditional formulations [2]. Prior to release, the physical barrier provided by the encapsulation device protects the drug from degradation or premature metabolism. Release of the therapeutic products can be technologically controlled in order to achieve different kinetic profiles. For example, a new polymeric device that allows for the tissue-

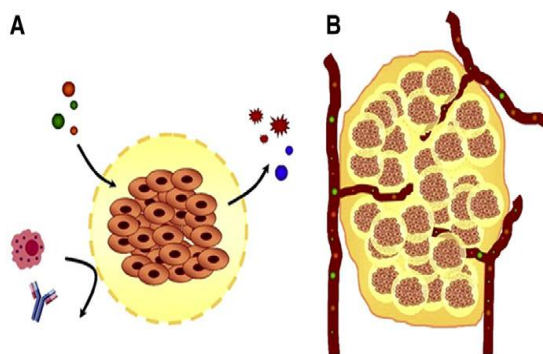
specific delivery of two or more growth factors (GF), with controlled dose and rate of delivery has been reported [3]. By using a poly (lactide-co-glycolide) (PLG) scaffold an initial burst effect followed by a progressive GF release can be obtained [4]. Last but not least, a zero-order kinetic release of the therapeutic product may be feasible as reported in approaches based on devices developed using polyanyhydrides [5]. In overall, the versatility of this technology allows the delivery of drugs via intravascular, subcutaneous, pulmonary, ophthalmic and oral routes among others, each with different design requirements [6].

Many newly discovered peptides and proteins show potent physiologic actions in small amounts, leading to their possible clinical application as therapeutic agents [7,8]. Therefore an effective peptide and protein delivery system is an outstanding requirement if a successful therapeutic treatment is pretended.

A wide range of biomaterials and many different methods have been employed in the development of therapeutic peptide and protein immobilization devices as reported elsewhere [1,9–16]. Considering this vast field, in order to focus on the biotechnological systems discussed in this review article, drug delivery system strategies consisting of microparticles will be highlighted and especially those approaches based on cell microencapsulation technology. With the aim of overcoming the limited drug resource provided by direct encapsulation of therapeutic products, this review gives an overview on the advances achieved during the last few years in cell encapsulation technology and presents the technology as a promising strategy for biomedical purposes. Years of intense and interdisciplinary work developing the optimal cell encapsulation devices are starting to be evidenced by the increasing clinical phase trials in process.

## 2. Cell encapsulation technology

Cell encapsulation technology is based on the immobilization of cells within a semi-permeable membrane. This membrane protects the inner cells from both mechanical stress and the host's immune system while allowing the bidirectional diffusion of nutrients, oxygen and waste. This fact could be considered an important advantage owing that it could result in a reduction or even lack of chronic administration of immunosuppressants, an important issue to be considered in organ transplantation due to the important side-effects they may lead to in patients. In overall, totally biocompatible materials that do not interfere with cell function must be employed.



**Fig.1.** (A) An schematic illustration of the semi-permeable membrane allowing the bidirectional diffusion of nutrients, oxygen, therapeutic products and waste while at the same time avoiding the entrance of immune cells and antibodies. (B) The formation of a vascular network surrounding the microcapsule network provides the necessary supply of nutrition and oxygen for the entrapped cells, enhancing the long-term functionality of the graft.

The encapsulation of cells instead of therapeutic products allows the delivery of the product for a longer period of time as cells release the products continuously. Moreover, cell encapsulation allows the

transplantation of non-human cells which could be considered as an alternative to the limited supply of donor tissue. In addition, genetically modified cells can be immobilized to express any desired protein *in vivo* without the modification of the host's genome.

Immobilization of cells shows an important advantage compared with encapsulation of proteins because it allows a sustained and controlled delivery of 'de novo' produced therapeutic products at a constant rate giving rise to more physiological concentrations (Fig. 1A). Furthermore, if the encapsulation device is broken, the toxicity caused by a quick delivery of high concentrations of the drug could be avoided. However if cells manage to exit the encapsulation device the host's immune system might attack them compromising their survival.

The small size of the capsules (from 100  $\mu\text{m}$  to 500  $\mu\text{m}$ ) allows their implantation in close contact to the blood stream, which could be beneficial in specific applications later discussed for the long-term functionality of the enclosed cells due to an enhanced oxygen transfer into the capsules (Fig. 1B). In addition, microcapsules have a larger surface/volume ratio compared to other immobilization scaffolds, which improves oxygen and nutrients' permeability [17].

### 2.1. Biomaterials

Many different materials are employed to encapsulate cells. Among them, alginates are nowadays the most studied and characterized for cell encapsulation technology (Table 1).

Alginates create three dimensional structures when they react with multivalent ions. Divalent cations such as calcium, barium, and strontium cooperatively bind between G blocks of adjacent alginate chains, creating interchain bridges which cause gelling of the aqueous alginate solutions.

Microcapsules can be formulated by many different methods. The most often described microencapsulation system is based on an alginate core surrounded by a polycation layer which at the same time is covered by an outer alginate membrane. The polycation membrane forms a semipermeable membrane, which improves the stability and biocompatibility of the microcapsule. Different polycations, such as, poly-*L*-lysine (PLL) [18], poly-*L*-ornithine (PLO) [19], chitosan [20], lactose modified chitosan [21,22] and photopolymerized biomaterials [23] have been employed to cover the alginate matrix. The search for an ideal polycation has generated much controversy among research groups mainly due to problems associated with toxicity of these materials resulting in cell necrosis. Comparative studies using different polycations have shed light to part of the concern [24].

Several modifications of the alginate matrix have been described in the scientific literature showing several advantages over the basic alginate core: (a) scaffolds composed of an alginate core modified with covalently conjugated oligopeptides with a sequence of RGD (arginine, glycine, aspartic acid) found to improve muscle regeneration when implanted in mice in comparison with the non-modified scaffolds [25,26]; (b) covalently reinforced microcapsules made with a chemoenzymatically engineered alginate which increased microcapsule stability although low or non-dividing cells were viable for several months not high expanding ones [27]; (c) membrane-mimetic films assembled by in-situ polymerization of acrylate functionalized phospholipids which showed greater biostability *in vivo* but lacked a viability assay to corroborate the correct functionality of the approach [28]; (d) microcapsules made with enzymatically modified alginates using epimerases which turned out to be more elastic and compact,

less permeable, and extremely stable under physiological conditions [29]; (e) microcapsules with covalent links between adjacent layers of the microcapsules' membrane [30,31]; (f) subsieve-size capsules made with alginate coupled with phenol moieties, effective for suppressing the destabilization of the gel resulting from a loss of binding between the  $\text{Ca}^{2+}$  and the alginate [32,33]. Other works include (g) scaffolds made with alginate–agarose [34]; (h) modification of the islets' membrane with poly(ethylene glycol) (PEG) before being encapsulated within alginate to avoid the volume increase [35] or (i) encapsulation in photoreactive liposomes and alginate which offers the potential to create complex tissue engineering substrates containing cells immobilized in precise locations [36].

Although alginate is the most widely employed material for cell encapsulation, other materials have also been proposed in the last years as shown in Table 2 [37–49]. However, although capsules with alternative materials have been developed, *in vitro* studies have not proven to be better and few *in vivo* data are available to evaluate the benefits and costs of these capsules in comparison to the alginate-based ones. Besides, biocompatibility studies have not been performed considering moreover that it is an important challenge in cell encapsulation technology. For these reasons, authors believe that alginate is the most suitable material for cell encapsulation technology up to now.

## 2.2. Requirements of the technology

Although important advances have already been made, in the next years several obstacles encountered during the optimization process of the technology should be overcome by cell encapsulation technology to come closer to a realistic proposal for clinical application.

**Table 1**  
Cell encapsulation approaches based on alginate matrices

Material	Modification	Cell	Implantation site	Application	Ref.
Alginate		Bone marrow stromal cells, murine derived adipose-tissue stromal cells, islets of Langerhans and P4317/STK cells	Subcutaneous space, peritoneal cavity, and under the kidney capsule	Bone and cartilage engineering, diabetes and cancer	[58,64,80, 81,89,91]
Alginate	Atomization With RGD	Monocytes and mesenchymal stem cells	<i>In vitro</i> study	Bone regeneration and muscle regeneration	[83]
Alginate	Enzymatic modification	MC3T3-E1, myoblasts and satellite cells	Muscle		[25,26,82]
Alginate	Chemoenzymatic modification	Bone derived cells	<i>In vitro</i> study	Increased stability	[29]
Alginate	Photoreactive liposomes		<i>In vitro</i> study	Increased stability	[27]
Alginate			<i>In vitro</i> study	Substrates containing cells immobilized in precise locations	[36]
Alginate	Phenol moieties	Cranial-l-keese feline kidney cells	<i>In vitro</i> study	Increased stability	[32,33]
Alginate-PLL-alginate		Embryonic stem cells, bone marrow mesenchymal stem cells, islets of Langerhans, chromaffin cells and myoblasts	Peritoneal cavity, subarachnoid space and subcutaneous space	Bone repair and regeneration, chronic neuropathic pain and anemia	[18,35,60,70, 77,78,84,92]
Alginate-PLL-alginate	Covalent cross-links between membranes	Islets of Langerhans and EL-4 thymoma	Peritoneal cavity	Increased stability	[30,31,85]
Alginate-agarose	Polymertization	Feline kidney cells	Peritoneal cavity		[28]
Alginate-chitosan		Baby hamster kidney cells and human mesenchymal stem cells	<i>In vitro</i> study	Subsize-size capsules	[34]
Alginate-chitosan		Chondrocytes	Subcutaneous space	Tissue engineering	[20,85,93]
Alginate-PTD-alginate	Lactose modified chitosan	Choroid plexus and islets of Langerhans	<i>In vitro</i> study	Increased mechanical properties	[21,22]
			Brain, peritoneal cavity and subcutaneous space	Diabetes and neuroprotection	[19,65,69]

### 2.2.1. Biocompatibility

Biocompatibility of microcapsules and their biomaterials' components is a critical issue if the long-term efficacy of this technology is aimed. As previously mentioned, biocompatibility data regarding alginate capsules have only been described in the literature up to now.

A key element in the validation of alginate for implantation purposes is the efficient purification process to monitor and remove all its contaminants which include endotoxins, certain proteins and polyphenols. Even commercially available ultrapure alginates have been found to contain residual proteins in amounts to compromise microcapsule biocompatibility [50–52]. Although most purification methods have been found to succeed in reducing endotoxins and polyphenols, these methods have not achieved a correct elimination of the protein content [50]. In addition, the purification process might induce a number of changes in the polymers' features which should be carefully controlled [51].

Several experiments have demonstrated that implantation surgery can activate a non-specific response against implanted cells. Moreover, although it has been described as a transient response, it is difficult to avoid as it cannot be solved by chemical modification of the capsule. In order to overcome this obstacle, the use of transient immunosuppressive protocols have been recently proposed [53,54].

**Table 2**  
Alternative materials to alginate employed for cell encapsulation

Material	Modification	Cell	Application site	Application	Ref
PEG		Condylar chondrocytes, murine embryonic liver cells and primary hepatocytes	<i>In vitro</i> study	Tissue engineering and liver system	[37,38]
Chitosan		Human periodontal ligament fibroblasts and chondrocytes	<i>In vitro</i> study	Tissue engineering	[40,87]
PES hollow fibers		Recombinant myoblasts, human amniotic epithelial cells	Subcutaneous space and striatum.	Metachromatic leukodystrophy, Parkinson's disease and Mucopolysaccharidosis	[43,44,73,76]
Collagen		Myoblasts	<i>In vitro</i> study		[42]
Hyaluronic Acid		Auricular chondrocytes	<i>In vitro</i> study	Cartilage formation	[41]
Dextran	With RGD	Human embryonic stem cells	<i>In vitro</i> study	Control of vascular differentiation	[88]
EHD and PEGDA		Bone marrow stromal cells	<i>In vitro</i> study	Osteodifferentiation	[86]
PMBV and PVA		Murine fibroblasts	<i>In vitro</i> study	Controllable cell containing hydrogel	[45]
PGSA		Neuroblastoma and human embryonic stem cells	Subcutaneous space	Tissue engineering	[39]
Agarose		Murine embryonic stem cells and feline kidney cells	<i>In vitro</i> study	Tissue engineering	[46]
Agarose	With gelatin	Crandall-Reese feline kidney cells	<i>In vitro</i> study	Increase in metabolic activity	[47]
PLGA		Bone marrow stromal cells	Calvarial defects	Bone regeneration	[90]
Multilayer		Islets of Langerhans	<i>In vitro</i> study	Reduction of capsule size	[48,49]

In addition, transplantation of encapsulated cells is associated with the release of bioactive proteins from the host such as fibrinogen, thrombin, histamine and fibronectin. These factors induce an influx of granulocytes, basophils, mast cells and macrophages during the first days after implantation. Mast cells and macrophages produce bioactive factors such as IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  and histamine, which stimulate cells in the capsules. Within two weeks, basophils and granulocytes gradually disappear from the graft site while macrophages and some fibroblasts remain attached to an average of 2–10% of the capsules. These attached macrophages remain activated and contribute to the deleterious circle of activation. Thus, although it is thought that the loss of 2–10% of capsules is not important for the functionality of the remaining 90–98%, different studies show that it is mandatory to completely delete overgrowth of the capsules [17,55].

Another important issue to take into consideration is the diameter of the capsule as it could influence the immune response against capsules. An interesting approach using agarose capsules of different diameter developed by Sakai et al. revealed that cellular reaction to the smaller capsules was much lower than that to the larger capsules [56].

Finally, an interesting advance to predict biocompatibility was recently reported by de Vos et al. where the measurement of the electrical charge of the surface by means of zeta potential was found to predict the interfacial reactions between the biomaterial and the surrounding tissue [57].

### 2.2.2. Searching for the optimal delivery site

Determining the optimal site for systemic drug delivery is a matter of intense research. Fig. 2 represents the main implantation sites employed in cell encapsulation technology. Several factors have to be taken into



consideration such as biocompatibility and mechanical resistance. In general, intraperitoneal implantations result in poorer functionality of the devices due to an increased inflammatory response that takes place in the peritoneum. Dufrane et al. investigated the impact of implantation sites on biocompatibility by implanting pig islets (using alginate) intraperitoneally (IP), subcutaneously (SC) and under the kidney capsule (KC) [58]. Capsules implanted intraperitoneally showed decreased viability and insulin secretion rates than capsules implanted subcutaneously or under the kidney capsule. Furthermore, the immune response against capsules implanted intraperitoneally was more severe than against capsules implanted subcutaneously or under the kidney capsule (Fig. 3). In a similar approach carried out by Thanos et al., alginate-polycation microcapsules implanted into the striatum and the subcutaneous space were found to be more stable (6 months) in comparison to the peritoneal cavity (2 months) [59]. Finally, our research group also observed that encapsulated erythropoietin-secreting myoblasts found a more favorable environment when implanted in the subcutaneous space of allogeneic recipients for seven months rather than in the peritoneum [60].

### 2.2.3. Other issues

An important issue that involves the use of spherical-shaped microcapsules mainly, is the formation of local domains of necrotic cells due to internal oxygen mass transfer limitations. Different solutions have been proposed to overcome this obstacle. On the one hand, as previously described, Sakai et al. developed alginate–agarose subsieve-size capsules of less than 100  $\mu\text{m}$  in diameter to improve oxygen transfer into the capsule where cell viability was observed not

to be affected by the small size of the capsules [34]. On the other hand, Khattak et al. included synthetic oxygen carriers (perfluorocarbons) in alginate gels to improve oxygen supply and transport and detected an improvement in cell viability and metabolic activity due to a reduction in anaerobic glycolysis which resulted in an increase in glucose consumption/lactate production efficiency [61].

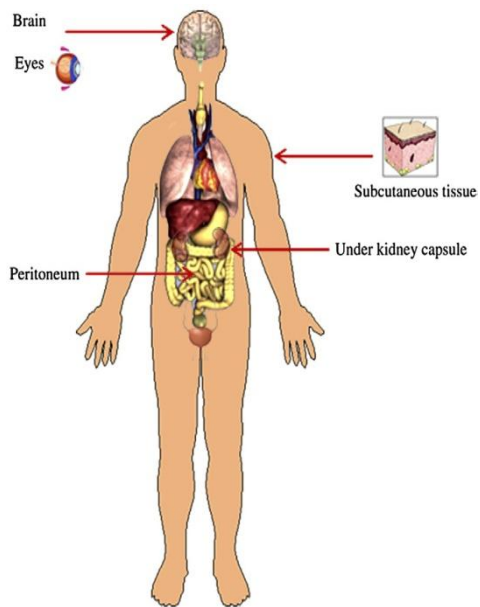
Another challenge in cell encapsulation is the ability to monitor the implanted devices. Once microcapsules are transplanted, the only way to assess their functional state is through invasive recovery surgery. An interesting approach to overcome this situation has been recently proposed by Barnett et al. using alginate-based radiopaque microcapsules containing either barium sulfate or bismuth sulfate which could be monitored by X-ray [62]. However, although cell viability and capsule permeability were not affected by radiopaque agents it should be mentioned that the metals employed in this work are toxic both for the encapsulated cells and the recipient.

## 3. The versatility of cell encapsulation technology

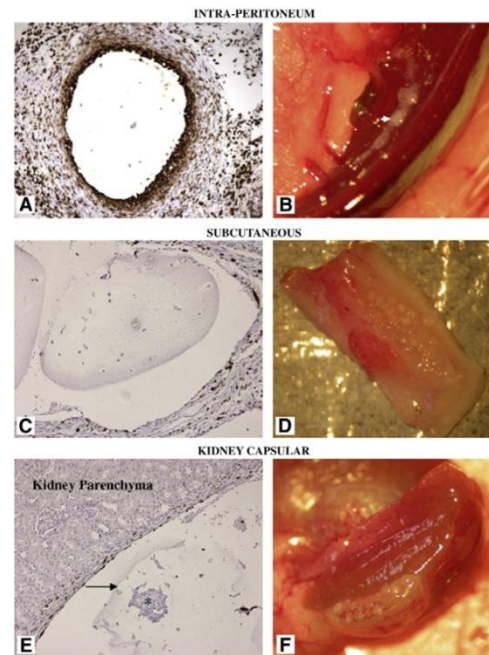
Many diseases are closely tied with deficient or subnormal metabolic and secretory cell functions. Hypoparathyroidism, hemophilia, Parkinson's disease, *Diabetes mellitus* and hepatic failure among many others belong to this kind of degenerative and disabling disorders. Milder forms of these diseases can be managed by a variety of treatments. However, it is often extremely complicated or even impossible to mimic the "moment-to-moment" precise regulation and the complex roles of the hormone, factor, or enzyme that is not produced by the body. As a consequence, this failure leads to serious secondary side-effects associated with a

reduction in life quality of patients. Moreover, the health care costs are staggering.

A requirement of paramount importance to implement this technology for the treatment of chronic diseases is the long-term production of therapeutic products from the encapsulated cells. A suitable election of the cells holds the key to the success of any biomedical application.



**Fig.2.** Main implantation sites employed in cell encapsulation technology.



**Fig.3.** Left photomicrographs correspond to capsules explanted on day 30 after transplantation from IP (A), SC (C), and KC (E). Immunostaining for CD68 (brown) demonstrated a severe reaction against capsules from IP compared with SC and KC (arrow=limit of the capsule; \*= pig islets, original magnification: 10 $\times$ ). Right: representative photomicrographs of encapsulated pig islets after 30 days of transplantation. Capsules from IP were completely entrapped in fibrosis (B, arrow head) compared with freed capsules found in SC (D) and KC (F). Reproduced, with permission, from [58]. © 2006 Elsevier Ltd.

### 3.1. Bioorgans: primary cells

Transplantation of encapsulated pancreatic islets for the treatment of *Diabetes mellitus* has been the most common application of cell encapsulation technology until recently. Diabetes is a global disease with an incidence rate of about 3–5% of the population. According to the up-date statistics of the WHO, 150 million people around the world suffer from *Diabetes mellitus* at present and besides, this figure will be duplicated by 2025.

The many contributions developed by highly experienced research groups are shedding light on the main challenges of cell encapsulation technology. In the case of diabetes for instance, based on the promising results obtained in allo- and xenotransplantation approaches [63–66], a pilot clinical trial has recently been initiated by Calafiore et al. [67,68]. Microencapsulated human islets were implanted into 10 non-immunosuppressed patients with type 1 diabetes. Data of two patients have been published and although treatment with exogenous insulin was not totally suspended, the measurement of several parameters indicated that pancreatic islets remained metabolically active. In addition, as presented at the XV International Workshop on Bioencapsulation and COST 865 Meeting, held in Vienna, their clinical study is ongoing and improvements in the results are being observed due to an important advance in achieving a cell source of higher quality. It could be concluded that the correct isolation and treatment of cells shows to be of outstanding importance if a successful clinical outcome is desired.

Primary cells are also currently under study for the treatment of neurodegenerative disorders. Emerich et al. [69] developed an alginate-based encapsulation system where choroid plexus were immobilized in an effort

to achieve an appropriate delivery of neurotrophic factors to the brain in a primate model of Huntington's disease (HD). Choroid plexus transplants significantly protected striatal neurons confirming that encapsulated choroid plexus might be useful for preventing the degeneration of neurons in HD. However, a troublesome challenge that still needs to be solved in choroid plexus encapsulation that may also be encountered during islet encapsulation is the aggregation these types of cells tend to. This leads to the formation of empty capsules during the process of encapsulation. As a result, an appropriate technique to distinguish between empty and cell-loaded microcapsules seems to be an important challenge that must be overcome in order for this approach to become a successful alternative to HD treatment.

One last approach to be mentioned has been recently proposed by Jeon et al. for the treatment of chronic neuropathic pain [70]. Using a rat model of neuropathic pain, the implantation of encapsulated bovine-derived chromaffin cells, which are known to secrete several neuroactive substances, resulted in high levels of catecholamines and met-enkephalin demonstrating the effectiveness of the developed system.

### 3.2. Living drug factories: genetically modified cells

To succeed in clinical approaches of cell-based therapies an inexhaustible source of cells or tissues capable of delivering the therapeutic agent in an appropriate form, often in response to physiological cues is required. Genetic engineering has emerged as a promising tool for addressing this challenge, but genetically modified cells often arise from an allogeneic or xenogeneic source and might also require protection from the host immune system. The appropriate election of the cell source for a



specific application depends on functional requirements, processing, storage, availability and cost [71].

Central nervous system and cardiovascular disorders pose an important challenge to controlled drug delivery systems due to the difficulty to reach specific targets in the brain and the need of sustained drug levels. However, promising results have been achieved by many research groups among which the strategies developed by Yasuhara et al. [72] and Sajadi et al. [73] (to treat Parkinson's disease) and Consiglio et al. [43] (to treat metachromatic leukodystrophy) should be highlighted. Moreover, recently, a Phase I trial has been completed by Sieving et al. [74] where a 6-month period delivery of ciliary neurotrophic factor (CNTF) by encapsulated cells derived from a human retinal pigment epithelial cell line (ARPE-19) was achieved when implanted into human eyes. The safety results were encouraging with no systemic or ocular complications ensued, with the exception of a single shallow choroidal detachment in one patient. However, they interpreted this outcome as likely secondary to the surgery procedure rather than to effects of CNTF. Regarding cardiovascular disorders, a myocardial infarction rat model was recently evaluated using microencapsulated Chinese hamster ovary (CHO) cells delivering rat vascular endothelial growth factor (rat VEGF) [75]. A 21-day *in vivo* study was achieved where anti-CHO antibody titers were found to be significantly lower to the control group, thus suggesting a novel alternative strategy for therapeutic angiogenesis in ischemic heart disease.

Other interesting therapeutic applications employing genetically engineered cells include the immobilization of genetically immortalized human amniotic epithelial cells to treat mucopolysaccharidosis type VII (MPSVII) [76]. Significant amounts of  $\beta$ -

glucuronidase were secreted seven days after microcapsule implantation in mice, confirming the strategy as an effective armamentarium for the treatment of MPSVII.

Our research group succeeded in a long-term *in vivo* assay where genetically engineered erythropoietin (Epo)-producing C2C12 myoblasts were implanted in allogeneic and syngeneic mice [60,77,78]. High and constant hematocrit levels were maintained during the study periods after only one shot of cell-loaded microcapsules and without implementation of immunosuppressive protocols. Moreover, as previously mentioned, the subcutaneous space was found to be an improved alternative to intraperitoneal implantation of the devices usually performed which was also evidenced by the formation of a fully rich vasculature all across the capsule implant, also due to the pharmacodynamic behavior and the angiogenic and immune-modulatory properties of Epo. An important challenge to overcome in the future is the regulation of the delivered Epo in order to avoid too high hematocrit levels which could lead to undesired side-effects such as polycythemia. This alternative technology could avoid the repeated weekly injections currently practiced in anemic patients.

Another important field of application is cancer therapy. Some interesting approaches recently carried out include the microencapsulation of engineered cells to deliver sustained levels of interleukin-6 (a pleiotropic cytokine that plays a central role in hepatic function and response) in an animal model of hepatocellular carcinoma (HCC) [79]. Although the *in vivo* study did not demonstrate significant changes in the rate of HCC progression, the current model may offer significant advantages over the use of immune-compromised animals employed to study tumor growth *in vivo* and the cost of cytokines used in other protein delivery

techniques. Last but not least, an interesting suicide gene therapy strategy has been recently developed by Dvir-Ginzberg et al. [80] based on the intraperitoneal transplantation of entrapped retroviral vector producer cells within porous 3D matrices. Mice bearing a tumorigenic dose of murine cancer colon cells induced a local and controlled release of viral particles resulting in a significantly higher survival rate relative to control groups.

### 3.3. Stem cell technology

An area of increasing interest in which microencapsulation of stem cells could be a promising therapeutic strategy is tissue replacement therapy, a relatively new research area with very limited data up to now. Stem cell integration upon implantation in the host tissue and to maintain the undifferentiated state to afterwards direct their differentiation could become the main objectives of the technology.

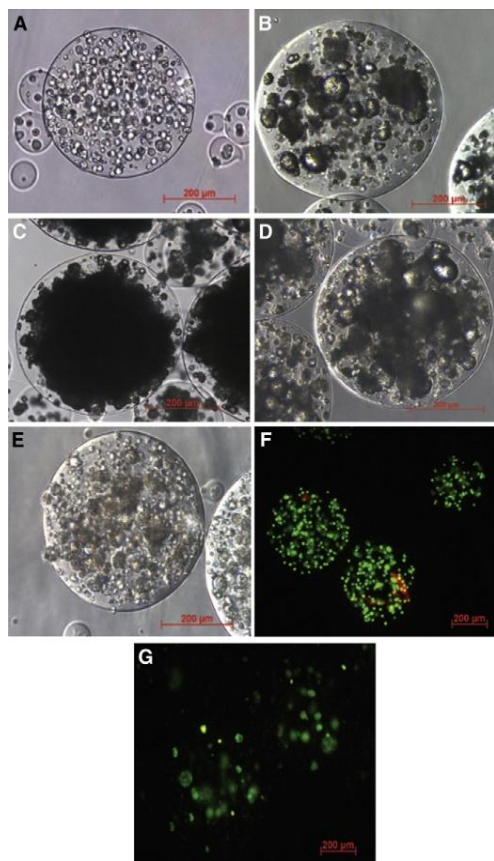
Most of the works have been based on *in vitro* approaches and the most employed material to develop the capsules is alginate. Whereas in some cases capsules are only composed of an alginate matrix [81–83], in other cases, the alginate matrix is covered with a polycation layer [18,84,85]. Other polymeric materials apart from alginate include PEG hydrogels, elastomers, and chitosan-hydroxyapatite hydrogels among others [38,39,46,86–88].

Although most of the published works are only *in vitro* approaches, some *in vivo* studies have been developed such as the implantation of encapsulated bone marrow mesenchymal stem cells to improve the formation of the osseous and cartilaginous architecture [89,90] and the transplantation of encapsulated embryonic stem cells (ESC) in order to overcome the rejection that may take place when transplanting ESCs into

recipients with different major histocompatibility antigens [91] (Fig. 4).

Last but not least, *in vivo* approaches employing genetically modified stem cells (to improve their characteristics) include the works carried out by Ding et al. and Babister et al. in the field of bone formation where on the one hand marrow derived mesenchymal stem cell encapsulation transfected with the BMP-2 gene was found to induce bone formation and on the other hand encapsulated human mesenchymal progenitor stem cells transfected with the Sox-9 gene revealed chondrogenic differentiation [92,93].

Although stem cell encapsulation technology poses as an interesting alternative to the current EC therapies, several issues need to be addressed by stem cell encapsulation technology to become a realistic proposal for clinical application. Most of the *in vivo* studies have been developed using immunodeficient animals. Therefore, *in vivo* assays are required to be carried out in immunocompetent recipients to study the effects derived from the activation of the host's immune system after implantation. Moreover, special attention should be paid to the polymers employed in the elaboration of the devices due to the fact that in order for encapsulated cells to integrate in the host's tissue, polymers with suitable degradation kinetics are required.



**Fig.4.** Encapsulated mESC retrieved from the peritoneal cavity of BALB/c mice were encapsulated as single cells on day 0 (A). Capsules retrieved at one month (B), two months (C), and three months (D) have formed aggregates in contrast to being single cells prior to transplantation. The same occurred during culture *in vitro* after one week (E). Retrieved capsules were also assessed for viability using fluorescent microscopy. Viable cells stain green (6-CFDA) and dying cells red (PI) prior to transplantation (F) and two months post-transplantation (G). Reproduced, with permission, from [91]. © 2006 Lippincott Williams and Wilkins.

#### 4. Concluding remarks. Future directions and challenges

The above examples represent only some of the current applications of cell encapsulation but authors believe this technology may see exciting improvement in the next few decades. With continuing advances in genetics, materials science, pharmaceutical technology, biology and chemical engineering, improvements will lead to progression in this therapeutic approach which may become one day closer to a realistic proposal for clinical application. In addition, due to the major advantages cell encapsulation offers as a living drug delivery system, it can be expected that its practical importance will continue to steadily increase in the future.

#### Acknowledgments

This project was partially supported by the Ministry of Education and Science (BIO2005-02659). A. Murua and M. de Castro thank the Basque Government (Department of Education, Universities and Research) for the fellowship grants. A. Portero thanks the University of the Basque Country for the fellowship grant.

#### References

- [1] L.S. Nair, C.T. Laurencin, Biodegradable polymers as biomaterials, *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 762–798.
- [2] J.M. Karp, R. Langer, Development and therapeutic applications of advanced biomaterials, *Curr. Opin. Biotechnol.* 18 (2007) 454–459.
- [3] T.P. Richardson, M.C. Peters, A.B. Ennett, D.J. Mooney, Polymeric system for dual growth factor delivery, *Nat. Biotechnol.* 19 (2001) 1029–1034.
- [4] Q. Sun, R.R. Chen, Y. Shen, D.J. Mooney, S. Rajagopalan, P.M. Grossman, Sustained vascular endothelial growth factor delivery enhances angiogenesis and perfusion in ischemic hind limb, *Pharm. Res.* 22 (2005) 1110–1116.
- [5] K.E. Uhrich, S.M. Cannizzaro, R.S. Langer, K.M. Shakesheff, Polymeric systems for controlled drug release, *Chem. Rev.* 99 (1999) 3181–3198.

- [6] J.A. Champion, Y.K. Katare, S. Mitragotri, Particle shape: a new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers, *J. Control. Release* 121 (2007) 3–9.
- [7] D.C. Domínguez, R. Lopes, M.L. Torres, Proteomics: clinical applications, *Clin. Lab. Sci* 20 (2007) 245–248.
- [8] A. Bucht, P. Larsson, L. Weisbrot, C. Thorne, P. Pisa, G. Smedegard, E.C. Keystone, A. Gronberg, Expression of interferon-gamma (IFN-gamma), IL-10, IL-12 and transforming growth factor-beta (TGF-beta) mRNA in synovial fluid cells from patients in the early and late phases of rheumatoid arthritis (RA), *Clin. Exp. Immunol.* 103 (1996) 357–367.
- [9] S. Chaterji, I.K. Kwon, K. Park, Smart polymeric gels: Redefining the limits of biomedical devices, *Prog. Polym. Sci.* 32 (2007) 1083–1122.
- [10] E. Mata, A.M. Carcaboso, R.M. Hernández, M. Igartua, G. Corradin, J.L. Pedraz, Adjuvant activity of polymer microparticles and Montanide ISA 720 on immune responses to Plasmodium falciparum MSP2 long synthetic peptides in mice, *Vaccine* 25 (2007) 877–885.
- [11] B.S. Zolnik, D.J. Burgess, Evaluation of in vivo-in vitro release of dexamethasone from PLGA microspheres, *J. Control. Release* 127 (2008) 137–145.
- [12] O. Benny, S.K. Kim, K. Gvili, I.S. Radzishvsky, A. Mor, L. Verduzco, L.G. Menon, P.M. Black, M. Machluf, R.S. Carroll, In vivo fate and therapeutic efficacy of PF-4/CTF microspheres in an orthotopic human glioblastoma model, *FASEB J.* 22 (2008) 488–499.
- [13] K. Morimoto, S. Chono, T. Kosai, T. Seki, Y. Tabata, Design of cationic microspheres based on aminated gelatin for controlled release of peptide and protein drugs, *Drug Deliv.* 15 (2008) 113–117.
- [14] T. Jiang, S.G. Kumbar, L.S. Nair, C.T. Laurencin, Biologically active chitosan systems for tissue engineering and regenerative medicine, *Curr. Top. Med. Chem.* 8 (2008) 354–364.
- [15] D.K. Malik, S. Baboota, A. Ahuja, S. Hasan, J. Ali, Recent advances in protein and peptide drug delivery systems, *Curr. Drug Deliv.* 4 (2007) 141–151.
- [16] S.D. Patil, F. Papadmitrakopoulos, D.J. Burgess, Concurrent delivery of dexamethasone and VEGF for localized inflammation control and angiogenesis, *J. Control. Release* 117 (2007) 68–79.
- [17] P. de Vos, A. Andersson, S.K. Tam, M.M. Faas, J.P. Hallé, Advances and barriers in mammalian cell encapsulation for treatment of diabetes, *Immunol. Endocr. Metabol. Agents Med. Chem.* 6 (2006) 139–153.
- [18] X. Wang, W. Wang, J. Ma, X. Guo, X. Yu, X. Ma, Proliferation and differentiation of mouse embryonic stem cells in APA microcapsule: a model for studying the interaction between stem cells and their niche, *Biotechnol. Prog.* 22 (2006) 791–800.
- [19] C.G. Thanos, R. Calafiore, G. Basta, B.E. Bintz, W.J. Bell, J. Hudak, A. Vasconcellos, P. Schneider, S.J.M. Skinner, M. Geaney, P. Tan, R.B. Elliot, M. Tatnell, L. Escobar, H. Qian, E. Mathiowitz, D.F. Emerich, Formulating the alginate-polyornithine biocapsule for prolonged stability: evaluation of composition and manufacturing technique, *J. Biomed. Mater. Res.* A 83 (2007) 216–224.
- [20] L. Baruch, M. Machluf, Alginate-chitosan complex coacervation for cell encapsulation: effect on mechanical properties and on long-term viability, *Biopolymers* 82 (2006) 570–579.
- [21] E. Marsich, M. Borgogna, I. Donati, P. Mozetic, B.L. Strand, S.G. Salvador, F. Vittur, S. Paoletti, Alginate/lactose-modified chitosan hydrogels: a bioactive biomaterial for chondrocyte encapsulation, *J. Biomed. Mater. Res.* A 84 (2008) 364–376.
- [22] I. Donati, I.J. Haug, T. Scarpa, M. Borgogna, K.I. Draget, G. Skjak-Braek, S. Paoletti, Synergistic effects in semidilute mixed solutions of alginate and lactose-modified chitosan (chitlac), *Biomacromolecules* 8 (2007) 957–962.
- [23] B. Baroli, Photopolymerization of biomaterials: issues and potentialities in drug delivery, tissue engineering, and cell encapsulation applications, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81 (2006) 491–499.
- [24] S. Ponce, G. Orive, R. Hernández, A.R. Gascón, J.L. Pedraz, B.J. de Haan, M.M. Faas, H.J. Mathieu, P. de Vos, Chemistry and the biological response against immunisolating alginate-polycation capsules of different composition, *Biomaterials* 27 (2006) 4831–4839.
- [25] E. Hill, T. Boonthekul, D.J. Mooney, Regulating activation of transplanted cells controls tissue regeneration, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 2494–2499.
- [26] E. Hill, T. Boonthekul, D.J. Mooney, Designing scaffolds to enhance transplanted myoblast survival and migration, *Tissue Eng.* 12 (2006) 1295–1304.
- [27] A.M. Rokstad, I. Donati, M. Borgogna, J. Oberholzer, B.L. Strand, T. Espevik, G. Skjak-Braek, Cell-compatible covalently reinforced beads obtained from a chemoenzymatically engineered alginate, *Biomaterials* 27 (2006) 4726–4737.
- [28] J.T. Wilson, W. Cui, X. Sun, C. Tucker-Burden, C.J. Weber, E.L. Chaikof, In vivo biocompatibility and stability of a substrate-supported polymerizable membrane mimetic film, *Biomaterials* 28 (2007) 609–617.
- [29] Y.A. Morch, I. Donati, B.L. Strand, G. Skjak-Braek, Molecular engineering as an approach to design new functional properties of alginate, *Biomacromolecules* 8 (2007) 2809–2814.

- [30] J. Dusseault, F.A. Leblond, R. Robitaille, G. Jourdan, J. Tessier, M. Ménard, N. Henley, J.P. Hallé, Microencapsulation of living cells in semi-permeable membranes with covalently cross-linked layers, *Biomaterials* 26 (2005) 1515–1522.
- [31] J. Dusseault, G. Langlois, M. Meunier, M. Ménard, C. Perreault, J.P. Hallé, The effect of covalent cross-links between the membrane components of microcapsules on the dissemination of encapsulated malignant cells, *Biomaterials* 29 (2008) 917–924.
- [32] S. Sakai, K. Kawakami, Synthesis and characterization of both ionically and enzymatically cross-linkable alginate, *Acta Biomater.* 3 (2007) 495–501.
- [33] S. Sakai, I. Hashimoto, Y. Ogushi, K. Kawakami, Peroxidase-catalyzed cell encapsulation in subsieve-size capsules of alginate with phenol moieties in water-immiscible fluid dissolving H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *Biomacromolecules* 8 (2007) 2622–2626.
- [34] S. Sakai, I. Hashimoto, K. Kawakami, Development of alginate-agarose subsieve size capsules for subsequent modification with a polyelectrolyte complex membrane, *Biochem. Eng. J.* 30 (2006) 76–81.
- [35] S. Miura, Y. Teramura, H. Iwata, Encapsulation of islets with ultra-thin polyion complex membrane through poly(ethylene-glycol)-phospholipids anchored to cell membrane, *Biomaterials* 27 (2006) 5828–5835.
- [36] A.M. Smith, J.J. Harris, R.M. Shelton, Y. Perrie, 3D culture of bone-derived cells immobilised in alginate following light-triggered gelation, *J. Control. Release* 119 (2007) 94–101.
- [37] G.D. Nicodemus, I. Villanueva, S.J. Bryant, Mechanical stimulation of TMJ condylar chondrocytes encapsulated in PEG hydrogels, *J. Biomed. Mater. Res. A* 83 (2007) 323–331.
- [38] G.H. Underhill, A.A. Chen, D.R. Albrecht, S.N. Bhatia, Assessment of hepatocellular function within PEG hydrogels, *Biomaterials* 28 (2007) 256–270.
- [39] S. Gerecht, S.A. Townsend, H. Pressler, H. Zhu, C.L.E. Nijst, J.P. Bruggeman, J.W. Nichol, R. Langer, A porous photocurable elastomer for cell encapsulation and culture, *Biomaterials* 28 (2007) 4826–4835.
- [40] Y. Hong, H. Song, Y. Gong, Z. Mao, C. Gao, J. Shen, Covalently crosslinked chitosan hydrogel: properties of in vitro degradation and chondrocyte encapsulation, *Acta Biomater.* 3 (2007) 23–31.
- [41] C. Chung, J. Mesa, G.J. Miller, M.A. Randolph, T.J. Gill, J.A. Burdick, Effects of auricular chondrocyte expansion on neocartilage formation in photocrosslinked hyaluronic acid networks, *Tissue Eng.* 12 (2006) 2665–2673.
- [42] T.J. Wu, H.H. Huang, Y.M. Hsu, S.R. Lyu, Y.J. Wang, A novel method of encapsulating and cultivating adherent mammalian cells within collagen microcarriers, *Biotechnol. Bioeng.* 98 (2007) 578–585.
- [43] A. Consiglio, S. Martino, D. Dolcetta, G. Cusella, M. Conese, S. Marchesini, G. Benaglia, L. Wrabetz, A. Orlacchio, N. Déglon, P. Aebischer, G.M. Severini, C. Bordignon, Metabolic correction in oligodendrocytes derived from metachromatic leukodystrophy mouse model by using encapsulated recombinant myoblasts, *J. Neurol. Sci.* 255 (2007) 7–16.
- [44] W.E. Blanco-Bose, B.L. Schneider, P. Aebischer, Inducing tolerance to a soluble foreign antigen by encapsulated cell transplants, *Mol. Ther.* 13 (2006) 447–456.
- [45] T. Konno, K. Ishihara, Temporal and spatially controllable cell encapsulation using a water-soluble phospholipid polymer with phenylboronic acid moiety, *Biomaterials* 28 (2007) 1770–1777.
- [46] S. Sakai, I. Hashimoto, K. Kawakami, Production of cell enclosing hollow-core agarose microcapsules via jetting in water-immiscible liquid paraffin and formation of embryoid body-like spherical tissues from mouse ES cells enclosed within these microcapsules, *Biotechnol. Bioeng.* 99 (2008) 235–243.
- [47] S. Sakai, I. Hashimoto, K. Kawakami, Agarose-gelatin conjugate for adherent cell-enclosing capsules, *Biotechnol. Lett.* 29 (2007) 731–735.
- [48] Y. Teramura, Y. Kaneda, H. Iwata, Islet-encapsulation in ultra-thin layer-by-layer membranes of poly(vinyl alcohol) anchored to poly(ethyleneglycol)-lipids in the cell membrane, *Biomaterials* 28 (2007) 4818–4825.
- [49] S. Krol, S. del Guerra, M. Grupillo, A. Diaspro, A. Gliozzi, P. Marchetti, Multilayer nanoencapsulation: New approach for immune protection of human pancreatic islets, *Nano Lett.* 6 (2006) 1933–1939.
- [50] J. Dusseault, S.K. Tam, M. Ménard, S. Polizu, G. Jourdan, L. Yahia, J.P. Hallé, Evaluation of alginate purification methods: Effects on polyphenol, endotoxin, and protein contamination, *J. Biomed. Mater. Res. A* 76 (2006) 243–251.
- [51] S.K. Tam, J. Dusseault, S. Polizu, M. Ménard, J.P. Hallé, L. Yahia, Impact of residual contamination on the biofunctional properties of purified alginates used for cell encapsulation, *Biomaterials* 27 (2006) 1296–1305.
- [52] G. Orive, S.K. Tam, J.L. Pedraz, J.P. Hallé, Biocompatibility of alginate-poly-L-lysine microcapsules for cell therapy, *Biomaterials* 27 (2006) 3691–3700.
- [53] P. Blasi, S. Giovagnoli, A. Schoubeen, M. Ricci, C. Rossi, G. Luca, G. Basta, R. Calafiore, Preparation and in vitro and in vivo characterization of composite microcapsules for cell encapsulation, *Int. J. Pharm.* 324 (2006) 27–36.
- [54] M. Figliuzzi, T. Plati, R. Cornolti, F. Adobati, A.



- Fagiani, L. Rossi, G. Remuzzi, A. Remuzzi, Biocompatibility and function of microencapsulated pancreatic islets, *Acta Biomater.* 2 (2006) 221–227.
- [55] P. de Vos, M.M. Faas, B. Strand, R. Calafiore, Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets, *Bio-materials* 27 (2006) 5603–5617.
- [56] S. Sakai, C. Mu, K. Kawabata, I. Hashimoto, K. Kawakami, Biocompatibility of subsieve-size capsules versus conventional-size microcapsules, *J. Biomed. Mater. Res. A* 78 (2006) 394–398.
- [57] P. de Vos, B.J. de Haan, J.A.A.M. Kamps, M.M. Faas, T. Kitano, Zeta-potentials of alginate-PLL capsules: a predictive measure for biocompatibility? *J. Biomed. Mater. Res. A* 80 (2006) 813–819.
- [58] D. Dufrane, M. Van Steenberghe, R.M. Goebbels, A. Saliez, Y. Guiot, P. Gianello, The influence of implantation site on the biocompatibility and survival of alginate encapsulated pig islets in rats, *Biomaterials* 27 (2006) 3201–3208.
- [59] C.G. Thanos, B.E. Bintz, D.F. Emerich, Stability of alginate-polyornithine microcapsules is profoundly dependent on the site of transplantation, *J. Biomed. Mater. Res. A* 81 (2007) 1–11.
- [60] G. Orive, M. De Castro, S. Ponce, R.M. Hernández, A.R. Gascón, J.L. Pedraz, Long-term expression of erythropoietin from myoblasts immobilized in biocompatible and neovascularized microcapsules, *Mol. Ther.* 12 (2005) 283–289.
- [61] S.F. Khattak, K.S. Chin, S.R. Bhatia, S.C. Roberts, Enhancing oxygen tension and cellular function in alginate cell encapsulation devices through the use of perfluorocarbons, *Biotechnol. Bioeng.* 96 (2007) 156–166.
- [62] B.P. Barnett, D.L. Kraitchman, C. Lauzon, P. Magee, W.D. Walczak, A. Wilson, A. Arepally, J.M.W. Bulte, Radiopaque alginate microcapsules for X-ray visualization and immunoprotection of cellular therapeutics, *Mol. Pharm.* 3 (2006) 531–538.
- [63] S.P. Black, I. Constantinidis, H. Cui, C. Tucker-Burden, C.J. Weber, S.A. Safley, Immune responses to an encapsulated allogeneic islet  $\beta$ -cell line in diabetic NOD mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340 (2006) 236–243.
- [64] S. Schneider, P.J. Feilen, F. Brunnenmeier, T. Minnemann, H. Zimmermann, U. Zimmermann, M.M. Weber, Long-term graft function of adult rat and human islets encapsulated in novel alginate-based microcapsules after transplantation in immunocompetent diabetic mice, *Diabetes* 54 (2005) 687–693.
- [65] R.B. Elliott, L. Escobar, P.L.J. Tan, O. Garkavenko, R. Calafiore, P. Basta, A.V. Vasconcellos, D.F. Emerich, C. Thanos, C. Bamba, Intraperitoneal alginate-encapsulated neonatal porcine islets in a placebo-controlled study with 16 diabetic cynomolgus primates, *Transplant. Proc.* 37 (2005) 3505–3508.
- [66] D. Dufrane, R.M. Goebbels, A. Saliez, Y. Guiot, P. Gianello, Six-Month Survival of microencapsulated pig islets and alginate biocompatibility in primates: Proof on concept, *Transplantation* 81 (2006) 1345–1353.
- [67] R. Calafiore, G. Basta, G. Luca, A. Lemmi, L. Racanicchi, F. Mancuso, M.P. Montanucci, P. Brunetti, Standard technical procedures for microencapsulation of human islets for graft into nonimmunosuppressed patients with Type 1 diabetes mellitus, *Transplant. Proc.* 38 (2006) 1156–1157.
- [68] R. Calafiore, G. Basta, G. Luca, A. Lemmi, M.P. Montanucci, G. Calabrese, L. Racanicchi, F. Mancuso, P. Brunetti, Microencapsulated pancreatic islet allografts into nonimmunosuppressed patients with type 1 diabetes: first two cases, *Diabetes Care* 29 (2006) 137–138.
- [69] D.F. Emerich, C.G. Thanos, M. Goddard, S.J.M. Skinner, M.S. Geany, W.J. Bell, B. Bintz, P. Schneider, Y. Chu, R.S. Babu, C.V. Borlongan, K. Boekelheide, S. Hall, B. Bryant, J.H. Kordower, Extensive neuroprotection by choroid plexus transplants in excitotoxin lesioned monkeys, *Neurobiol. Dis.* 23 (2006) 471–480.
- [70] Y. Jeon, K. Kwak, S. Kim, Y. Kim, J. Lim, W. Baek, Intrathecal implants of microencapsulated xenogenic chromaffin cells provide a long-term source of analgesic substances, *Transplant. Proc.* 38 (2006) 3061–3065.
- [71] K.W. Riddle, D.J. Mooney, in: V. Nedović, R. Willaert (Eds.), *Fundamentals of cell immobilisation biotechnology*, 1: Materials for cell immobilisation/encapsulation, Series: Focus on biotechnology, vol. 8A, Springer, 2004, pp. 1–19.
- [72] T. Yasuhara, I. Date, Intracerebral transplantation of genetically engineered cells for Parkinson's disease: toward clinical application, *Cell Transplant* 16 (2007) 125–132.
- [73] A. Sajadi, J-C. Bensadoun, B.L. Schneider, C. Lo Bianco, P. Aebischer, Transient striatal delivery of GDNF via encapsulated cells leads to sustained behavioral improvement in a bilateral model of Parkinson disease, *Neurobiol. Dis.* 22 (2006) 119–129.
- [74] P.A. Sieving, R.C. Caruso, W. Tao, H.R. Coleman, D.J.S. Thompson, K.R. Fullmer, R.A. Bush, Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 3896–3901.
- [75] H. Zhang, S-J. Zhu, W. Wang, Y-J. Wei, S-S. Hu, Transplantation of microencapsulated genetically modified xenogeneic cells augments

- angiogenesis and improves heart function, *Gene Ther.* 15 (2008) 40–48.
- [76] H. Nakama, K. Ohsugi, T. Otsuki, I. Date, M. Kosuga, T. Okuyama, N. Sakuragawa, Encapsulation cell therapy for mucopolysaccharidosis Type VII using genetically engineered immortalized human amniotic epithelial cells, *Tohoku J. Exp. Med.* 209 (2006) 23–32.
- [77] S. Ponce, G. Orive, R.M. Hernández, A.R. Gascón, J.M. Canals, M.T. Muñoz, J.L. Pedraz, In vivo evaluation of EPO-secreting cells immobilized in different alginate-PLL micro-capsules, *J. Control. Release* 116 (2006) 28–34.
- [78] A. Murua, M. de Castro, G. Orive, R.M.<sup>a</sup> Hernández, J.L. Pedraz, In Vitro Characterization and in vivo functionality of erythropoietin-secreting cells immobilized in alginate-poly-L-lysine-alginate microcapsules, *Biomacromolecules* 8 (2007) 3302–3307.
- [79] D.M. Moran, L.G. Koniaris, E.M. Jablonski, P.A. Cahill, C.R. Halberstadt, I.H. McKillop, Microencapsulation of engineered cells to deliver sustained high circulating levels of interleukin-6 to study hepatocellular carcinoma progression, *Cell Transplant.* 15 (2006) 785–798.
- [80] M. Dvir-Ginzberg, A. Konson, S. Cohen, R. Agbaria, Entrapment of retroviral vector producer cells in three-dimensional alginate scaffolds for potential use in cancer gene therapy, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 80 (2007) 59–66.
- [81] S.A. Abbah, W.W. Lu, D. Chan, K.M.C. Cheung, W.G. Liu, F. Zhao, Z.Y. Li, J.C.Y. Leong, K.D.K. Luk, In vitro evaluation of alginate encapsulated adipose-tissue stromal cells for use as injectable bone graft substitute, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347 (2006) 185–191.
- [82] M.B. Evangelista, S.X. Hsiang, R. Fernandes, P. Sampaio, H.J. Kong, C.C. Barrias, R. Salema, M.A. Barbosa, D.J. Mooney, P.L. Granja, Upregulation of bone cell differentiation through immobilization within a synthetic extracellular matrix, *Biomaterials* 28 (2007) 3644–3655.
- [83] E.P. Herrero, E.M.M. del Valle, M.A. Galán, Immobilization of mesenchymal stem cells and monocytes in biocompatible microcapsules to cell therapy, *Biotechnol. Prog.* 23 (2007) 940–945.
- [84] T. Maguire, A.E. Davidovich, E.J. Wallenstein, E. Novik, N. Sharma, H. Pedersen, I.P. Androulakis, R. Schloss, M. Yarmush, Control of hepatic differentiation via cellular aggregation in an alginate microenvironment, *Biotechnol. Bioeng.* 98 (2007) 631–644.
- [85] E.K.F. Yim, A.C.A. Wan, C. Le Visage, I.C. Liao, K.W. Leong, Proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cell encapsulated in polyelectrolyte complexation fibrous scaffold, *Biomaterials* 27 (2006) 6111–6122.
- [86] M.W. Betz, P.C. Modi, J.F. Caccamese, D.P. Coletti, J.J. Sauk, J.P. Fisher, Cyclic acetal hydrogel system for bone marrow stromal cell encapsulation and osteodifferentiation, *J. Biomed. Mater. Res. A* 86 (2008) 662–670.
- [87] B. Inanç, A. Eser Elçin, A. Koç, K. Baloş, A. Parlar, Y. Murat Elçin, Encapsulation and osteoinduction of human periodontal ligament fibroblasts in chitosan-hydroxyapatite microspheres, *J. Biomed. Mater. Res. A* 82 (2007) 917–926.
- [88] L.S. Ferreira, S. Gerecht, J. Fuller, H.F. Shieh, G. Vunjak-Novakovic, R. Langer, Bioactive hydrogel scaffolds for controllable vascular differentiation of human embryonic stem cells, *Biomaterials* 28 (2007) 2706–2717.
- [89] X. Cai, Y. Lin, G. Ou, E. Luo, Y. Man, Q. Yuan, P. Gong, Ectopic osteogenesis and chondrogenesis of bone marrow stromal stem cells in alginate system, *Cell. Biol. Int.* 31 (2007) 776–783.
- [90] D. Kaigler, P.H. Krebsbach, Z. Wang, E.R. West, K. Horger, D.J. Mooney, Transplanted endothelial cells enhance orthotopic bone regeneration, *J. Dent. Res.* 85 (2006) 633–637.
- [91] S.K. Dean, Y. Yulyana, G. Williams, K.S. Sidhu, B.E. Tuch, Differentiation of encapsulated embryonic stem cells after transplantation, *Transplantation* 82 (2006) 1175–1184.
- [92] H.F. Ding, R. Liu, B.G. Li, J.R. Lou, K.R. Dai, T.T. Tang, Biologic effect and immunisolating behavior of BMP-2 gene-transfected bone marrow-derived mesenchymal stem cells in APA microcapsules, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362 (2007) 923–927.
- [93] J.C. Babister, R.S. Tare, D.W. Green, S. Inglis, S. Mann, R.O.C. Oreffo, Genetic manipulation of human mesenchymal progenitors to promote chondrogenesis using “bead-in-bead” polysaccharide capsules, *Biomaterials* 29 (2008) 58–65.





**9. ENCAPSULACIÓN DE CÉLULAS PARA EL  
TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DEL  
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

**ARTÍCULO 2**

**Encapsulación de células para el tratamiento de  
enfermedades del sistema nervioso central  
Rev Neurol; 2010: 409-419**



## Encapsulación de células para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central

Aitziber Portero, Gorka Orive, Rosa M. Hernández, José Luis Pedraz

**Introducción.** Uno de los principales problemas que presenta la administración de fármacos en el sistema nervioso central (SNC) es atravesar la barrera hematoencefálica. Esto hace que, en muchos casos, el producto terapéutico no acceda en cantidad suficiente o que sea necesaria la utilización de sistemas especiales para su correcta administración.

**Objetivo.** Presentar un sistema tecnológico que permite la administración de forma continua y directa del producto terapéutico en el SNC; este sistema consiste en la inmovilización, en una matriz semipermeable, de células secretoras del producto terapéutico que se desea administrar. Se implanta en el SNC, facilitando el acceso del principio activo al lugar de la lesión.

**Desarrollo.** Durante los últimos años se ha investigado la utilización de esta tecnología en el tratamiento de diversas enfermedades que afectan al SNC, aunque la mayoría de los estudios realizados se han llevado a cabo en animales de experimentación y se encuentran, por tanto, en fase experimental. Se pretende revisar el estado actual del uso de esta tecnología como posible tratamiento de las enfermedades que afectan al SNC.

**Conclusión.** En vista de los resultados obtenidos en los distintos estudios realizados, la tecnología de encapsulación de células podría ser una estrategia eficaz para el tratamiento de enfermedades del SNC. Sin embargo, aún quedan por resolver varios aspectos importantes antes de que la tecnología de encapsulación de células pueda convertirse en una realidad en el ámbito clínico.

**Palabras clave.** Encapsulación de células. Enfermedades neurodegenerativas. Factores neurotróficos. Neuroprotección. Neurorregeneración. Terapia celular.

Laboratorio de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco (UPV/EHU). Vitoria-Gasteiz, Álava, España.

**Correspondencia:** Dr. José Luis Pedraz. Laboratorio de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad del País Vasco (UPV/EHU) P.º Universidad, 7. E-01006 Vitoria (Álava).

**Fax:** +34 945 013040.

**E-mail:** joseluis.pedraz@ehu.es

**Aceptado tras revisión externa:** 09.03.10.

**Cómo citar este artículo:**

Portero A, Orive G, Hernández RM, Pedraz JL. Encapsulación de células para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central. Rev Neurol 2010; 50: 409-19.

© 2010 Revista de Neurología

### Introducción

La administración de medicamentos en el sistema nervioso central (SNC) está limitada por la barrera hematoencefálica (BHE). Esta barrera biológica hace que el 98% de las moléculas pequeñas y casi el 100% de las moléculas grandes, entre las que se encuentran los anticuerpos monoclonales, las proteínas recombinantes y los productos de terapia génica, no atraviesen la BHE [1]. Para que una molécula tenga capacidad de atravesar la BHE en una cantidad significativa tiene que presentar dos características [2]: un peso molecular menor de 400 Da y una alta liposolubilidad. Todo ello dificulta de manera notable el tratamiento de las enfermedades que afectan al SNC.

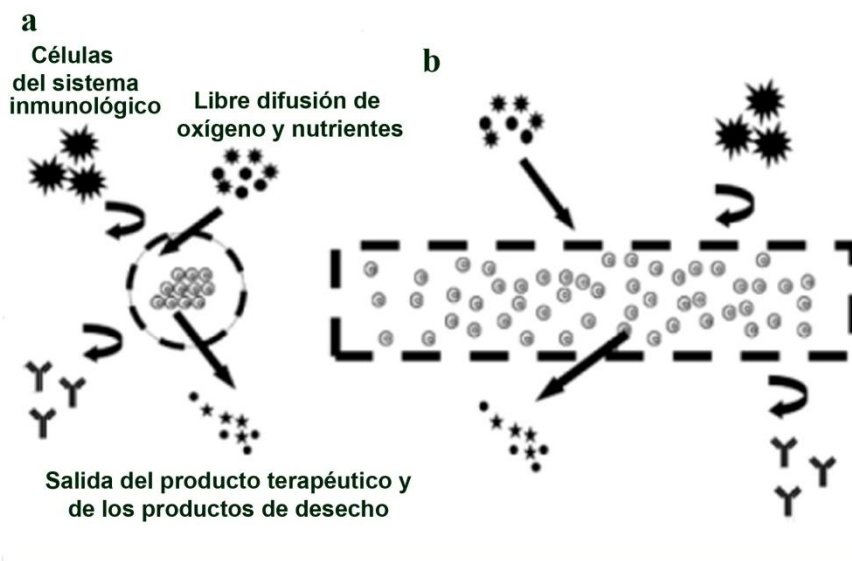
En los últimos años se han estudiado numerosos productos terapéuticos para hacer frente a las patologías que afectan al SNC [3,4], encontrándose entre ellos los denominados factores neurotróficos. Estos factores corresponden a un grupo de moléculas, generalmente proteínas, que regulan la diferenciación, el desarrollo y el mantenimiento del fenotipo neuronal, así como la sinaptogénesis y el desarrollo axónico y dendrítico [5]. Además, pueden proteger a las neuronas ante determinadas situaciones patológicas como la muerte por apoptosis o el daño celular producido por diferentes

agresiones [6].

Aunque en algunos casos, como en las enfermedades de Parkinson [7], Alzheimer [8], Huntington [9] y la epilepsia [10] entre otras, puedan llegar a ser eficaces, la administración de estos factores también se encuentra limitada por su baja capacidad para atravesar la BHE. Teniendo en cuenta que algunos de ellos no atraviesan la BHE [11,12] y que presentan una semivida de eliminación muy corta [13-15], la administración debe ser continua y próxima al lugar donde tiene que ejercer su efecto. No obstante, algunos grupos de investigación están trabajando en la elaboración de nanopartículas que permitan a los factores encapsulados atravesar la BHE cuando se administran por vía sistémica, lo que podría evitar la administración directa en el cerebro del paciente [16]. Además, dichos factores pueden generar efectos adversos importantes [17-21], lo cual ha provocado incluso la suspensión de ensayos clínicos ya iniciados [22]. Por otro lado, estas sustancias presentan un estrecho margen terapéutico, lo cual dificulta aún más su utilización [23].

Para poder administrar los factores neurotróficos de forma continua en el cerebro y así evitar el paso a través de la BHE, una posible estrategia tecnológica es la implantación de cápsulas con células productoras de dichos factores neurotróficos.

Figura. Dibujo representativo de los diferentes sistemas utilizados para la encapsulación de células  
 a) Microcápsula b) Fibra hueca



### Tecnología de la encapsulación de células: tipo de cápsulas y materiales empleados

Las cápsulas que pueden emplearse para la inmovilización de las células pueden ser de dos tipos: macrocápsulas y microcápsulas (Figura). Las macrocápsulas, también denominadas fibras huecas, están constituidas por un polímero semipermeable que rodea a las células encapsuladas. Su tamaño puede ser de unos milímetros hasta llegar a unos pocos centímetros. Las microcápsulas pueden ser de unas 200-600 micras. En este caso, las células se incorporan en matrices poliméricas recubiertas de una membrana semipermeable, la cual incrementa la estabilidad a la vez que regula la permeabilidad de la microcápsula. Las microcápsulas presentan una relación superficie/volumen más adecuada que las

macrocápsulas, lo que favorece la difusión del oxígeno al interior de la cápsula y, por consiguiente, la viabilidad celular [24]. Por el contrario, las macrocápsulas son más sencillas de retirar una vez implantadas, facilitando así la paralización del estudio en el caso de que el producto activo secretado produzca efectos secundarios importantes [25].

Los materiales utilizados para la encapsulación de las células son en la mayoría de los casos materiales no biodegradables, ya que no se busca la adaptación de las células inmovilizadas al SNC del paciente, sino la protección de éstas. No obstante, hoy día, se están desarrollando sistemas elaborados con materiales biodegradables que faciliten la integración de las células inmovilizadas en el paciente [26], aunque dichos sistemas no son objeto de esta revisión. Además, los materiales utilizados en la encapsulación de células también han de ser biocompatibles [27,28]

para poder evitar la respuesta del sistema inmunitario del paciente. En el caso de las microcápsulas, el material más ampliamente utilizado es el alginato, un polímero de origen natural obtenido a partir del alga *Laminaria hyperborea*, compuesto de ácido manurónico y ácido gulurónico, que ha demostrado ser biocompatible [29]. Para la elaboración de las denominadas fibras huecas se han utilizado distintos materiales como polisulfona [30], polietersulfona [31] y polietersulfona con polivinilalcohol [32].

### Ventajas de la tecnología de encapsulación de células

Una de las principales ventajas es que la cápsula permite el tránsito de nutrientes, oxígeno y desechos celulares mientras impide la entrada de moléculas y células de la respuesta inmune [33]. Esto podría evitar la respuesta inmunológica frente a las células implantadas, aumentando la supervivencia de éstas y disminuyendo o incluso evitando tener que administrar un tratamiento inmunosupresor, como sucede en un alto porcentaje de los pacientes transplantados. En un trabajo en el que se implantaron intratecalmente cápsulas con fibroblastos BHK (*baby hamster kidney*) modificados genéticamente para producir el factor neurotrófico ciliar (CNTF) en pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA), se estudió la respuesta inmunológica durante 20 semanas [34]. Los autores llegaron a la conclusión de que no se producía una respuesta inmunológica significativa frente a las cápsulas implantadas.

Además, las cápsulas permiten la salida del principio activo secretado, convirtiendo las células en una fuente continua del producto terapéutico [35]. Nuestro grupo de investigación ha conseguido liberar de forma continua eritropoyetina en un modelo murino

durante más de 330 días mediante esta tecnología, realizando una única administración y sin tratamiento inmunosupresor [36].

Por otra parte, la encapsulación permite la inmovilización de células genéticamente modificadas sin alterar el genoma del huésped, lo que disminuye el riesgo de formación de tumores [25].

### Inconvenientes de la tecnología de encapsulación de células

A pesar de las ventajas anteriormente expresadas, la tecnología de encapsulación de células para el tratamiento de enfermedades del SNC presenta varios inconvenientes que deben optimizarse.

Una de las principales limitaciones, en comparación con la administración por vía sistémica de sustancias terapéuticas, es que la implantación de las cápsulas en el SNC requiere cirugía, lo que hace que su administración sea más complicada y peligrosa para el paciente.

Otra de las desventajas de esta tecnología es la correcta selección de la línea celular a encapsular. Ello ha suscitado cierta controversia a la hora de elegir entre xenotrasplantes o alotrasplantes [37]. Las células para la realización de xenotrasplantes pueden obtenerse más fácilmente, pero existe el riesgo de transmisión de virus de animales al ser humano, por lo que los alotrasplantes presentan una mayor bioseguridad. Además, la línea celular a encapsular ha de presentar nula o baja capacidad de proliferación una vez encapsulada, ya que de lo contrario podrían generarse ciertos inconvenientes como son la salida de las células de la cápsula [33] o la formación, en el interior de la cápsula, de agregados celulares con células necróticas por la falta de difusión del oxígeno [35].

Además, el uso de células y no del producto terapéutico directamente dificulta el control de la dosis administrada. En algunos estudios se ha visto que la producción entre una cápsula y otra puede mostrar cierta variabilidad aunque éstas se hayan fabricado para su utilización en el mismo estudio y deriven del mismo clon celular [38,39]. También se ha visto que la producción de una misma cápsula durante un estudio puede ser bastante variable [40]. Quizá el mayor inconveniente encontrado es que en algunos estudios se ha observado que las células han dejado de producir la sustancia terapéutica [31,34]. Todo esto indica que para que la terapia con este tipo de sistemas tenga garantías de éxito, debe utilizarse una línea celular con una producción estable y duradera.

### Objetivo

El objetivo de esta revisión es estudiar el potencial de la encapsulación de células para tratar las enfermedades del SNC. Las enfermedades que afectan al SNC pueden ser muy diversas y variables, llegando a existir grandes diferencias entre ellas. Sin embargo, la versatilidad de la tecnología de células encapsuladas ha posibilitado su estudio en distintos tipos de enfermedades del SNC (Tabla). A continuación se describen las principales enfermedades que se han intentado afrontar con esta tecnología.

### Enfermedad de Parkinson

Una de las enfermedades neurodegenerativas en las que se ha ensayado la utilización de la tecnología de encapsulación de células es la enfermedad de Parkinson (EP). Se caracteriza por la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra y de sus proyecciones al cuerpo estriado. El factor

neurotrófico derivado de las células gliales (GDNF) es uno de los factores que más está siendo investigado para el tratamiento de esta patología. Sin embargo, en los ensayos clínicos realizados hasta el momento no se han obtenido evidencias clínicas sólidas sobre su eficacia [22,41,42]. Sajadi et al [40] implantaron las cápsulas una semana después de la lesión y aunque en el test de comportamiento se consiguieron mejores resultados en comparación con el control, no se observó un incremento significativo en el número de neuronas tiroxina hidroxilasa positivas ( $TH^+$ ), por lo que puede decirse que en este caso el GDNF no ejerció un efecto neuroprotector. Sin embargo, en otro estudio [43], habiéndose implantado las cápsulas dos semanas después de la lesión, sí se pudo observar un mayor número de neuronas  $TH^+$  conjuntamente con una disminución en el número de rotaciones. Nuestro grupo de investigación realizó un estudio en el que se implantaron las cápsulas cuatro semanas después de la lesión y aunque se observó un descenso en el número de rotaciones, no se detectaron diferencias significativas en el número de neuronas  $TH^+$  [44]. En otros dos estudios [45,46] se determinó el efecto del tiempo en el cual se administró el GDNF, ya que en unos grupos experimentales las cápsulas se implantaron antes de provocar la lesión, y en otros, una vez provocada. Los resultados de ambos grupos de investigación coincidieron en que se conseguían mejores resultados si el GDNF se administraba de forma previa a la realización de la lesión, ya que la supervivencia de las neuronas  $TH^+$  y el descenso en el número de rotaciones fueron mayores en este caso. En estos estudios también se realizó una comparación entre los grupos a los que se les habían implantado las cápsulas a distintos tiempos una vez provocada la lesión. En ambos se comprobó

## 80 Introducción

que el número de rotaciones disminuía de manera más significativa cuando las cápsulas se implantaban dos semanas después de la lesión que cuando se implantaban a las cuatro semanas. Con estos datos, los autores concluyeron que la administración del producto terapéutico debe realizarse lo antes posible para que sea más eficaz.

Por último, cabe destacar un estudio realizado en monos parkinsonizados mediante la administración de una inyección semanal, durante 60 semanas, de MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridina), una toxina específica que afecta a las neuronas dopaminérgicas y que se usa para obtener el modelo de la EP en primates. A éstos se les implantaron las cápsulas en el ventrículo y se fueron reemplazando en las semanas 8, 25 y 47 del estudio. El GDNF mejoró en cierta medida algunas propiedades motoras de los primates, pero no llegó a incrementar el número de neuronas TH [31]. Este estudio demuestra que

con esta tecnología es posible reemplazar las cápsulas varias veces mediante cirugía, ya que los monos no sufrieron ningún efecto adverso destacable durante las numerosas intervenciones a las que se los sometió. Pero uno de los principales inconvenientes que destacaron los autores fue que varias de las cápsulas implantadas habían dejado de producir la sustancia terapéutica antes de sustituirse.

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) también se ha propuesto para hacer frente a esta enfermedad. En dos trabajos [47,48] se ha estudiado la capacidad neuroprotectora del VEGF. Las cápsulas se implantaron en el estriado una semana antes de provocar la lesión y se observó que, mientras en el grupo control el número de rotaciones se incrementaba con el paso del tiempo, en el grupo tratado se mantenía estable [48].

**Tabla.** Enfermedades del sistema nervioso central tratadas con la tecnología de encapsulación de células.

	Tipo de célula	Principio activo	Tipo de cápsula	Lugar de implante	Ref.
Parkinson	PC12	Dopamina, levodopa	Fibras huecas	Caudado	[28]
Parkinson	BHK	VEGF	Fibras huecas	Estriado derecho	[47-49]
Parkinson	MDX12	GDNF	Fibras huecas	Estriado	[40]
Parkinson	BHK	GDNF	Fibras huecas	Estriado	[43,45,46]
Parkinson	Fischer 3T3	GDNF	Microcápsulas de alginato	Estriado derecho	[44]
Parkinson	C2C12	GDNF	Fibras huecas	Ventrículo lateral	[31]
Parkinson	PC12	Dopamina	Fibras huecas	Estriado izquierdo	[50]
Parkinson	Células endoteliales de retina porcina	BDNF, GDNF, dopamina, ácido homovalínico	Microcápsulas de alginato	Estriado derecho	[51]
Parkinson	Epitelio pigmentado de retina humana	Levodopa, dopamina	Microtransportadores de gelatina	Putamen	[52]
Huntington	BHK			Caudado, putamen y ventrículo lateral derecho	[38,65,66]
Huntington	Plexos coroideos		Microcápsulas de alginato	Estriado, caudado y putamen	[67-69]
Esclerosis lateral amiotrófica	BHK	CNTF	Fibras huecas	Intratecal	[34,39]
Parálisis medular	Fibroblastos de rata	BDNF	Microcápsulas de alginato	Cavidad de la lesión (entre vértebras C3 y C4)	[71,72]
Isquemia	BHK	VEGF	Fibras huecas	Estriado	[74]
Isquemia	Plexos		Microcápsulas de alginato	Duramadre	[75,76]
Isquemia	BHK	GDNF	Fibras huecas	Hemisferio cerebral izquierdo	[77,78]



Además, cuando se estudió el efecto de las distintas dosis de VEGF pudo concluirse que con la dosis más baja de VEGF se conseguía un efecto neuroprotector mayor [47]. Otro dato importante es que con la dosis más alta no sólo se conseguía un menor grado de neuroprotección, sino que también aumentaba el riesgo de edema [47]. Por otra parte, cuando las cápsulas se implantaron una o dos semanas después de provocar la lesión, aunque en ambos períodos se consiguieron mejores resultados respecto al control, se demostró que el VEGF es menos eficaz cuanto más tarde se implantan las cápsulas [49]. Por tanto, puede concluirse que, al igual que sucede con el GDNF, el VEGF también debe administrarse lo antes posible y su dosis tiene que estar muy bien ajustada debido al alto riesgo de aparición de edemas.

A partir de los resultados antes mencionados se puede concluir que el VEGF ejerce una función más neuroprotectora que neurorescatadora, es decir, es más eficaz cuando se administra antes de producirse la lesión que cuando se administra una vez que ésta se ha producido.

Para tratar la EP también se ha investigado el potencial de otro tipo de células, como las PC12 o las células epiteliales procedentes de retina. Así, Date et al [50] implantaron cápsulas que contenían células PC12 secretoras de dopamina en ratas parkinsonizadas. En este caso, el estudio duró 12 meses y las cápsulas se implantaron tres meses después de producirse la lesión. Los autores destacaron que se habían logrado ciertas mejoras motoras, a la vez que no se había observado respuesta inmunológica alguna contra las cápsulas. Zhang et al [51] encapsularon células epiteliales procedentes

de retina porcina con capacidad de secretar varias sustancias como dopamina, ácido homovalínico, GDNF y factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), entre otros. En este trabajo sólo se vieron diferencias significativas en el descenso del número de rotaciones respecto al grupo control en tres de las seis ratas tratadas.

Uno de los estudios más importantes es el ensayo clínico realizado con células del epitelio pigmentado de retina humana productoras de levodopa y dopamina [52]. En dicho ensayo clínico, las células se cultivaron y encapsularon en microtransportadores de gelatina que luego se implantaban en la parte posterior del putamen del paciente; de este modo, las células microencapsuladas podían funcionar como 'bombas' de dopamina durante un tiempo. Desafortunadamente, dicho ensayo clínico en fase II ha tenido que suspenderse debido al alto índice de efectos adversos producidos [53].

Aunque los resultados obtenidos preclínicamente son prometedores, todavía quedan varios obstáculos por superar. Uno de los más importantes es que la mayoría de los estudios se han realizado en ratas y, por tanto, los resultados obtenidos son difíciles de extrapolar al ser humano, ya que entre la EP humana y el modelo animal (rata y mono) existen diferencias importantes que deben tenerse en cuenta [54]: así, en el modelo animal, la lesión es un proceso agudo, mientras que en el ser humano es un proceso más largo y progresivo; por otra parte, en el modelo animal sólo están afectadas las neuronas dopaminérgicas, mientras que en el ser humano también están afectadas otras poblaciones neuronales y sistemas neuroquímicos. Otra cuestión es que la duración de los estudios no supera en ninguna investigación los 12

meses y la EP es una enfermedad que puede durar años. Además, es necesario realizar estudios adicionales para determinar el lugar más adecuado donde efectuar el implante, evaluando tanto la funcionalidad como la seguridad, porque aunque la mayoría de los estudios se han realizado implantando en el estriado, no se han hecho estudios comparativos.

Uno de los posibles ensayos que podría proponerse en un futuro no muy lejano es la administración de distintos factores neurotróficos de forma simultánea implantando cápsulas que contengan células de distinta naturaleza con capacidad de secretar varios factores neurotróficos.

Aunque las enfermedades neurodegenerativas tienen diferentes rasgos e inicios, todas comparten la pérdida progresiva por apoptosis de neuronas de diferentes áreas [55]. Por ello, en algunas ocasiones, para tratar la EP se han implantado células con el objetivo de regenerar o restaurar la zona afectada por la enfermedad, siendo numerosas las líneas celulares utilizadas con este fin [11]. Aunque podría ser una buena alternativa, uno de los principales problemas es la baja supervivencia que presentan las células implantadas: se considera que ésta sólo llega al 5% [54]. Parte de las células mueren durante la preparación del tejido para el implante [56], pero en la mayoría de los casos esto ocurre durante la primera semana después del implante [57]. Esto se debe a que las células entran en un proceso de apoptosis [57] y uno de los posibles motivos puede ser la falta de factores neurotróficos [58]. De hecho, en un estudio realizado por Zawada et al [59] se demuestra que la adición de factores neurotróficos provoca una disminución de la apoptosis en las células embrionarias

implantadas. Una posible alternativa podría ser implantar dichas células junto a células encapsuladas que tengan la capacidad de secretar algún factor neurotrófico.

Las células encapsuladas productoras del factor de crecimiento nervioso (NGF) han conseguido aumentar la supervivencia de las células cromafines que se habían implantado en el estriado de ratas parkinsonizadas [60]. De hecho, el número de rotaciones sólo disminuyó cuando se implantaron las células cromafines junto a células secretoras de NGF inmovilizadas, no así cuando se implantaron las células cromafines solas. En otro estudio, el GDNF secretado por las células encapsuladas aumentó tanto la supervivencia como el número de axones de las células fetales del mesencéfalo ventral que se habían implantado en ratas parkinsonizadas [61]. Ahn et al implantaron células embrionarias del mesencéfalo ventral junto a cápsulas que contenían células productoras de GDNF en ratas parkinsonizadas [62]. No observaron diferencias significativas en el número de rotaciones, pero las ratas que recibieron el doble implante se recuperaron antes.

Uno de los aspectos a tener en cuenta para que el coimplante sea efectivo es la correcta elección del lugar en el que se debe realizar el implante. En un estudio llevado a cabo con ratas parkinsonizadas a las que se les implantaron células adrenales y cápsulas con células productoras de NGF, las diferencias no fueron significativas con respecto al control cuando las cápsulas se implantaron en el ventrículo. Sin embargo, cuando las cápsulas se implantaron en el estriado sí se consiguieron diferencias significativas tanto en el número de rotaciones como en el número de células no encapsuladas viables [63].

A pesar de que la supervivencia de las células implantadas para regenerar la zona dañada ha mejorado, sigue siendo muy escasa, por lo que podría proponerse el uso de distintos mecanismos que permitan incrementar la supervivencia de aquéllas de manera simultánea. Una de las posibles combinaciones podría ser el uso de sustancias antiapoptóticas y de factores neurotróficos, ya que ambos, por separado, han demostrado su capacidad de aumentar la supervivencia de las células implantadas [60-64].

### Enfermedad de Huntington

Esta patología se caracteriza por la muerte de las neuronas gabaérgicas del estriado. La mayoría de los trabajos han valorado el poder neuroprotector de la terapia, por lo que debería aplicarse de forma previa a que la enfermedad se hubiese desarrollado. La ventaja es que al tratarse de una enfermedad con herencia autosómica dominante puede realizarse un diagnóstico precoz de ella, haciendo posible la aplicación de un tratamiento neuroprotector que frene su avance. En un trabajo realizado en monos, se implantaron cápsulas con células modificadas genéticamente que secretaban el CNTF [65,66]. Las cápsulas se implantaron en dos modelos distintos; en el primero de ellos la toxina se administró una sola vez, una semana después de la implantación de las cápsulas [65]. En este trabajo se demostró el efecto neuroprotector del CNTF sobre diversas poblaciones estriadas como las neuronas colinérgicas y las gabaérgicas, lo que respalda la idea de que este factor pueda ayudar a prevenir la degeneración de las poblaciones neuronales dañadas en esta patología. En el

segundo modelo, la toxina se administró semanalmente durante los cinco meses que duró el estudio y la implantación de las cápsulas se realizó dos meses después de haber iniciado la administración de la toxina [66]. En el grupo tratado, el volumen de la lesión disminuyó a la vez que mejoraban las funciones cognitivas y motoras, poniéndose de manifiesto la capacidad del CNTF de ralentizar el avance de la enfermedad.

También se ha estudiado el efecto neuroprotector que pueden ejercer los plexos coroideos tanto en ratas [67] como en monos [68]. En el caso de las ratas, el tamaño de la lesión, producida por la toxina en el estriado, disminuyó en un 86%, pero en el test de comportamiento no se observaron diferencias significativas respecto a los controles. En el caso de los monos, la supervivencia de las neuronas gabaérgicas aumentó hasta el punto de no observarse diferencias significativas con la parte del estriado sano. Una característica que presentan los plexos coroideos es que el tiempo que permanezcan en cultivo no condiciona su capacidad neuroprotectora [69]. Este hecho es importante porque, al ser células primarias, antes de implantarlas hay que efectuar un estudio para demostrar la ausencia de virus y bacterias que puedan infectar al huésped, y durante la realización de dichos estudios las células deben permanecer en cultivo.

Cabe destacar el ensayo clínico realizado con fibras huecas en seis pacientes a los que se les implantaron células encapsuladas productoras de CNTF [38]. La fibra hueca se implantó en el ventrículo y cada seis meses se sustituía por otra hasta completar una duración de dos años. Aunque no se vieron beneficios clínicos en ninguno de los pacientes, se detectaron cambios electrofisiológicos en tres de los seis pacientes

estudiados, lo que demuestra una mejora en los circuitos neuronales. Otro dato importante es que no se produjeron los efectos secundarios observados tras la administración sistémica del factor [20,21], demostrando la seguridad de esta vía de administración a largo plazo. Uno de los posibles motivos del fracaso de este estudio pudo ser la gran variabilidad en los niveles de producción entre una cápsula y otra observados antes de realizar el implante, ya que oscilaban entre 47 y 617 ng/mL/24 h. Además, la mitad de las células implantadas, transcurridos seis meses desde la administración, no producían una cantidad detectable de CNTF, aunque se descarta que la falta de producción se deba a una respuesta inmunológica aguda. Estos datos demuestran la importancia de conseguir una línea celular con capacidad de secretar el principio terapéutico durante más tiempo y de una manera más estable. También debería tenerse en cuenta el lugar donde se realiza su implantación porque el CNTF ha demostrado mayor eficacia cuando se administra en el parénquima [70]. Sin embargo, en este estudio, las cápsulas se implantaron en el ventrículo. Por último, la dosis administrada podría no ser la más idónea porque en este estudio sólo se ha implantado una macrocápsula, mientras que en monos fue necesario administrar cuatro para conseguir un resultado satisfactorio [66].

### Esclerosis lateral amiotrófica

La ELA se caracteriza por la pérdida progresiva de las neuronas motoras del SNC. Cabe destacar que se ha realizado un ensayo clínico en el que participaron seis pacientes con una duración de 17 meses [39]. En este ensayo, las macrocápsulas

contenían células productoras de CNTF y se implantaron intratecalmente. Aunque el avance de la enfermedad no se detuvo, se obtuvieron dos datos muy relevantes: el primero es que no se detectó respuesta inmunológica alguna frente a las cápsulas, a pesar de que a los pacientes no se les había administrado tratamiento inmunosupresor; y el segundo, que no se observaron los efectos secundarios que se vieron cuando el mismo factor neurotrófico se administró por vía sistémica [20,21]. La ausencia de efectos secundarios puede deberse a que la liberación del producto se efectuó directamente en el SNC, impidiendo su salida al torrente sanguíneo y, por tanto, haciendo que su difusión fuera mucho más limitada que cuando se administra por vía sistémica. Uno de los motivos de que no se consiguieran mejores resultados podría ser la variabilidad en los niveles de CNTF en el SNC detectados entre un paciente y otro. Además, el número de pacientes que participaron en el ensayo fue reducido y la duración, bastante corta. Este estudio demuestra que con esta tecnología se puede conseguir una liberación continua del principio activo durante largos períodos mediante una única administración, un dato a tener en cuenta debido a la baja estabilidad que presentan las proteínas administradas en el SNC.

### Lesión traumática medular

En un modelo de rata con lesión traumática medular se implantaron cápsulas con células productoras del BDNF [71,72] y se apreció una regeneración mayor en las ratas tratadas en comparación con las no tratadas. Además, en estos trabajos también se implantaron células encapsuladas y sin encapsular en ratas inmunosuprimidas e

inmunocompetentes. Las células sin encapsular sólo fueron efectivas cuando las ratas estaban inmunosuprimidas, ya que en el caso contrario el sistema inmunológico las eliminaba, mientras que las células que estaban encapsuladas sobrevivieron durante los dos meses que duró el ensayo. Por tanto, podría decirse que la tecnología de encapsulación de células puede sustituir, al menos en parte, al tratamiento inmunosupresor.

### Isquemia cerebral

La enfermedad vascular cerebral provoca más muertes que las enfermedades de origen vascular de cualquier otro órgano, con la excepción del corazón en el hombre, aunque no en la mujer. Además, es la primera causa de incapacidad en los adultos. Por ello, en los últimos años se han centrado muchos recursos en la búsqueda de un tratamiento eficaz [73].

En un modelo de rata con isquemia cerebral se implantaron en el estriado, durante 14 días, cápsulas con células secretoras de VEGF [74]. La implantación de las cápsulas redujo el volumen de la zona cerebral afectada por la isquemia de manera significativa y en el test de comportamiento las ratas tratadas obtuvieron mejores resultados que el grupo control. Cabe destacar que el VEGF no sólo retrasó la muerte de las neuronas, sino que aumentó la supervivencia de éstas, demostrando su capacidad neuroprotectora. Los plexos coroideos también se han utilizado en modelos de isquemia. En un trabajo realizado por Borlongan et al [75], los plexos coroideos disminuyeron el tamaño de la lesión un 25%, mientras que el déficit neurológico y motor mejoró en un 40%. En

otro estudio se implantaron plexos encapsulados y sin encapsular [76]. La respuesta inmunológica contra los plexos sin encapsular fue mucho mayor que contra los plexos encapsulados, afectando de manera muy significativa a su viabilidad. Además, la afectación motora y el déficit neurológico sufrieron una mejora significativa cuando los plexos se implantaron encapsulados en comparación con los plexos sin encapsular.

Con esta tecnología también se ha intentado abordar la isquemia producida en ratas recién nacidas mediante dos estudios con cápsulas que contenían células productoras de GDNF [77,78]. El GDNF resultó ser neuroprotector, aumentando la supervivencia de las neuronas a la vez que mejoraba los resultados de las ratas implantadas en los distintos test de memoria y aprendizaje realizados [77]. Además, no se detectó respuesta inmunológica alguna alrededor de las cápsulas y las células seguían viables cuando se extrajeron [78].

Un desarrollo reciente que está siendo evaluado en ensayos clínicos es el sistema *EC biodelivery*, desarrollado por la empresa NsGene, para la implantación de células encapsuladas en el SNC [79,80]. Este sistema puede retirarse sin grandes dificultades y sin peligro para el paciente, haciendo más segura la aplicación de esta tecnología. Este dispositivo tiene una forma parecida a la de una fibra hueca y se encuentra dividido en dos partes: la parte inferior contiene las células rodeadas por la membrana semipermeable y mide aproximadamente 1,5 cm de longitud, mientras que la parte superior se compone de un catéter que permite retirar todo el dispositivo del cerebro del paciente en caso de que resulte necesario.

NsGene ha comenzado dos ensayos clínicos junto a instituciones de prestigio,

como el Instituto Karolinska de Suecia y el Queens Square y el Imperial Collage del Reino Unido, entre otros. Uno de ellos se relaciona con la enfermedad de Alzheimer, y el otro, con la EP. Además de estos dos ensayos clínicos, este dispositivo se está ensayando preclínicamente en otras patologías, entre las que se encuentran la enfermedad de Huntington, la epilepsia, la ELA, la esclerosis múltiple y el infarto cerebral.

### Conclusiones

En vista de los pobres resultados obtenidos en los ensayos clínicos realizados en humanos puede decirse que la tecnología de encapsulación de células se encuentra, a día de hoy, lejos de poder aplicarse como tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas.

Deben efectuarse más estudios en modelos animales porque exceptuando la EP, en el resto de enfermedades no han sido muy numerosos los realizados. Además, los modelos animales deben mejorarse porque se encuentran, en estos momentos, demasiado lejos de reproducir lo que ocurre en la enfermedad humana. Estos estudios podrían resultar útiles para optimizar tanto la dosis como el lugar de implante, dos de los puntos que todavía no se han aclarado convenientemente.

Respecto a los ensayos clínicos realizados en humanos, deben tener una mayor duración y un número más elevado de pacientes para que así los resultados obtenidos sean más significativos. En estos estudios también se ha demostrado la importancia de disponer de líneas celulares con producciones constantes y duraderas.

Los autores confían en que la importancia de esta tecnología se vaya incrementando en los próximos años debido al potencial que presenta, pero se precisaría la realización de un mayor número de estudios, junto con la mejora en distintos campos como la genética o la ingeniería química, así como un mejor entendimiento de las enfermedades del SNC.

Tampoco sería descartable que esta tecnología pudiera utilizarse junto a otro tipo de tratamientos que puedan desarrollarse para hacer frente a la enfermedad mediante distintos mecanismos.

### Bibliografía

1. Pardridge WM. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx* 2005; 2: 3-14.
2. Pardridge WM. Brain drug targeting: the future of brain drug development. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2001.
3. Singh N, Pillay V, Choonara YE. Advances in the treatment of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2007; 81: 29-44.
4. Shah RS, Lee HG, Xiongwei Z, Perry G, Smith MA, Castellani RJ. Current approaches in the treatment of Alzheimer's disease. *Biomed Pharmacother* 2008; 62: 199-207.
5. Moris G, Vega JA. Factores neurotróficos: fundamentos para su aplicación clínica. *Neurología* 2003; 18: 18-28.
6. Fumagalli F, Molteni R, Calabrese F, Maj PF, Racagni G, Riva MA. Neurotrophic factors in neurodegenerative disorders: potential for therapy. *CNS Drugs* 2008; 22: 1005-19.
7. Chiocco MJ, Harvey BK, Wang HY, Hoffer BJ. Neurotrophic factors for the treatment of Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2007; 13: S321-8.
8. Cattaneo A, Capsoni S, Paoletti F. Towards non invasive nerve growth factor therapies for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2008; 15: 255-83.
9. Zuccato C, Cattaneo E. Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol* 2009; 5: 311-22.
10. Mejía-Toiber J, Castillo CG, Giordano M. Terapia celular y terapia génica *ex vivo*: avances

- en el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central. *Rev Neurol* 2009; 49: 483-9.
11. Mínguez-Castellanos A, Escamilla-Sevilla F. Terapia celular y otras estrategias neuroregenerativas en la enfermedad de Parkinson (II). *Rev Neurol* 2005; 41: 684-93.
  12. Zhou JP, Feng ZG, Yuan BL, Yu SZ, Li Q, Qu HY, et al. Transduced PTD-BDNF fusion protein protects against beta amyloid peptide-induced learning and memory deficits in mice. *Brain Res* 2008; 1191: 12-9.
  13. Sendtner M, Carrol P, Holtman B, Hughes RA, Thoenen H. Ciliary neurotrophic factor. *J Neurobiol* 1994; 25: 1436-53.
  14. Sendtner M, Dittrich F, Hughes RA, Thoenen H. Actions of CNTF and neurotrophins on degenerating motoneurons: preclinical studies and clinical implications. *J Neurol Sci* 1994; 124 (Suppl): 77-83.
  15. Wang YQ, Guo X, Qiu MH, Feng XY, Sun FY. VEGF overexpression enhances striatal neurogenesis in brain of adult rat after a transient middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Res* 2007; 85: 73-82.
  16. Schnyder A, Huwyler J. Drug transport to brain with targeted liposomes. *NeuroRX* 2005; 2: 99-107.
  17. Dittrich F, Theonen H, Sendtner M. Ciliary neurotrophic factor: pharmacokinetics and acute-phase response in rat. *Ann Neurol* 1994; 35: 151-63.
  18. Kordower JH, Palfi S, Chen EY, Ma SY, Sendera T, Cochran EJ, et al. Clinico-pathological findings following intraventricular glial-derived neurotrophic factor treatment in a patient with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1999; 46: 419-24.
  19. Miller RG, Bryan WW, Dietz MA, Munsat TL, Petajan JH, Smith SA, et al. Toxicity and tolerability of recombinant human ciliary neurotrophic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 1996; 47: 1329-31.
  20. The pharmacokinetics of subcutaneously administered recombinant human ciliary neurotrophic factor (rhCNTF) in patients with amyotrophic lateral sclerosis: relation to parameters of the acute-phase response: the ALS CNTF treatment study (ACTS) phase I-II study group. *Clin Neuropharmacol* 1995; 18: 500-14.
  21. Miller RG, Petajan JH, Bryan WW, Armon C, Barohn RJ, Goodpasture JC, et al. A placebo-controlled trial of recombinant human ciliary neurotrophic (rhCNTF) factor in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1996; 39: 256-60.
  22. Nutt JG, Burchiel KJ, Comella CL, Jankovic J, Lang AE, Laws ER, et al. Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. *Neurology* 2003; 60: 69-73.
  23. Hovland DN, Boyd RB, Butt MT, Engelhardt JA, Moxness MS, Ma MH, et al. Six-month continuous intraputamenal infusion toxicity study of recombinant methionyl human glial cell line-derived neurotrophic factor (r-metHuGDNF in rhesus monkeys). *Toxic Pathol* 2007; 35: 1013-29.
  24. Murúa A, Portero A, Orive G, Hernández RM, De Castro M, Pedraz JL. Cell microencapsulation technology: towards clinical application. *J Control Release* 2008; 132: 76-83.
  25. Orive G, Hernández RM, Gascón AR, Pedraz JL. Challenges in cell encapsulation. In Viktor N, Ronnie W, ed. *Applications of cell immobilization technology*. Amsterdam: Springer; 2005. p. 185-96.
  26. Ballios BG, Cooke MJ, Van der Kooy D, Shoichet MS. A hydrogel-based stem cell delivery system to treat retinal degenerative diseases. *Biomaterials* 2010; 31: 2555-64.
  27. Sieving PA, Caruso RC, Tao W, Coleman HR, Thompson DJS, Fullmer KR, et al. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 3896-901.
  28. Yoshida H, Date I, Shingo T, Fujiwara K, Kobayashi K, Miyoshi Y, et al. Stereotactic transplantation of a dopamine-producing capsule into the striatum for treatment of Parkinson disease: a preclinical primate study. *J Neurosurg* 2003; 98: 874-81.
  29. Orive G, Tam SK, Pedraz JL, Hallé JP. Biocompatibility of alginate-poly-L-lysine microcapsules for cell therapy. *Biomaterials* 2006; 27: 3691-700.
  30. Nakama H, Ohsugi K, Otsuki T, Date I, Kosuga M, Okuyama T, et al. Encapsulation cell therapy for mucopolysaccharidosis type VII using genetically engineered immortalized human amniotic epithelial cells. *Tohoku J Exp Med* 2006; 209: 23-32.
  31. Kishima H, Poyot T, Bloch J, Dauguet J, Condé F, Dollé F, et al. Encapsulated GDNF-producing C2C12 cells for Parkinson's disease: a pre-clinical study in chronic MPTP-treated baboons. *Neurobiol Dis* 2004; 16: 428-39.
  32. Consiglio A, Martino S, Dolcetta D, Cusella G, Conese M, Marchesini S, et al. Metabolic correction in oligodendrocytes derived from metachromatic leukodystrophy mouse model by using encapsulated recombinant myoblasts. *J Neurol Sci* 2007; 255: 7-16.
  33. Orive G, Gascón AR, Hernández RM, Igartua M, Pedraz JL. Cell microencapsulation technology

- for biomedical purposes: novel insights and challenges. *Trends Pharmacol Sci* 2003; 24: 207-10.
34. Zurn AD, Henry H, Schlupe M, Aubert V, Winkel L, Eilers B, et al. Evaluation of an intrathecal immune response in amyotrophic lateral sclerosis patients implanted with encapsulated genetically engineered xenogeneic cells. *Cell Transplant* 2000; 9: 471-84.
35. Orive G, Hernández RM, Gascón AR, Calafiore R, Chang TMS, De Vos P, et al. History, challenges and perspectives of cell micro-encapsulation. *Trends Biotechnol* 2004; 22: 87-92.
36. Orive G, De Castro M, Kong HJ, Hernández RM, Ponce S, Mooney DJ, et al. Bioactive cell-hydrogel microcapsules for cell-based drug delivery. *J Control Release* 2009; 135: 203-10.
37. Orive G, Hernández RM, Gascón AR, Calafiore R, Chang TMS, De Vos P, et al. Cell encapsulation: promise and progress. *Nat Med* 2003; 9: 104-7.
38. Bloch J, Bachoud-Lévi AC, Déglon N, Lefaucheur JP, Winkel L, Palfi S, et al. Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study. *Hum Gen Ther* 2004; 15: 968-75.
39. Aebischer P, Schlupe M, Déglon N, Joseph JM, Hirt L, Heyd B, et al. Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nat Med* 1996; 2: 696-9.
40. Sajadi A, Bensadoun JC., Schneider BL, Lo Bianco C, Aebischer P. Transient striatal delivery of GDNF via encapsulated cells leads to sustained behavioural improvement in a bilateral model of Parkinson disease. *Neurobiol Dis* 2006; 22: 119-29.
41. Lang AE, Gill S, Patel NK, Lozano A, Nutt JG, Penn R, et al. Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Ann Neurol* 2006; 59: 459-66.
42. Mínguez-Castellanos A, Escamilla-Sevilla F, Hotton GR, Toledo-Aral JJ, Ortega-Moreno A, Méndez-Ferrer S, et al. Carotid body auto-transplantation in Parkinson disease: a clinical and positron emission tomography study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007; 78: 825-31.
43. Date I, Shingo T, Yoshida H, Fujiwara K, Kobayashi K, Takeuchi A, et al. Grafting of encapsulated genetically modified cells secreting GDNF into the striatum of parkinsonian model rats. *Cell Transplant* 2001; 10: 397-401.
44. Grandoso L, Ponce S, Manuel I, Arrúe A, Ruiz-Ortega JA, Ulibarri I, et al. Long-term survival of encapsulated GDNF secreting cells implanted within the striatum of parkinsonized rats. *Int J Pharm* 2007; 343: 69-78.
45. Shingo T, Date I, Yoshida H, Ohmoto T. Neuroprotective and restorative effects of intrastriatal grafting of encapsulated GDNF-producing cells in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci Res* 2002; 69: 946-54.
46. Yasuhara T, Shingo T, Muraoka K, Kobayashi K, Takeuchi A, Yano A, et al. Early transplantation of an encapsulated glial cell line-derived neurotrophic factor-producing cell demonstrating strong neuro-protective effects in a rat model of Parkinson disease. *J Neurosurg* 2005; 102: 80-9.
47. Yasuhara T, Shingo T, Muraoka K, Wen Ji Y, Kameda M, Takeuchi A, et al. The differences between high and low-dose administration of VEGF to dopaminergic neurons of in vitro and in vivo Parkinson's disease. *Brain Res* 2005; 1038: 1-10.
48. Yasuhara T, Shingo T, Kobayashi K, Takeuchi A, Yano A, Muraoka K, et al. Neuroprotective effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) upon dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 2004; 19: 1494-504.
49. Yasuhara T, Shingo T, Muraoka K, Kameda M, Agari T, Ji YW, et al. Neurorescue effects of VEGF on a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* 2005; 1053: 10-8.
50. Date I, Shingo T, Yoshida H, Fujiwara K, Kobayashi K, Ohmoto T. Grafting of encapsulated dopamine-secreting cells in Parkinson's disease: long-term primate study. *Cell Transplant* 2000; 9: 705-9.
51. Zhang HL, Wu JJ, Ren HM, Wang J, Su YR, Jiang YP. Therapeutic effect of micro-encapsulated porcine retinal pigmented epithelial cells transplantation on rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Bull* 2007; 23: 137-44.
52. Stover NP, Watts RL. Spheramine for treatment of Parkinson's disease. *Neurotherapeutics* 2008; 5: 252-9.
53. Falk T, Zhang S, Sherman SJ. Pigment epithelium derived factor (PEDF) is neuro-protective in two in vitro models of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2009; 458: 49-52.
54. Mínguez-Castellanos A, Escamilla-Sevilla F. Terapia celular y otras estrategias neuroregenerativas en la enfermedad de Parkinson (I). *Rev Neurol* 2005; 41: 604-14.
55. Fernández-Verdecia CI, Díaz del Guante MA, Castillo-Díaz L, Álvarez-Blanco J. Neurogénesis como diana terapéutica para la enfermedad de



- Alzheimer. *Rev Neurol* 2009; 49: 193-201.
56. Brundin P, Karlsson J, Emgard M, Schierle GS, Hansson O, Petersen A, et al. Improving the survival of grafted dopaminergic neurons: a review over current approaches. *Cell Transplant* 2000; 9: 179-95.
57. Emgard M, Karlsson J, Hansson O, Brundin P. Patterns of cell death and dopaminergic neuron survival in intrastriatal nigral grafts. *Exp Neurol* 1999; 160: 279-88.
58. Sortwell CE, Pitzer MR, Collier TJ. Time course of apoptotic cell death within mesencephalic cell suspension grafts: implications for improving grafted dopamine neuron survival. *Exp Neurol* 2000; 165: 268-77.
59. Zawada WM, Zastrow DJ, Clarkson ED, Adams FS, Bell KP, Freed DCR. Growth factors improve immediate survival of embryonic dopamine neurons after transplantation into rats. *Brain Res* 1998; 786: 96-103.
60. Date I, Shingo T, Ohmoto T, Emerich DF. Long-term enhanced chromaffin cell survival and behavioural recovery in hemiparkinsonian rats with co-grafted polymer-encapsulated human NGF-secreting cells. *Exp Neurol* 1997; 147: 10-7.
61. Sautter J, Tseng JL, Braguglia D, Aebischer P, Spenger C, Seiler RW, et al. Implants of polymer-encapsulated genetically modified cells releasing glial cell line-derived neurotrophic factor improve survival, growth, and function of fetal dopaminergic grafts. *Exp Neurol* 1998; 149: 230-6.
62. Ahn YH, Bensadoun JC, Aebischer P, Zurn AD, Seiger A, Björklund A, et al. Increased fiber outgrowth from xenotransplanted human embryonic dopaminergic neurons with co-implants of polymer-encapsulated genetically modified cells releasing glial cell line-derived neurotrophic factor. *Brain Res Bull* 2005; 66: 135-42.
63. Date I, Ohmoto T, Imaoka T, Ono T, Hammang JP, Francis J, et al. Cograftering with polymer-encapsulated human nerve growth factor-secreting cells and chromaffin cell survival and behavioural recovery in hemiparkinsonian rats. *J Neurosurg* 1996; 84: 1006-12.
64. Schierle GS, Hansson O, Leist M, Nicotera P, Widner H, Brundin P. Caspase inhibition reduces apoptosis and increases survival of nigral transplants. *Nat Med* 1999; 5: 97-100.
65. Emerich DF, Winn SR, Hantraye PM, Peschanski M, Chen ER, Chu Y, et al. Protective effect of encapsulated cells producing neurotrophic factor CNTF in a monkey model of Huntington's disease. *Nature* 1997; 386: 395-9.
66. Mittoux V, Joseph JM, Conde F, Palfi S, Dautry C, Poyot T, et al. Restoration of cognitive and motor functions by ciliary neurotrophic factor in a primate model of Huntington's disease. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 1177-87.
67. Borlongan CV, Skinner SJM, Geaney M, Vasconcellos AV, Elliot RB, Emerich DF. Neuroprotection by encapsulated choroid plexus in a rodent model of Huntington's disease. *Neuroreport* 2004; 15: 2521-5.
68. Emerich DF, Thanos CG, Goddard M, Skinner SJM, Geany MS, Bell WJ, et al. Extensive neuroprotection by choroid plexus transplants in excitotoxin lesioned monkeys. *Neurobiol Dis* 2006; 23: 471-80.
69. Emerich DF, Thanos CG. In vitro culture duration does not impact the ability of encapsulated choroid plexus transplants to prevent neurological deficits in excitotoxin-lesioned rats. *Cell Transplant* 2006; 15: 595-602.
70. Kordower JH, Isacson O, Emerich DF. Cellular delivery of trophic factors for the treatment of Huntington's disease. Is neuroprotection possible? *Exp Neurol* 1999; 159: 4-20.
71. Tobias CA, Dhoot NO, Wheatley MA, Tessler A, Murray M, Fischer I. Grafting of encapsulated BDNF-producing fibroblasts into the injured spinal cord without immune suppression in adult rats. *J Neurotrauma* 2001; 18: 283-300.
72. Tobias CA, Han SSW, Shumsky JS, Kim D, Tumolo M, Dhoot NO, et al. Alginate encapsulated BDNF-producing fibroblast grafts permit recovery of function after spinal cord injury in the absence of immune suppression. *J Neurotrauma* 2005; 22: 138-56.
73. Brea D, Sobrino T, Ramos-Cabrer P, Castiño J. Reorganización de la vascularización cerebral tras la isquemia. *Rev Neurol* 2009; 49: 645-54.
74. Yano A, Shingo T, Takeuchi A, Yasuhara T, Kobayashi K, Takahashi K, et al. Encapsulated vascular endothelial growth factor-secreting cell grafts have neuroprotective and angiogenic effects on focal cerebral ischemia. *J Neurosurg* 2005; 103: 104-14.
75. Borlongan CV, Skinner SJM, Geaney M, Vasconcellos AV, Elliot RB, Emerich DF. CNS grafts of rat choroid plexus protect against cerebral ischemia in adult rats. *Neuroreport* 2004; 15: 1543-7.
76. Borlongan CV, Skinner SJM, Geaney M, Vasconcellos AV, Elliot RB, Emerich DF. Intracerebral transplantation of porcine choroid plexus provides structural and functional neuroprotection in a rodent model of stroke. *Stroke* 2004; 35: 2206-10.
77. Katsuragi S, Ikeda T, Date I, Shingo T, Yasuhara T, Mishima K, et al. Implantation of encapsulated glial cell line-derived neurotrophic factor-secreting cells prevents long-lasting learning

## 90 Introducción

---

impairment following neonatal hypoxic-ischemic brain insult in rats. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 1028-37.

78. Katsuragi S, Ikeda T, Date I, Shingo T, Yasuhara T, Ikenoue T. Grafting of glial cell line-derived neurotrophic factor secreting cells for hypoxic-ischemic encephalopathy in neonatal rats. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 192: 1137-45.

79. NsGene. URL: <http://www.nsgene.dk>. [28.01.2010].

80. Lindvall O, Wahlberg LU. Encapsulated cell delivery of GDNF: a novel clinical strategy for neuroprotection and neurodegeneration in Parkinson's disease? *Exp Neurol* 2008; 209: 82-8.

### Cell encapsulation for the treatment of central nervous system disorders

**Introduction.** One of the main matters of drug administration into the central nervous system (CNS) is to cross the blood brain barrier. For this reason, in some cases the drug does not reach the therapeutic level or is necessary to use some special systems to get a right administration.

**Aim.** To present a technological system which allow continuous and direct administration of the drug into the CNS. It consists of enclosing secreting-cells of the desired product within a semipermeable polymeric matrix. Furthermore, this device could be implanted easily into the CNS which improves the access of the drug to the injured places.

**Development.** During the last years the use of this technology has been researched in the treatment of diverse diseases affecting the CNS. Although it is important to point out that the majority of the studies done have been carried out in experimental animals therefore, it is in experimental state. The aim of this article is to review the current state of the use of cell encapsulation technology as treatment of CNS disorders.

**Conclusion.** Taking into account the results obtained in different research works cell encapsulation technology could be a useful strategy to treat CNS disorders. However, some important matters are still to be solved out, before than technology of cell encapsulation could be a reality at clinical level.

**Key words.** Cell encapsulation. Cell therapy. Neurodegenerative disorders. Neuroprotection. Neuroregeneration. Neurotrophic factors



El incremento de la esperanza de vida que se ha producido en los últimos años en los países desarrollados ha llevado asociado un incremento en la incidencia de enfermedades neurodegenerativas tales como la EA. Hasta el día de hoy no se dispone de un sistema de diagnóstico precoz de la enfermedad ni de un tratamiento eficaz. El abordaje farmacoterapéutico disponible actualmente permite tan solo ralentizar la evolución de la enfermedad y con ello la sintomatología.

A lo largo de los últimos años la tecnología de microencapsulación de células ha evolucionado de manera muy significativa debido a la integración de múltiples conocimientos relacionados con la aparición de nuevos biomateriales, y con los avances realizados en genética, biología y farmacia. Esto ha permitido que en la actualidad se estén llevando a cabo diversos ensayos clínicos con esta tecnología en campos tan diversos como la diabetes, el cáncer y las enfermedades neurodegenerativas entre otros.

Por ello, en la presente memoria experimental pretendemos explorar el potencial de la tecnología de microencapsulación de células modificadas genéticamente en la búsqueda de nuevos tratamientos para la EA empleando como punto de partida la hipótesis vascular de la enfermedad.

Teniendo en consideración estos planteamientos, los objetivos de esta tesis doctoral son los siguientes:

- 1- Desarrollar un sistema basado en células microencapsuladas modificadas genéticamente para producir y liberar VEGF humano.
- 2- Plantear una nueva vía de administración mínimamente invasiva de las células microencapsuladas a nivel intracraneal para favorecer el acceso del factor angiogénico al SNC.
- 3- Evaluar la actividad biológica del VEGF humano liberado a partir de las células microencapsuladas tanto en cultivos celulares como en ratones C57BL/6.

- 4- Evaluar los cambios histológicos y bioquímicos que se producen en ratones transgénicos APP/PS1 tras la administración de las células microencapsuladas secretoras de VEGF por vía intracraneal.
- 5- Poner de manifiesto si los cambios inducidos por el VEGF liberado a partir de las células microencapsuladas incide en el estado cognitivo de los ratones transgénicos APP/PS1.

**ARTÍCULO 3**

**The effect of encapsulated VEGF-secreting cells on  
brain amyloid load and behavioral impairment in a  
mouse model of Alzheimer's disease  
Biomaterials 2010; 31: 5608-5618**

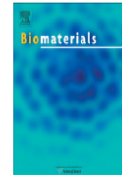






Contents lists available at ScienceDirect

## Biomaterials

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biomaterials](http://www.elsevier.com/locate/biomaterials)

## The effect of encapsulated VEGF-secreting cells on brain amyloid load and behavioral impairment in a mouse model of Alzheimer's disease

Carlos Spuch<sup>a,b</sup>, Desiree Antequera<sup>a,b</sup>, Aitziber Portero<sup>c</sup>, Gorka Orive<sup>c</sup>, Rosa M<sup>a</sup> Hernández<sup>c</sup>, Jose A. Molina<sup>b,d</sup>, Felix Bermejo-Pareja<sup>b,d</sup>, José L. Pedraz<sup>c</sup>, Eva Carro<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>Neuroscience Laboratory, Research Center, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

<sup>b</sup>Neurodegenerative Diseases Biomedical Research Center (CIBERNED), Madrid, Spain

<sup>c</sup>Laboratory of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of the Basque Country, Vitoria -Gasteiz, Spain

<sup>d</sup>Neurology Service, Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

### Article history:

Received  
27 January 2010  
Accepted  
17 March 2010  
Available online  
28 April 2010

### Keywords:

Angiogenesis  
Animal model  
Brain  
Microencapsulation  
Endothelial cells

Cerebrovascular dysfunction contributes to cognitive decline and neurodegeneration in Alzheimer's disease (AD). Vascular endothelial growth factor (VEGF), an angiogenic protein with important neurotrophic and neuroprotective actions, is under investigation as a therapeutic agent for the treatment of neurodegenerative disorders. The aim of this study was to generate encapsulated VEGF-secreting cells and implant them in a transgenic mouse model of AD, the double mutant amyloid precursor protein/presenilin 1 (APP/Ps1) mice, which shows a disturbed vessel homeostasis. We report that, after implantation of VEGF microcapsules, brain A $\beta$  burden, hyperphosphorylated-tau and cognitive impairment attenuated in APP/Ps1 mice. Based on the neurovascular hypothesis, our findings suggest a new potential therapeutic approach that could be developed for AD, to enhance A $\beta$  clearance and neurovascular repair, and to protect the cognitive behavior. Stereologically-implanted encapsulated VEGF-secreting cells could offer an alternative strategy in the treatment of AD.

## 1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder characterized by elevated levels of amyloid beta-peptide (A $\beta$ ) in the brain, associated with neuronal [1,2] and vascular toxicity [3].

Recent investigations emphasize on several aspects of this neurodegenerative disease: co-morbidity of AD and cerebrovascular disease [4]; AD and atherosclerosis [5]; cognitive impairment and amyloid angiopathy [6]; and cerebral microvascular pathology [7] and deficient clearance of A $\beta$  across the blood-brain barrier (BBB) in AD [2,8,9]. These studies indicate that vascular alterations constitute an important feature of chronic neurodegeneration in AD.

In AD, the brain endothelial wall often degenerates as a consequence of A $\beta$  deposits in these cells, which promotes local neuroinflammatory vascular responses [7]. Therefore, vascular clearance can critically influence brain A $\beta$  accumulation, and induce neuronal and vascular associated toxicity. Additionally, insufficient angiogenesis and vascular regression in the AD brain could represent an important pathogenic mechanism involved in the disease progression [10]. In conclusion, a defective clearance of A $\beta$ , due to aberrant angiogenesis [11] or endothelial senescence [12], could increase the concentration of brain A $\beta$ , and lead to the formation of vascular amyloid lesions [9].

As the currently prevailing view states that deficient A $\beta$  clearance is of major importance for late-onset, non-genetic AD [1,2,8,13], therapies based on A $\beta$  clearance may represent an attractive approach in the treatment of AD.

Vascular endothelial growth factor (VEGF), a physiological regulator of brain angiogenesis and of BBB integrity [14], has also been implicated in neuroprotection and cerebrovascular exchange of sub-

strates and nutrients [15,16], and changes in VEGF levels have been demonstrated in AD patients [17,18]. Thus, its use could have important consequences in the treatment of AD.

One critical problem is the way to deliver, in a continuous and localized manner, physiological amounts of VEGF to the brain tissue. One interesting approach is cell encapsulation, in which engineered somatic cells are protected against immune cell-mediated and antibody-mediated rejection through immobilization in a polymer matrix surrounded by a semipermeable membrane. The latter regulates the bidirectional diffusion of nutrients, allowing the controlled and continuous delivery of therapeutic proteins in the absence of immunosuppression [19,20].

In this study, we evaluated the ability of VEGF-secreting microencapsulated fibroblast cells to release VEGF, as a possible therapeutic strategy for AD, using amyloid precursor protein/presenilin 1 (APP/Ps1) mice, a transgenic mouse model of AD with degenerative changes in microvasculature, similar to those reported in aging and AD brains [21]. Our findings offer new insights into the mechanisms underlying VEGF dependent A $\beta$  clearance and cognitive impairment in the pathogenesis of AD.

## 2. Materials and methods

### 2.1. VEGF-secreting cell microcapsules

Baby hamster kidney (BHK) fibroblast cells, transfected to produce human VEGF, were grown in Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2% L-glutamine and 1% antibiotic-antimycotic. Cells were maintained in culture at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere, and passaged every 2-3 days. To produce the capsules, VEGF-secreting cells (5x10<sup>6</sup> cells/

mL) were suspended in a 1.5% (w/v) alginate solution. This suspension was extruded into a 55 mM calcium chloride solution in order to obtain alginate microbeads. The latter were coated with poly-L-lysine 0.05% (w/v) for 5 min and with an additional alginate layer (0.1% v/w) for 5 min. Cell viability from the enclosed cells was measured using the tetrazolium assay, whereas VEGF secretion was quantified using a Vascular Endothelial Growth Factor, Human Biotrak ELISA System (GE Healthcare, Amersham Place, UK). Non-transfected BHK cell microcapsules were implanted in the corresponding control groups.

## 2.2. Animals

In a first study, 10 adult C57BL mice were used. In a second study, a total of 15 six month-old double-transgenic amyloid precursor protein/presenilin-1 (APP/Ps1) mice, a cross of the Tg2576 (overexpressing human APP695) and mutant PS1 (M146L) mice (8 APP/Ps1 mice receiving micro-encapsulated BHK cells non-transfected to release VEGF and 7 APP/Ps1 mice encapsulated VEGF-secreting BHK cells) were used. In this later study, age-matched non-transgenic littermates were used as control group (6 mice). All animals were handled and in accordance with Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986. Animals were perfused transcatheterially either with saline buffer for biochemical analysis, or 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4, for immunohistochemical analysis.

## 2.3. Implantation surgery

A craniotomy was performed in each brain hemisphere [brain coordinates (from bregma): 0.6 mm posterior and 1.1 mm lateral]. In mice receiving microcapsule implants, the dura mater was excised, and 20-

30 microcapsules were placed in the craniotomy, resulting in a bed of alginate microcapsules directly overlying the cerebral cortex. A small piece of surgical cellulose was placed over the microcapsules before suturing. Both C57BL/6 and APP/Ps1 mice received daily intraperitoneal injections of BrdU (Sigma, St Louis, MO) dissolved in 0.9% NaCl at dose of 50 mg/kg for 2 weeks. Animals were anesthetized and killed 24 h<sup>+</sup> after the last injection of BrdU. The BrdU<sup>+</sup> cells found were considered to be newly-formed cells that had survived up to 2 weeks.

## 2.4. Human samples

Two groups of human subjects were studied: (1) 16 AD patients (7 men, 9 women: mean age 70 ± 10 years who had been clinically diagnosed as probably having AD according to the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association criteria, and (2) an aged control group consisting of 6 men and 8 women with no neurological disease or cognitive impairment (mean age 71 ± 7 years). Cerebrospinal fluid (CSF) from the participants was collected in a plastic tube and immediately frozen and stored at -80 °C. All the samples were obtained from the Neurology Service of the Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid, Spain). Postmortem brain tissue was obtained from AD patients and age-related healthy subjects. For biochemical assays, blocks containing the cerebral cortex were cut from the frozen brains and dissolved in the appropriate buffer. These human samples were obtained from the Neurological Research Brain Bank (Madrid, Spain).

### 2.5. Cell cultures

Cortical neuronal cell cultures were obtained from Wistar rat embryos of 17 days of gestation, as previously described [22]. Cultures were kept at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> for seven days prior to experimentation.

Primary BMVEC (kind gift from Dr. Milan Fiala) and brain endothelial cell line (b.End3, ATCC® Number CRL-2299) were used. Cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, L-Glutamine to a final concentration of 2 mM, and 1% antibiotic-antimycotic solution. Cell cultures were plated in T-flasks, kept at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere standard incubator, and passaged every 2-3 days. All reagents were purchased from Gibco BRL (Invitrogen S.A.) and Sigma-Aldrich. Neuronal and endothelial cell cultures were treated for 30 min, 1, 3 and 24 h with Aβ<sub>40</sub> or Aβ<sub>42</sub> (5 µg/ml; AnaSpec, Inc.), and 20-30 VEGF microcapsules.

A double-chamber brain endothelial cells system mimicking the blood-brain interface was used for *in vitro* studies. Cell cultures were treated for 24 and 48 h with Aβ<sub>40</sub> (5 µg/mL), and 20-30 VEGF microcapsules were added to the upper chamber. Culture medium in the lower chamber was collected at 24 and 48 h and measured by immunoblot determination.

### 2.6. Immunoblotting

Western blot and immunoprecipitation assays were performed as described previously [23]. Western-blot membranes were reblotted with the same antibody used for immunoprecipitation or with unrelated proteins, to be used as internal standards and to normalize for protein load. Densitometric analysis was performed using Image J software (NIH). Antibodies used included:

rabbit polyclonal anti-Aβ<sub>42</sub> (Chemicon), mouse monoclonal anti-Aβ (to recognize both Aβ<sub>40</sub> and Aβ<sub>42</sub>; Medical Biological Laboratory, Japan), human anti-VEGF (R&D), mouse monoclonal anti-βIII-Tubulin (Promega), goat polyclonal anti-megalin (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), rabbit polyclonal anti-megalin (a kind gift from Dr. Michele Marino), mouse monoclonal anti-β-actin (Sigma), anti-hyperphosphorylated-tau (AT-8, Innogenetics, Gent, Belgium), rabbit polyclonal anti-pSer-GSK3β (Cell Signaling Technology, Inc.), mouse monoclonal anti-GSK3β (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-rabbit polyclonal anti-Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), rabbit polyclonal anti-p-ERK (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), rabbit polyclonal anti-p-Akt (Cell Signaling Technology, Inc.), rabbit polyclonal pMAPK (Cell Signaling Technology, Inc.), mouse monoclonal anticaspase 9 (Cell Signaling Technology, Inc.), and rabbit polyclonal anti-caspase 3 (Cell Signaling Technology, Inc.). Secondary antibodies used were: goat anti-mouse HRP-conjugated (Biorad Laboratories), and goat anti-rabbit HRP-conjugated (Biorad Laboratories).

To detect Aβ oligomers in the 0.1 M TBS and Triton X-100-TBS (TTBS) extracts, western blots of mice brain extracts were performed in Tricine gels (16%). Cortical brain extracts were lysed in TBS and centrifuged at 14,000 rpm for 30 min at 4 °C; then, the pellet was lysed with TTBS and centrifuged again at 14,000 rpm for 30 min at 4 °C. The resultant supernatants were stored at -20 °C until needed.

### 2.7. Immunohistochemistry

Fixed brains were cut on a vibratome (Leica) at 50 µm, collected in cold PB 0.1M, and incubated overnight with primary antibodies at 4 °C. All primary antibodies were diluted in PB 0.1M containing 0.5%

bovine serum albumin and 0.5% Triton X-100. Images were captured using a Zeiss LSM 510 Meta scanning laser confocal microscope (Leica Microsystems). To perform BrdU immunohistochemistry, DNA was denatured with a 30 min incubation in HCl 2N at room temperature. The following antibodies were used: mouse monoclonal anti-BrdU (Roche Diagnostics), rothamine-labeled tomato lectin (Vector Laboratories), mouse monoclonal anti-GFAP (Sigma). Morphometrical analyses were performed as described [45]. BrdU<sup>+</sup> cells were counted in a one-six series of sections with a 40x objective (Leica) throughout the cerebral cortex (from rostral extreme from bregma 2 mm, to the caudal end, from bregma -4.3 mm). The same areas and number of sections were studied for all animals and all the experimental groups. To detect A $\beta$  deposits, brain sections from APP/Ps1 mice were pre-incubated with 88% formic acid and immunostained as previously described [23]. To determine A $\beta$  burden in APP/Ps1 mice, we used a monoclonal antibody that recognizes both endogenous (murine) and transgenic (human) A $\beta$  peptides (Medical Biological Laboratory, Japan). Stereological analysis was done as described [24], and results expressed as the percentage of brain area covered with amyloid. Amyloid deposits in parenchyma were also evaluated using thioflavin-S and Congo Red staining.

#### 2.8. Cell viability quantification

DNA fragmentation signaling undergoing apoptosis was also detected in the cerebral cortex from APP/Ps1 mice using a Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> kit (Roche Diagnostics). Cell proliferation was determined using a commercial 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay (Roche Diagnostics). Tubulization of the endothelial cells was monitored with a 3D

collagen culture system (Chemicon), and the cells were processed for lectin immunocytochemistry.

#### 2.9. Human A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 ELISA

Levels of human endogenous A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 in cerebral cortex and hippocampus fractions from APP/Ps1 mice were determined with human specific ELISA kits (Biosource), according to the manufacturer's instructions.

#### 2.10. Human VEGF ELISA

Levels of endogenous VEGF in cerebral cortex and CSF fractions from AD patients and healthy subjects were determined with a human specific ELISA kit (R&D), according to the manufacturer's instructions.

#### 2.11. Behavioral testing

After adaptation to human handling, behavioral tests were conducted over 10-day period. On each study day, spontaneous alternation, tested with a T-maze, was the first parameter evaluated, followed by the elevated plus maze (days 4 and 5) and object recognition test (days 10 and 11), as described by Lalonde [25]. In the T-maze, the number of alternations and errors (entries to previously visited arms), and the time to complete each session were recorded. In the elevated plus-maze test, the time spent in the different compartments of the maze (open and closed arms), and the number of entries into the arms, were measured. The open/total arm entries and duration ratios were then calculated. These two parameters were taken as measures of an anxiety-related behavior. The object recognition test was essentially performed as described [26]. Briefly, mice were habituated to an open-field box with black vertical walls and a white floor. The next day the animals were placed

in the same box and submitted to a 10 min acquisition trial. During this trial, mice were placed individually in the open field in the presence of object A (marble or dice), and the time spent exploring object A (when the animal's snout was directed toward the object at a distance <1 cm) was measured. During a 10 min retention trial (second trial), which was performed 3 h later, a novel object (object B: marble or dice) was placed together with the familiar object (object A) in the open field. The time ( $t_A$  and  $t_B$ ) the animal spent exploring the two objects was recorded. The recognition index (RI), defined as the ratio of the time spent exploring the novel object over the time spent exploring both objects [ $(t_B/(t_A + t_B)) \times 100$ ] was used to measure nonspatial memory.

#### 2.12. Statistical analysis

Results are shown as means  $\pm$  SEM. One-way ANOVA followed by *post hoc* Student's *t* test was used to compare between groups.

### 3. Results

#### 3.1. Microencapsulation of VEGF-secreting cells

All microcapsules had a uniform and spherical morphology (mean diameter  $405 \pm 11 \mu\text{m}$ ), showing mainly live cells (Fig. 1A). Cell viability, expressed viable cell number, progressively increased, from day 14 onwards, and this effect was maximal after 21 days (Fig. 1B). VEGF production from immobilized cells showed a similar trend (Fig. 1C), being  $3006 \pm 411 \text{ pg}/100 \text{ mcap}/\text{day}$  the day after encapsulation and  $5485 \pm 619 \text{ pg}/100 \text{ mcap}/\text{day}$  at two weeks.

#### 3.2. Angiogenesis after administration of encapsulated VEGF-secreting cells

First, we determined if encapsulated VEGF-secreting cells increased brain vessel growth. Primary brain microvascular endothelial cells (BMVEC) increased their proliferation and tubulization in response to VEGF secreted by encapsulated cells in a time-dependent manner (Fig. 2A and B). Based on these results, we hypothesized that VEGF released from enclosed cells acted upon brain endothelial cells to modulate their growth *in vivo*. Cranial implants of microencapsulated cells secreting VEGF promoted brain vessel formation within the cerebral cortex of adult C57BL/6 mice compared with the non-transfected cell microcapsules-treated group (Fig. 2C). Two weeks after implantation of encapsulated VEGF-secreting cells in adult C57BL/6 mice, vascular density was markedly augmented in the cerebral cortex in comparison with the control group ( $p < 0.05$ , Fig. 2C). This increased effect was maintained during all the treatment and was maximal after 3 months ( $p < 0.01$ , Fig. 2C). In the cerebral cortex, proliferating cells (BrdUrd<sup>+</sup>) associated with the endothelial marker lectin, were observed early in the response to secreted VEGF (Fig. 2D). A minimal astrogliosis was observed associated with the craniotomy surgery. Reactive astrocytes expressing glial fibrillary acidic protein (GFAP) were scarce within the cerebral cortex of C57BL/6 mice receiving the microencapsulated cells, which illustrates the biocompatibility of the microparticles (Fig. 2E). The local reaction was not altered after the implantation of either non-transfected or VEGF-releasing microcapsules.

To determine whether the angiogenic response induced by the encapsulated cells was also efficient in A $\beta$ -induced microvasculature dysfunction, we examined

the role of VEGF microcapsule induced angiogenesis in APP/Ps1 mice. Three months after VEGF microcapsule implantation, APP/Ps1 mice showed enhanced brain vessel density in the cerebral cortex ( $p < 0.05$ , Fig. 3A). BrdUrd<sup>+</sup> cells in the brain of these mice also exhibited endothelial traits (tomato lectin<sup>+</sup>) (Fig. 3B). The total number of BrdUrd<sup>+</sup> cells increased in response to VEGF microcapsule implantation, with around 35% associated with the endothelial marker lectin (Fig. 3B). Endothelial cell growth was also determined in the hippocampus, but no significant increases in vessel density were seen (data not shown). To confirm that this effect is due to VEGF released from implanted microcapsules, levels of human VEGF were also analyzed. Human VEGF expression was only detected in cerebral cortex from VEGF microcapsules-treated APP/Ps1 mice, whereas it was absent in non-transfected cell microcapsules-treated APP/Ps1 mice, as determined by western blot and confirmed by using immunohistochemistry analysis (Fig. 3C).

To investigate whether these newly-formed vessels were functional, expression of LRP, RAGE, and megalin were also analyzed in cerebral cortex tissue. Levels of these A $\beta$  receptors were significantly increased in APP/Ps1 mice three months after VEGF microcapsule implantation ( $p < 0.05$ , Fig. 3D).

### 3.3. A $\beta$ clearance after administration of encapsulated VEGF-secreting cells

Stereological analysis of brain amyloid stained with an antibody recognizing both endogenous (murine) and transgenic (human) A $\beta$  peptides (Fig. 4A, top panel) indicated that treatment with VEGF-secreting encapsulated cells reduced the percentage of brain parenchyma stained with amyloid.

Amyloid immunostaining in APP/Ps1 mice treated with VEGF microcapsules showed a 32% decrease in the cerebral cortex ( $14.2 \pm 0.9\%$  in control APP/Ps1 mice versus  $9 \pm 0.3\%$  in treated mice,  $p < 0.05$ , Fig. 4B), and a 25% decrease in the hippocampus (CA1 and dentate gyrus;  $4.7 \pm 0.1\%$  in control APP/Ps1 mice versus  $3.4 \pm 0.2\%$  in treated mice,  $p < 0.05$ , Fig. 4C). We also used Congo Red (Fig. 4A, middle panel), and thioflavin-S staining (Fig. 4A, bottom panel) to detect amyloid deposits and the presence of thioflavin-positive aggregates, and we observed fewer and smaller deposits after treatment with VEGF-releasing encapsulated cells.

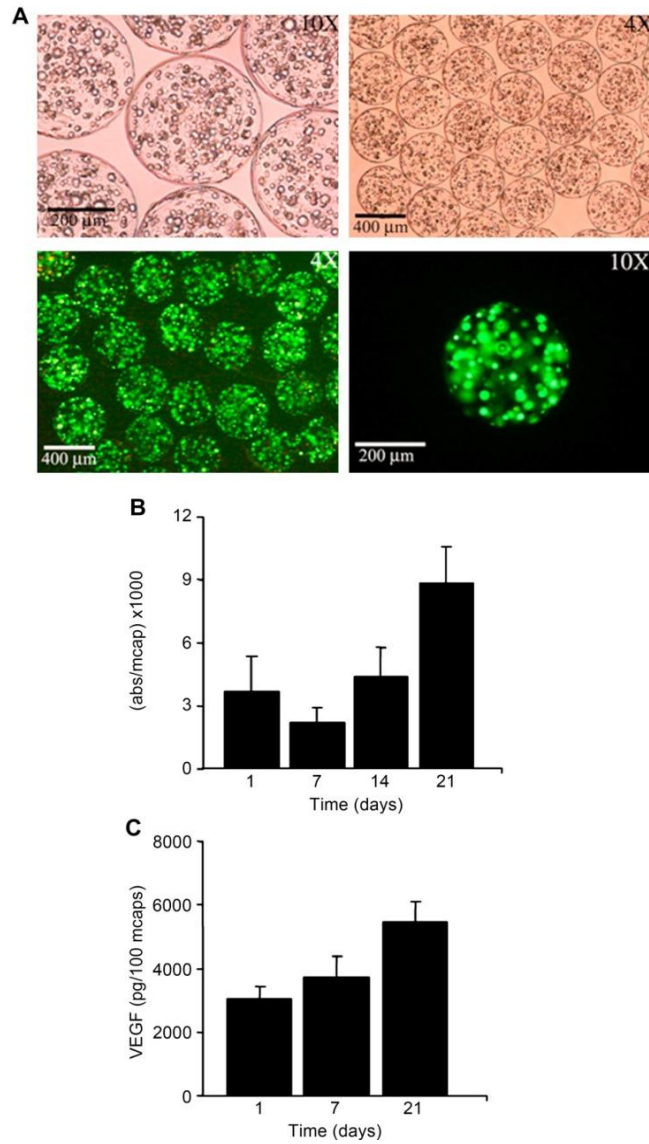
In order to quantify with greater accuracy the changes occurring in A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 levels after VEGF microcapsule treatment, we carried out ELISA quantification of these two peptides in the same groups of animals. APP/Ps1 mice treated with VEGF microcapsules had a 72% and 48% reduction in human A $\beta$ 40 in the cerebral cortex and hippocampus, respectively (Table 1), confirming the results obtained with immunostaining. In addition, A $\beta$ 42 levels were reduced after implantation of encapsulated VEGF-secreting cells by 46% in the cerebral cortex and 21% in the hippocampus of treated mice (Table 1).

As previously documented, VEGF microcapsule implantation induces new vessels formation in APP/Ps1 mice (Fig. 3A). This increase in vessel network may contribute to an enhancement of A $\beta$  clearance in these mice. Supporting this hypothesis, we found not only a reduction in A $\beta$  deposits in VEGF microcapsule-treated APP/Ps1 mice, but also an increase in A $\beta$  within brain vessels (Supplemental Fig. 1D). Although, megalin expression was significantly enhanced in cerebral cortex samples from APP/Ps1 mice treated with VEGF microcapsules (Fig. 3D), VEGF did

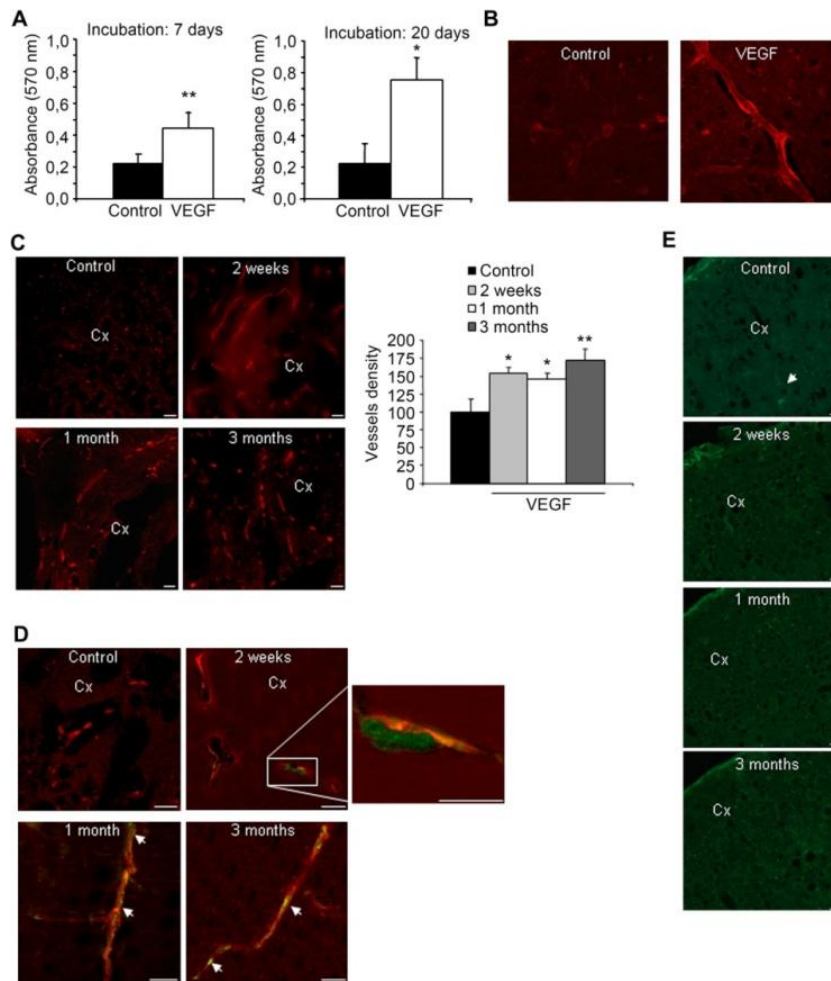
not increase megalin expression in b.End3 brain endothelial cell line treated with VEGF microcapsules ([Supplemental Fig. 1E](#)). *In vitro* analysis showed that the soluble form A $\beta$ 40 is not accumulated, but it is rapidly processed within b.End3 cells. ([Supplemental](#)

[Fig. 1F](#)) agreeing with the transcytosis processes through an endothelial cell monolayer using our double-chamber system ([Supplemental Fig. 1G](#)).

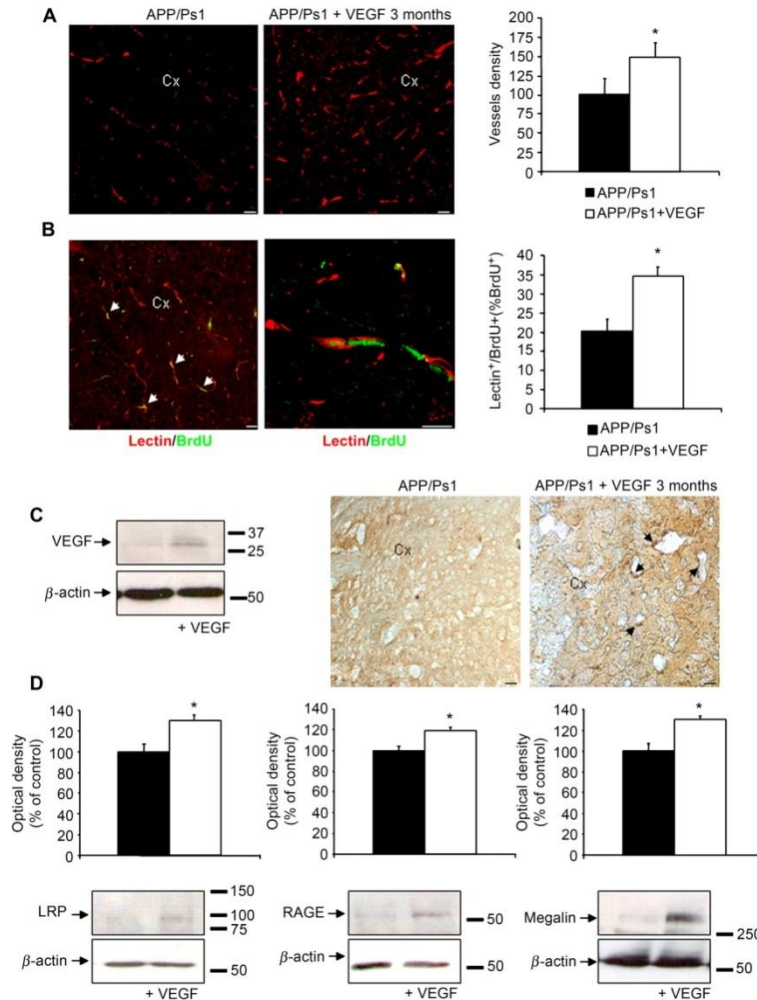




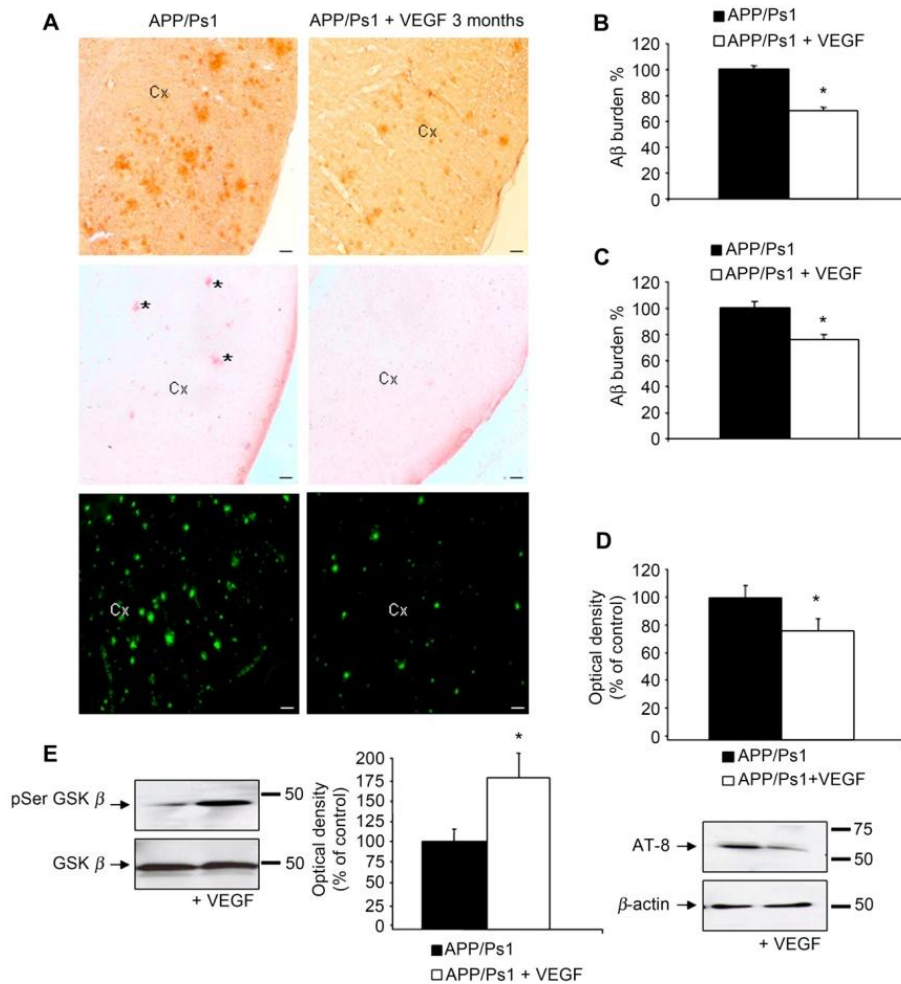
**Fig. 1.** VEGF-secreting encapsulated cells. (A) VEGF-secreting fibroblasts are immobilized within alginate-poly-L-lysine-alginate microcapsules. The upper panel shows a phase contrast image at x4 (left image) and x10 (right image) magnifications, obtained with a bright field microscope. The lower panel shows fluorescence microscopy images of calcein-AM (green, live cells) and ethidium homodimer (red, death cells)-stained cells. Magnifications: x4 (left) and x10 (right). (B) Viability of VEGF microcapsules-secreting fibroblasts for up to 21 days *in vitro*. (C) VEGF production from microencapsulated VEGF-secreting fibroblasts. (Data are expressed as mean  $\pm$  SD, n = 5 per group).



**Fig. 2.** Brain angiogenesis in C57BL/6 mice after VEGF microcapsule treatment. (A) Addition of VEGF microcapsules stimulates proliferation of BMVEC in a time-dependent manner, as determined using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide assay. (Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 versus non-transfected microcapsules-treated cell cultures). (B) In the presence of VEGF microcapsules endothelial cells plated on collagen form tubular structures, a prerequisite in the angiogenic process. Endothelial cells were labeled with tomato lectin (red). Note the absence of tubes under control conditions. (C) Implantation of VEGF microcapsules onto the cerebral cortex (Cx) elicits a significant increase of brain vascularization in C57BL/6 mice in a time-dependent manner. Vessels were identified with tomato lectin (red), and the percentage of cortical tissue covered with vessels was estimated. Histograms indicate vessel density in the cerebral cortex. (Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01 versus non-transfected cell microcapsule-treated C57BL/6 mice,  $n$  = 4-5 per group). (D) Fluorescent labeled microphotographs show newly-formed brain vessels (white arrows) with BrdUrd<sup>+</sup> nuclei (green), co-labeled with tomato lectin which stains the cytoplasm (red). (E) VEGF microcapsules implants onto the cerebral cortex of C57BL/6 mice do not induce an immune response. Reactive astrocytes (white arrows) expressing GFAP (green) were scarce within the cerebral cortex (Cx) of these mice compared with intact (sham operated) animals. (Scale bar = 20  $\mu$ m). Scale bars = 20  $\mu$ m.



**Fig. 3.** Brain angiogenesis in APP/Ps1 mice after implantation of VEGF microcapsules. (A) After three months, implantation of VEGF microcapsules onto the cerebral cortex (Cx) elicits a significant increase in brain APP/Ps1 mice vascularization. Vessels were identified with tomato lectin (red) and the percentage of brain surface covered with vessels was estimated. The histograms indicate vessel density in the cerebral cortex. (B) After three months, implantation of VEGF microcapsules induces proliferation of endothelial cells in the cerebral cortex (Cx) from APP/Ps1 mice. Immunofluorescence of newly-formed brain vessels (white arrows) with BrdUrd<sup>+</sup> nuclei (green) co-labeled with tomato lectin in the cytoplasm (red). Scale bars = 20 μm. The histograms indicate that the number of double-labeled BrdUrd<sup>+</sup>/lectin<sup>+</sup> cells significantly increased in VEGF microcapsule-treated APP/Ps1 mice. (C) Human VEGF expression was detected in cerebral cortex from APP/Ps1 mice treated with VEGF microcapsule implantation. A representative VEGF blot is shown. Microphotographs of VEGF-stained show VEGF expression in vessels from VEGF microcapsule-implanted APP/Ps1 mice. Re-blotting with β-actin shows an equal protein load in lanes (n = 7-8 per group). (D) Implantation of VEGF microcapsules increases expression of LRP, RAGE, and megalin in the cerebral cortex of VEGF microcapsules-treated mice. Representative western blots and densitometry histograms are shown. (Data are expressed as mean ± SEM, \*p < 0.05 versus non-transfected cell microcapsules-treated APP/Ps1 mice, n = 7-8 per group).



**Fig. 4.** Brain A $\beta$  burden in APP/Ps1 mice after implantation of VEGF microcapsules. (A) Amyloid deposits in the cerebral cortex (Cx) of APP/Ps1 mice are reduced by VEGF microcapsules treatment. Murine and human A $\beta$  were detected with an antibody recognizing both A $\beta$  forms (top panels). Amyloid deposits (black asterisk) were also detected with Congo Red staining (middle panels). Thioflavin-S staining to detect amyloid deposits and thioflavin-positive aggregates are reduced after VEGF microcapsule treatment (bottom panels). (Scale bar = 20  $\mu$ m). (B) Cerebral cortex and (C) hippocampus A $\beta$  burden is decreased in VEGF microcapsules-treated APP/Ps1 mice. Brain A $\beta$  burden represents the percentage area covered by A $\beta$  immunoreactivity. (D) Brain Hpf-tau levels significantly decreased after VEGF microcapsules implants in the cerebral cortex of APP/Ps1 mice. (E) Levels of pSer9GSK-3 $\beta$  are increased in the cerebral cortex of VEGF microcapsule-treated APP/Ps1 mice. Representative western blots and densitometry histograms are shown. (Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, \* $p$  < 0.05 versus control APP/Ps1 mice,  $n$  = 8 for APP/Ps1 control group,  $n$  = 7 for VEGF microcapsule-treated APP/Ps1 mice).

3.4. *Hpf-tau after administration of encapsulated VEGF-secreting cells*

Because amyloidosis is also associated with brain deposits of hyper-phosphorylated-tau (Hpf-tau) in AD brain, we investigated whether Hpf-tau was modified in VEGF microcapsules-treated APP/Ps1 mice. Using an AT-8 anti- Hpf-tau antibody, we found a significant decrease in the levels of Hpf-tau

in the mice treated for three months ( $p < 0.05$ , Fig 4D). The latter agrees with an increase in pSer9GSK3 $\beta$  (inactive form) in the cerebral cortex of VEGF microcapsules-treated APP/Ps1 mice ( $p < 0.05$ , Fig 4E), which suggests that the activity of this tau-kinase is decreased.

**Table 1**  
Amyloid levels in VEGF-treated APP/Ps1 mice.

	A $\beta$ <sub>1-40</sub> (% control)	A $\beta$ <sub>1-42</sub> (% control)
Cerebral cortex	28,44 $\pm$ 5,47**	44,07 $\pm$ 10,7**
Hippocampus	52,59 $\pm$ 5,88*	78,18 $\pm$ 15,92

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  versus control APP/Ps1 mice).

3.5. *Cell death after administration of encapsulated VEGF-secreting cells*

Using the Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> kit, we found a significant reduction in apoptotic cell death in the cerebral cortex of VEGF microcapsule-treated APP/Ps1 mice ( $p < 0.05$ , Fig. 5A). Cranial implants of VEGF microcapsules in APP/Ps1 resulted in a substantial increase in Akt phosphorylation (pAkt). In parallel with this Akt activation, a marked increase in the phosphorylation of extracellular signal-related kinase (pERK), and phospho-mitogen-activated protein kinase (pMAPK) was observed (Fig. 5B). This effect in cell death is preceded by a significant decrease in caspase-3 and 9 protein expression in cerebral cortex samples from VEGF microcapsule-treated APP/Ps1 mice ( $p < 0.05$ , Fig. 5C).

Encapsulated VEGF-secreting cells added to neuronal or endothelial cell cultures were also able to prevent A $\beta$ 42-induced apoptotic cell death ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ , Fig. 5D). In neuronal cell cultures, our results showed that both A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 induced a severe reduction in the cytosolic anti-apoptotic protein Bcl-2, together with an enhanced expression of caspase 3 (Fig. 5E). Addition of VEGF microcapsules to these neuronal cell cultures resulted in a complete reversal of these effects (Fig. 5E). In BMVEC, A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 produced similar effects on the cell death pathway (data not shown), and treatment with VEGF microcapsules was able to block them, as could be tested by the modulation of caspase-3 expression (Fig. 5F).

### 3.6. Behavioral deficits after administration of encapsulated VEGF-secreting cells

We also determined whether VEGF microcapsules-treated APP/Ps1 mice showed memory recovery. In the T-maze, the mean  $\pm$  SEM spontaneous alternation rate of the female non-transgenic mice ( $57\% \pm 5.6$ ) was significantly higher than the APP/Ps1 group ( $45\% \pm 4.3$ ,  $p < 0.05$ ), whereas VEGF microcapsules-treated APP/Ps1 mice showed approximately the same rate as control APP/Ps1 mice ( $47.5\% \pm 6.3$ ). Choice trial latencies of the APP/Ps1 mice were significantly increased compared with non-transgenic mice, and were reduced after VEGF microcapsules implantation ( $p < 0.05$ , Fig. 6A).

Cognitive capacity was assessed using a paradigm of nonspatial visual recognition memory, subjecting the animals to a “novel object” recognition task, which is known to depend on hippocampal activity [26]. Retention in the female APP/Ps1 transgenic mice was significantly impaired relative to non-transgenic mice, whereas in VEGF microcapsules-treated APP/Ps1 mice the impaired cognition was completely restored ( $p < 0.05$ ) (Fig. 6B).

VEGF microcapsules-treated APP/Ps1 mice showed anxiety-related differences in the elevated plus maze compared with control APP/Ps1 mice. On day 1 of the elevated plus-maze test (Table 2), APP/Ps1 mice spent more time in the open arms than non-transgenic controls, as previously described [25]. This effect was shown as an open/total entries ratio, which was elevated in the APP/Ps1 group and partially reduced after VEGF microcapsules implantation. On day 2, behavioral tendency was similar, and VEGF microcapsules treatment was able to significantly decrease the open/total entries and duration ratios in APP/Ps1 mice (Table 2).

## 4. Discussion

Our results suggest that administration of encapsulated VEGF-secreting cells for three months alleviates behavioral impairment in APP/Ps1 mice and reduces total brain A $\beta$  load. VEGF microcapsules treatment also ameliorates other AD-related disturbances, such as apoptotic cell death in the cerebral cortex and Hpf-tau. Based on our observations, and on results obtained in human assays [27], we consider that VEGF microcapsules may be implemented as part of the treatment in AD patients.

Grafting of genetically modified cells that express therapeutic products is a promising strategy in neurodegenerative diseases [28,29]. Microencapsulation of cells has been successfully used for nearly two decades to deliver transmitters, growth factors, hormones, enzymes and other proteins [30,31]. In the present study, we investigated whether implantation of encapsulated VEGF-secreting cells directly onto the cerebral cortex of mice would induce brain angiogenesis in a time-dependent manner. First, we confirmed that this experimental approach leads to an efficient formation of new vessels in the cerebral cortex of C57BL/6 mice, agreeing with the angiogenic characteristics of this trophic factor [32]. This action was also reproduced in APP/Ps1 mice, an experimental model of AD. Several lines of evidence suggest that cerebrovascular alterations might represent an important pathogenic mechanism in AD [33], where brain vessel remodeling is probably dysregulated [14]. A recent study provided evidence that cerebrovascular degeneration is related to A $\beta$  deposition [34], which eventually affects brain perfusion and BBB properties.

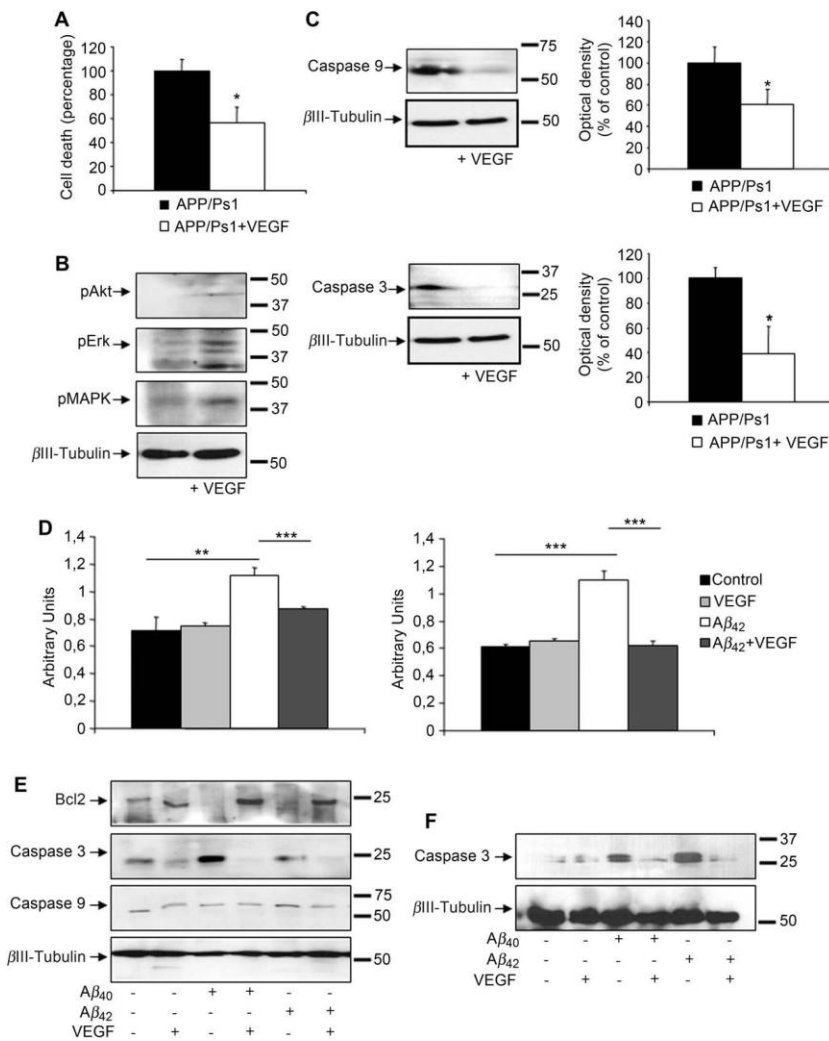


Our findings also indicate that treatment with VEGF microcapsules modulates brain levels of A $\beta$ , a protein related to the pathogenesis of AD dementia [13]. Indeed, it has been described that VEGF co-accumulates with amyloid plaques in the AD brain [35]. We suggest that VEGF may reduce brain A $\beta$  load, at least in part, by enhancing its clearance through this newly-formed cerebral microvasculature. This action of VEGF appears to be physiologically relevant, because in AD the angiogenic status is compromised [10], as it has been reflected in our study where VEGF levels are altered ([supplemental Table 1](#) online), in accordance with previous studies [17,18]. Treatment with VEGF microcapsules would not only participate in A $\beta$  transport from the brain to the blood, but also in the reduction of oligomeric A $\beta$  formation.

The finding that VEGF microcapsules were able to reduce A $\beta$  burden distal to the graft side (hippocampus) may be explained by the diffusion of the VEGF through the parenchyma. Because of the low sensitivity of available anti-VEGF antibodies and the low levels of VEGF secreted from the micro-

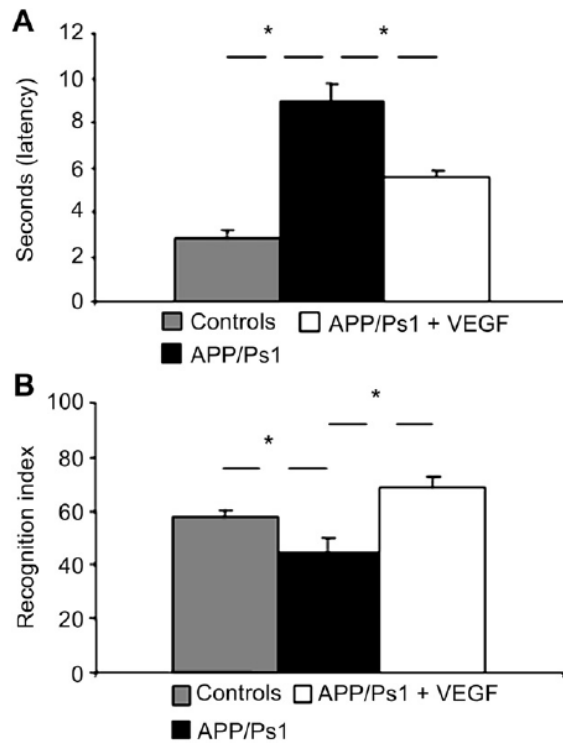
capsules, we only detected low human VEGF levels within cerebral cortex samples from VEGF microcapsules-implanted APP/Ps1 mice.

Because A $\beta$  oligomers may be responsible for the cognitive deficits associated with AD by interfering with synaptic function, we investigated monomeric and oligomeric A $\beta$  forms in brain extracts of APP/Ps1 mice. In membrane-associated ([Supplemental Fig. 1A](#)) or soluble extracts ([Supplemental Fig. 1B](#)) of cortex homogenates from VEGF microcapsules-treated APP/Ps1 mice, dimeric forms of A $\beta$  were reduced, whereas A $\beta$  trimers were drastically decreased in soluble extract samples. In addition, there was a marked reduction in A $\beta$  monomers in cerebral cortex total lysates of these animals compared with controls ([Supplemental Fig. 1C](#)). In view of the ability of VEGF to reduce brain oligomeric forms of A $\beta$ , we focused on its relationship with neuroprotection. Converging lines of evidence suggest that A $\beta$  oligomers play a role in the cognitive impairment which characterizes AD [36].



**Fig. 5.** Cell death in after VEGF microcapsule treatment. (A) Cell death is reduced in the cerebral cortex of VEGF microcapsule-treated APP/Ps1 mice. (Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, \* $p$  < 0.05 versus control APP/Ps1 mice). (B) VEGF microcapsules implantation in APP/Ps1 mice induces phosphorylation of Akt, Erk, and MAPK. Note that the levels of the unrelated protein  $\beta$ III-Tubulin remain undisturbed. (C) Caspase-3 and 9 levels were reduced in the cerebral cortex of VEGF microcapsules-treated APP/Ps1 mice. Representative western blots and densitometry histograms are shown. (Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, \* $p$  < 0.05 versus control APP/Ps1 mice). (D) VEGF microcapsules treatment protects against A $\beta$ -induced cell death in neuronal (left panel) and endothelial (right panel) cell cultures. (Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001 versus non-transfected cell microcapsule-treated cell cultures). (E) Representative western blots show A $\beta$ <sub>40</sub> and A $\beta$ <sub>42</sub>-induced effects on Bcl2, and caspases-3 and 9 expression in neuronal cell cultures 24 h after treatment. Addition of VEGF microcapsules to the cell culture completely reverses these effects. (F) A $\beta$ <sub>40</sub> and A $\beta$ <sub>42</sub> incubation for 24 h increased caspase-3 levels in BMVEC. VEGF treatment reduced caspase-3 expression. Representative western blots are shown.





**Fig. 6.** Cognition in APP/Ps1 mice after implantation of VEGF microcapsules modulates. (A) Increased latencies in the spontaneous alternation of APP/Ps1 mice in the T-maze were partially normalized after VEGF microcapsule treatment (3 months). (B) In the novel-object recognition task, recognition memory was expressed as exploratory preference in the retention test. The recognition index, representing exploratory preference, was reduced in APP/Ps1 mice compared with non-transgenic mice (controls), and recovered after VEGF microcapsules implantation. (Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, \* $p < 0.05$ ,  $n = 6$  for non-transgenic control group,  $n = 8$  for APP/Ps1 control group,  $n = 7$  for VEGF microcapsule-treated APP/Ps1 mice). Scale bars = 20  $\mu$ m.

**Table 2**

Open and enclosed arms visits and duration in the elevated plus-maze by non-transgenic control, APP/Ps1, and VEGF microcapsules-treated APP/Ps1 mice for two days of testing.

Measures	controls	APP/Ps1	VEGF-treated APP/Ps1
Day 1			
Open/total arms (%)			
Entries	31.58 ± 1.94	67.25 ± 1.4 <sup>a</sup>	57.2 ± 1.73 <sup>c</sup>
Duration	18.51 ± 2.72	35.76 ± 8.2 <sup>b</sup>	54.85 ± 10.2
Day 2			
Open/total arms (%)			
Entries	30.19 ± 1.96	74.05 ± 2.7 <sup>a</sup>	43.13 ± 1.37 <sup>c</sup>
Duration	6.64 ± 1.81	35.43 ± 4.02 <sup>a</sup>	25.06 ± 3.3 <sup>c</sup>

Data are expressed as mean ± S.E.M.

<sup>a</sup>  $p < 0.01$ .

<sup>b</sup>  $p < 0.05$  versus non-transgenic mice.

<sup>c</sup>  $p < 0.05$  versus APP/Ps1 mice.

We suggest that the increase in vessel sprouting induced by VEGF around A $\beta$  plaques, may contribute to compensate the hypoperfusion and local deficiency of soluble VEGF, heavily accumulated and co-localized with A $\beta$  plaques. According to a recent study [35], this compensation is necessary to protect the cerebral vessels and neurons. In our study, we observed that treatment with VEGF microcapsules enhanced the survival of neuronal and endothelial cell cultures, a behavior that has been reported by other groups [37,38]. This neuroprotective effect seems to be mediated by the phosphoinositol-3-kinase/Akt and the MEK/ERK pathways, and the modulation of caspase 3 and pro-survival Bcl-2 [39]. Moreover, our *in vivo* experiments showed that implantation of VEGF microcapsules in the cerebral cortex of APP/Ps1 mice produce a robust reduction in the apoptotic cell death.

This dual action of VEGF may be essential for neuroprotection, which includes brain A $\beta$  clearance and amyloid neurotoxicity [40]. An additional theoretical action would be the modulation of tau phosphorylation,

involved in tangle formation. Amyloid peptides have been proposed to participate in the appearance of this abnormal form of tau [41]. We found a significant decrease in the levels of Hpf-tau three months after VEGF microcapsules implantation in APP/Ps1 mice. Furthermore, we observed that VEGF inhibited GSK-3 by stimulation of the inactive form (pSer9GSK-3 $\beta$ ), and in this way could be contributing to the low levels of Hpf-tau. An analysis of the possible underlying mechanisms revealed that phosphorylated Akt, which could result as a consequence of VEGF treatment, inactivates GSK-3 $\beta$  [42].

While plaques and tangles are hallmark anatomical features of AD, their contribution to cognitive loss, the clinically relevant aspect of AD, is far from clear. The most important therapeutic goal in AD is to ameliorate cognitive disturbances, the clinically relevant deficit in these patients. In addition to amnesia, patients with AD exhibit neuropsychiatric symptoms such as apathy, sometimes accompanied by depression, dysphoria, and social withdrawal [43].

However, the opposite pattern, consisting of agitation, restlessness, disinhibition, and euphoria is frequently reported as well [43]. The impairment in spontaneous alternation may be interpreted in several ways, including a loss in motivation to explore, inhibitory control or spatial orientation, similar to symptoms described in Alzheimer dementia [43]. Results in the elevated plus maze agree with the hypothesis that APP/Ps1 mice exhibit disinhibitory tendencies. Using the object recognition test, we investigated visual short-term memory, which is mainly affected in AD. AD patients typically present short-term memory deficits before long-term memory capacity declines with disease progression [44]. We found that in APP/Ps1 mice, in which cognition is already compromised, implantation of VEGF microcapsules alleviated these behavioral deficits.

## 5. Conclusions

In summary, our findings confirm previous evidence of a potential therapeutic benefit of VEGF therapy in brain angiogenesis, neuroprotection and cerebrovascular exchange of substrates and nutrients. Several studies have reported the successful use of encapsulated cell implants that allow diffusion of therapeutic factors into biological fluids, including CSF [45,46]. In view of our data, it may be feasible and attractive to implant genetically modified cells into peripheral compartments. We propose that implantation of VEGF microcapsules may have a therapeutic value in the treatment and prevention of brain amyloidosis.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) (CP04/00179, PI060155) and Comunidad de

Madrid (2006.125). We also acknowledge the support from Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-03157). Brain samples were collected at the Brain Bank for Neurological Research, Complutense University, Madrid, Spain. We thank Dr. Ximena Alvira-Botero for her editorial assistance.

## Appendix. Supplementary data

Figure 1 VEGF microcapsules treatment modulates A $\beta$  levels in APP/Ps1 mice and in brain endothelial cell cultures. (A) Dimers and trimers of A $\beta$  are reduced on supernatants of the membrane-associated (TBS-TX100) and soluble (TBS) (B) extracts of cerebral cortex from VEGF microcapsules-treated mice compared with empty control APP/Ps1 mice. (C) Monomeric A $\beta$  is reduced in cerebral cortex total lysates from VEGF microcapsules-treated mice compared with control APP/Ps1 mice. (D) After VEGF microcapsules implantation, A $\beta$  staining (green) are reduced in brain tissue and increased in brain endothelial cells (red). Note merged (yellow) staining in the cytoplasm and blue staining in the nucleus of brain endothelial cells from VEGF microcapsules-treated APP/Ps1 mice (Scale bar = 20  $\mu$ m). (E) In b.End3 cell line treated with VEGF microcapsules, western-blot analysis shows that megalin expression is unchanged with respect to non-transfected cell microcapsules-treated cultures. (F) A $\beta$ 40 is rapidly incorporated (30 min) within the cytoplasm of these brain endothelial cells after VEGF microcapsules. (G) *In vitro* transcytosis of A $\beta$ 40 through b.End3 cell monolayer is unchanged 24 h after VEGF microcapsules addition.

The supplementary data associated with this article can be found in the on-line version at [doi:10.1016/j.biomaterials.2010.03.042](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.03.042).

## Appendix

Figures with essential color discrimination. Figs. 1-4 in this article are difficult to interpret in black and white. The full color images can be found in the on-line version, at [doi:10.1016/j.biomaterials.2010.03.042](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.03.042).

## References

- [1] Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002;297:353-6.
- [2] Tanzi RE, Moir RD, Wagner SL. Clearance of alzheimer's Abeta peptide: the many roads to perdition. *Neuron* 2004;43:605-8.
- [3] Hardy J, Cullen K. Amyloid at the blood vessel wall. *Nat Med* 2006;12:756-7.
- [4] Gorelick PB. Risk factors for vascular dementia and alzheimer's disease. *Stroke* 2004;35:2620-2.
- [5] Casserly I, Topol E. Convergence of atherosclerosis and alzheimer's disease: inflammation, cholesterol, and misfolded proteins. *Lancet* 2004;363:1139-46.
- [6] Greenberg SM, Gurol ME, Rosand J, Smith EE. Amyloid angiopathy-related vascular cognitive impairment. *Stroke* 2004;35:2616-9.
- [7] Farkas E, Luiten PG. Cerebral microvascular pathology in aging and alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 2001;64:575-611.
- [8] Zlokovic BV. Clearing amyloid through the blood-brain barrier. *J Neurochem* 2004;89:807-11.
- [9] Deane R, Wu Z, Zlokovic BV. RAGE (yin) versus LRP (yang) balance regulates alzheimer amyloid beta-peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke* 2004;35:2628-31.
- [10] Zlokovic BV. Neurovascular mechanisms of alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci* 2005;28:202-8.
- [11] Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nat Med* 2003;9:653-60.
- [12] Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Tateno K, Kunieda T, Komuro I. Vascular cell senescence and vascular aging. *J Mol Cell Cardiol* 2004;36:175-83.
- [13] Selkoe DJ. Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron* 2001;32:177-80.
- [14] Greenberg DA, Jin K. From angiogenesis to neuropathology. *Nature* 2005;438:954-9.
- [15] Jin KL, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:10242-7.
- [16] Storkebaum E, Carmeliet P. VEGF: a critical player in neurodegeneration. *J Clin Invest* 2004;113:14-8.
- [17] Tarkowski E, Issa R, Sjögren M, Wallin A, Blennow K, Tarkowski A, et al. Increased intrathecal levels of the angiogenic factors VEGF and TGF-beta in alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurobiol Aging* 2002;23:237-43.
- [18] Mateo I, Llorca J, Infante J, Rodríguez-Rodríguez E, Fernández-Viadero C, Peña N, et al. Low serum VEGF levels are associated with alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* 2007;116:56-8.
- [19] Orive G, Hernández RM, Gascón AR, Calafiore R, Chang TM, De Vos P, et al. Cell encapsulation: promise and progress. *Nat Med* 2003;9:104-7.
- [20] Uludag H, De Vos P, Tresco PA. Technology of mammalian cell encapsulation. *Adv Drug Deliv Rev* 2000;42:29-64.
- [21] Lee GD, Aruna JH, Barrett PM, Lei DL, Ingram DK, Mouton PR. Stereological analysis of microvascular parameters in a double transgenic model of alzheimer's disease. *Brain Res Bull* 2005;65:317-22.
- [22] Gonzalez de la Vega A, Buño W, Pons S, Garcia-Calderat MS, Garcia-Galloway E, Torres-Aleman I. Insulin-like growth factor I potentiates kainate receptors through a phosphatidylinositol 3-kinase dependent pathway. *Neuroreport* 2001;12:1293-6.
- [23] Carro E, Trejo JL, Gomez-Isla T, LeRoith D, Torres-Aleman I. Serum insulin-like growth factor I regulates brain amyloid-beta levels. *Nat Med* 2002;8:1390-7.
- [24] Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* 2001;21:1628-34.
- [25] Lalonde R, Kim HD, Fukuchi K. Exploratory activity, anxiety, and motor coordination in bigenic APP<sup>sw</sup> + PS1/DeltaE9 mice. *Neurosci Lett* 2004;369: 156-61.
- [26] Dewachter I, Reversé D, Caluwaerts N, Ris L, Kuiperi C, Van den Haute C, et al. Neuronal deficiency of presenilin 1 inhibits amyloid plaque formation and corrects hippocampal long-term potentiation but not a cognitive defect of amyloid precursor protein [V717I] transgenic mice. *J Neurosci* 2002;22: 3445-53.
- [27] Yoshida H, Date I, Shingo T, Fujiwara K, Kobayashi K, Miyoshi Y, et al. Stereotactically transplantation of a dopamine-producing capsule into the striatum for treatment of parkinson disease: a preclinical primate study. *J Neurosurg* 2003;98:874-81.
- [28] Yasuhara T, Shingo T, Kobayashi K, Takeuchi A, Yano A, Muraoka K, et al. Neuroprotective effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) upon dopaminergic neurons in a rat

- model of parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 2004;19:1494-504.
- [29] Borlongan CV. Cell therapy for stroke. Remaining issues to address before embarking on clinical trials. *Stroke* 2009;40:146-8.
- [30] Elliott RB, Escobar L, Garkavenko O, Croxson MC, Schroeder BA, McGregor M, et al. No evidence of infection with porcine endogenous retrovirus in recipients of encapsulated porcine islet xenografts. *Cell Transplant* 2000;9: 895-901.
- [31] Joki T, Machluf M, Atala A, Zhu J, Seyfried NT, Dunn IF, et al. Continuous release of endostatin from microencapsulated engineered cells for tumor therapy. *Nat Biotechnol* 2001;19:35-9.
- [32] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-76.
- [33] Grammas P, Yamada M, Zlokovic B. The cerebrovasculature: a key player in the pathogenesis of alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2002;4:217-23.
- [34] Miao J, Vitek MP, Xu F, Previti ML, Davis J, Van Nostrand WE. Reducing cerebral microvascular amyloid-beta protein deposition diminishes regional neuroinflammation in vasculotropic mutant amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci* 2005;25:6271-7.
- [35] Yang SP, Bae DG, Kang HJ, Gwag BJ, Gho YS, Chae CB. Co-accumulation of vascular endothelial growth factor with beta-amyloid in the brain of patients with alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2004;25:283-90.
- [36] Lesné S, Kotilinek L. Amyloid plaques and amyloid-beta oligomers: an ongoing debate. *J Neurosci* 2005;25:9319-20.
- [37] Matsuzaki H, Tamatani M, Yamaguchi A, Namikawa K, Kiyama H, Vitek MP, et al. Vascular endothelial growth factor rescues hippocampal neurons from glutamate-induced toxicity: signal transduction cascades. *FASEB J* 2001;15:1218-20.
- [38] Zachary I. Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280: 1375-86.
- [39] Wick A, Wick W, Waltenberger J, Weller M, Dichgans J, Schulz JB. Neuroprotection by hypoxic preconditioning requires sequential activation of vascular endothelial growth factor receptor and Akt. *J Neurosci* 2002;22: 6401-7.
- [40] Cleary JP, Walsh DM, Hofmeister JJ, Shankar GM, Kuskowski MA, Selkoe DJ, et al. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci* 2005;8:79-84.
- [41] Hoshi M, Sato M, Matsumoto S, Noguchi A, Yasutake K, Yoshida N, et al. Spherical aggregates of beta-amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:6370-5.
- [42] Nassif M, Hoppe J, Santin K, Frozza R, Zamin LL, Simão F, et al. Beta-amyloid peptide toxicity in organotypic hippocampal slice culture involves Akt/PKB, GSK-3beta, and PTEN. *Neurochem Int* 2007;50:229-35.
- [43] Cheng JA, Cummings JL. Neurobehavioral and neuropsychiatric symptoms in alzheimer's disease: characteristics and treatment. *Neurol Clin* 2000;18: 829-46.
- [44] Germano C, Kinsella GJ. Working memory and learning in early alzheimer's disease. *Neuropsychol Rev* 2005;15:1-10.
- [45] Aebischer P, Schlupe M, Déglon N, Joseph JM, Hirt L, Heyd B, et al. Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Nat Med* 1996;2:696-9.
- [46] Sieving PA, Caruso RC, Tao W, Coleman HR, Thompson DJ, Fullmer KR, et al. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:3896-901.



**ARTÍCULO 4**

**Encapsulated VEGF-secreting cells enhance proliferation of neuronal progenitors in the hippocampus of APP/Ps1 mice**  
**Aceptado para su publicación en J Alzheimers Dis**





## **Encapsulated VEGF-secreting cells enhance proliferation of neuronal progenitors in the hippocampus of APP/Ps1 mice**

Desiree Antequera<sup>1,2</sup>, Aitziber Portero<sup>3,4</sup>, Marta Bolos<sup>1,2</sup>, Gorka Orive<sup>3,4</sup>, Rosa M<sup>a</sup> Hernández<sup>3,4</sup>, José Luis Pedraz<sup>3,4</sup>, Eva Carro<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Neuroscience Group, Instituto de Investigacion Hospital 12 de Octubre (i+12), Madrid, Spain*

<sup>2</sup>*Biomedical Research Networking Center in Neurodegenerative Diseases (CIBERNED), Madrid, Spain*

<sup>3</sup>*NanoBioCel Group, Laboratory of Pharmaceutics, University of the Basque Country, School of Pharmacy, Vitoria, Spain*

<sup>4</sup>*Biomedical Research Networking Center in Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Vitoria, Spain*

**Abstract**

Vascular endothelial growth factor (VEGF) promotes neurogenesis in the adult hippocampus, but the way in which this process occurs in the Alzheimer's disease (AD) brain is still unknown. We examined the proliferation of neuronal precursors with an *ex vivo* approach, using encapsulated VEGF secreting cells, in APP/Ps1 mice, a mouse model of AD. Overexpression of VEGF and VEGF receptor flk-1 was observed in the cerebral cortex from VEGF microcapsules-treated APP/Ps1 mice at 1, 3 and 6 months after VEGF-microcapsule implantation. Stereological counting of 5-bromodeoxyuridine positive cells revealed that encapsulated VEGF secreting cells significantly enhanced cellular proliferation in the hippocampal dentate gyrus (DG). The number of neuronal precursors in VEGF microcapsules-treated APP/Ps1 mice was also greater, and this effect remains after 6 months. We also confirmed that encapsulated VEGF secreting cells also stimulated angiogenesis in the cerebral cortex and hippocampal DG. In addition, we found that VEGF-microcapsule treatment was associated with a depressed expression of acetylcholinesterase in the hippocampus of APP/Ps1 mice, a similar pattern as first-line medications for the treatment of AD. We conclude that stereologically-implanted VEGF-microcapsules exert an acute and long-standing neurotrophic effects, and could be utilized to improve potential therapies to control the progression of AD.

## 1-Introduction

Alzheimer's disease (AD), the most common adult-onset dementia, is a progressive degenerative disease associated with dysfunction and eventual death of brain neurons [1]. Increased brain  $\beta$ -amyloid peptide ( $A\beta$ ) levels and/or  $A\beta$  plaques may be the primary influence resulting in neuronal degeneration in AD [2], and impaired synaptic plasticity in the hippocampus of AD model mice [3]. The hippocampus is unique in continuing to produce new neurons throughout life in the structures affected by AD [4]. Neurogenesis has been recently reported in brain areas such as the piriform cortex, corpus callosum, hypothalamus [5]. During adult life, neurogenesis continues in several restricted brain regions, including the rostral subventricular zone and the subgranular zone of the hippocampal dentate gyrus (DG) [6]. In the DG, new granule cells contribute to the maintenance of hippocampal functions, including mood regulation, learning, and memory [7,8]. Enriched environment, exercise, and pharmacological compounds affect adult neurogenesis and may restore functions in neurodegenerative diseases, including AD [9-13]. Targeting neuronal regeneration in the hippocampus may be a potential therapy to delay or reverse the progression of AD. In addition to other growth factors, including insulin-like growth factor I (IGF-I) [14] or erythropoietin [15], vascular endothelial growth factor (VEGF), an angiogenic protein, promotes neurogenesis in the adult brain [16-19].

However, little is known about VEGF-induced hippocampal neurogenesis in AD.

Engraftment of genetically modified cells has proved to be an excellent approach to provide various growth factors [20-22]. An early study using *ex vivo* VEGF delivery by neural stem cells revealed its capability to stimulate cell proliferation [23]. Very recently, we have demonstrated that implantation of encapsulated VEGF-secreting cells in adult amyloid precursor protein/presenilin-1 (APP/Ps1) mice reduces total brain  $A\beta$  load, and ameliorates other AD-related disturbances, such as apoptotic cell death in the cerebral cortex, Hpf-tau, and behavioral impairment [24]. Because these evidences showed that VEGF improves neurological recovery given 3 months, we decide to investigate the time-course of response during the treatment (1-6 months after implantation). To explore the possibility that implantation of VEGF microcapsules works as angiogenic as well as neurogenic therapy, we examined its effects in APP/Ps1 mice, a mouse model of AD characterized by altered neurogenesis [25]. In the present study, we investigated the impact of encapsulated VEGF-secreting cells on cell proliferation and differentiation in the DG by using the cell-proliferation marker 5-bromodeoxyuridine (BdrU). We also confirmed long-term angiogenic effects of encapsulated VEGF-secreting cells in cerebral cortex and hippocampal DG.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. VEGF-secreting cell microcapsules

Cell microencapsulation was processed as previously described [24]. Briefly, baby hamster kidney (BHK) fibroblast cells, transfected to produce human VEGF, were grown in Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2% L-glutamine and 1% antibiotic-antimycotic, and maintained in culture at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub>/95% air atmosphere. To produce the capsules, VEGF-secreting cells ( $5 \times 10^6$  cells/mL) were suspended in a 1.5% (w/v) alginate solution. This suspension was extruded into a 55 mM calcium chloride solution in order to obtain alginate microbeads. The latter were coated with poly-L-lysine 0.05% (w/v) for 5 minutes, and with an additional alginate layer (0.1% v/w) for 5 min. Non-transfected BHK cell microcapsules were implanted in the corresponding control groups.

### 2.2. Animals and surgical procedures

A total of 37 six-month-old double-transgenic amyloid precursor protein/presenilin-1 (APP/Ps1) mice, a cross of the Tg2576 (overexpressing human APP695) and mutant PS1 (M146L) mice from our in-house colony (Research Institute Hospital 12 de Octubre) were used. Animal handling and surgical protocols followed the regulations set by Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986. Implantation surgery was performed as previously described [24]. After

anesthetization, a craniotomy was performed in each brain hemisphere [brain coordinates (from bregma): 0.6 mm posterior and 1.1 mm lateral]. In mice receiving microcapsule implants, the dura mater was excised, and 20 to 30 microcapsules were placed in the craniotomy, resulting in a bed of alginate microcapsules directly overlying the cerebral cortex. A small piece of surgical cellulose was placed over the microcapsules before suturing. APP/Ps1 mice receiving microencapsulated BHK cells non-transfected to release VEGF were used as control group. Experimental analysis was evaluated 1, 3 and 6 months after microcapsule implantation. Cellular proliferation was examined using BrdU (Sigma, St Louis, MO). All APP/Ps1 mice were intraperitoneally injected with BrdU (50 mg/kg) for 7 days, and killed 24 hours after the last injection of BrdU. Animals were transcardially perfused either with saline buffer for biochemical analysis, or 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB), pH 7.4, for immunohistochemical analysis.

### 2.3 Cell cultures.

Cortical and hippocampal neuronal cell cultures were obtained from Wistar rat embryos of 17 days of gestation, as previously described [24]. Cultures were kept at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> for seven days prior to experimentation. Then, neuronal cell cultures were treated for 48 hours with A $\beta$ <sub>42</sub> (5  $\mu$ g/ml; AnaSpec, Inc.), and 20 to 30 VEGF microcapsules.

#### 2.4. Immunoblotting

Western blot membranes were reblotted with unrelated proteins, to be used as internal standards and to normalize for protein load. Densitometric analysis was performed using Image J software (NIH). Antibodies used included: mouse monoclonal anti-VEGF (R&D), rabbit polyclonal anti-Flk-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), rabbit polyclonal anti-AChE (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), mouse monoclonal anti- $\beta$ -actin (Sigma, St Louis, MO). Secondary antibodies used were: goat anti-mouse HRP-conjugated (Biorad Laboratories), and goat anti-rabbit HRP-conjugated (Biorad Laboratories).

#### 2.5. Immunocytochemistry

Neurons that were cultured on coverslips were fixed for 30 minutes in cold 2% paraformaldehyde, washed three times in 0.1M PB containing 0.5% Triton X-100, blocked in PB containing 0.5% bovine serum albumin (BSA), and incubated overnight with primary antibodies at 4°C. All primary antibodies were diluted in PB 0.1M containing 0.5% BSA and 0.5% Triton X-100.

Fixed brains were cut on a vibratome (Leica) at 50  $\mu$ m, collected in cold PB 0.1 M, and incubated overnight with primary antibodies at 4°C. All primary antibodies were diluted in PB 0.1 M containing 0.5% BSA and 0.5% Triton X-100. Sections were blocked by incubating for 15 minutes in a solution with 10% methanol and 3% hydrogen peroxide. For BrdU immunohistochemistry, DNA was denatured by incubating tissue sections for 30 minutes in 2N HCl for at room temperature. Primary antibodies used were: mouse monoclonal anti-VEGF (R&D), mouse monoclonal anti-BrdU (Hybridoma Bank, Iowa City, IA), rabbit polyclonal anti-Flk-1 (Santa Cruz

Biotechnology, Inc.), rabbit polyclonal anti-calbindin (Swant, Bellinzona), goat polyclonal anti-doublecortin (DCX, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), rabbit polyclonal anti-calretinin (Swant, Bellinzona), and rabbit polyclonal anti-AChE (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Secondary antibodies used were: donkey anti-mouse IgG 488 (FluoProbes®, Interchim), donkey anti-goat IgG 488 (FluoProbes®, Interchim), and Texas Red goat anti-rabbit IgG antibody (Jackson Immunoresearch, West Grove). In addition, one series of sections was used for double-labeling experiments using DAPI nuclear staining (Sigma, St Louis, MO) and DCX. Images were captured using a Zeiss LSM 510 Meta scanning laser confocal microscope (Leica Microsystems). For single BrdU immunohistochemistry, all sections were processed with avidin-biotinylated horseradish peroxidase complex (Vector ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA), and the reaction was visualized using diaminobenzidine (DAB) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) as the chromogen. Endothelial cells were staining with rodamine-labeled tomato lectin (Vector Laboratories). The specificity of the staining was tested by omitting primary antibodies from the incubation solution.

#### 2.6. Stereological cell counts

Morphometrical analyses were performed as described [25]. The number of BrdU<sup>+</sup> cells in the hippocampus stained by single-labeling immunohistochemistry was counted under a light microscopy (Zeiss microscope; Carl Zeiss Microimaging, GmbH) at a magnification of 40X. Based on modified stereological analysis [14], a one-six series of sections (from rostral extreme from bregma 2 mm, to the caudal end, from bregma - 4.3 mm) were counted.

The same areas and number of sections were studied for all animals and all the experimental groups. To determine the phenotypes adopted by new-proliferating cells, double immunohistochemistry was performed in adjacent sections in a one-six series of every animal. Those BrdU<sup>+</sup> nuclei with colocalization of lectin in the cytoplasm or calretinin in the nuclei, along the successive planes of the z-axis, were considered as vessel or neurons, respectively.

### *2.7. Statistical analysis*

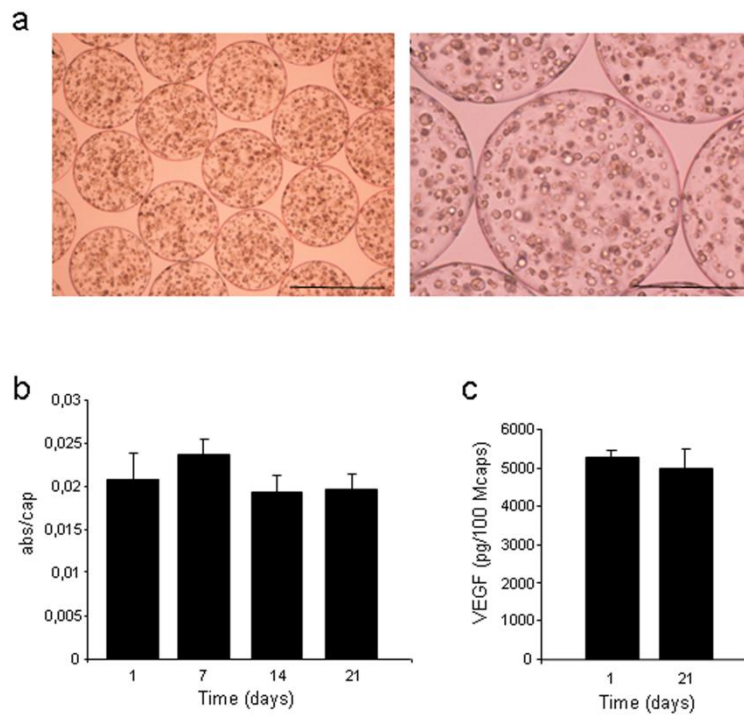
Results are shown as means  $\pm$  SEM. Data were analyzed with SPSS for Windows (version 15.0). One-way ANOVA followed by *post hoc* Student's *t* test was used for comparing multiple groups.

**3. Results**

**3.1. VEGF delivery from encapsulated VEGF-secreting cells**

All microcapsules presented an spherical and uniform shape with a mean diameter (mean diameter  $449 \pm 14\mu\text{m}$ ), showing

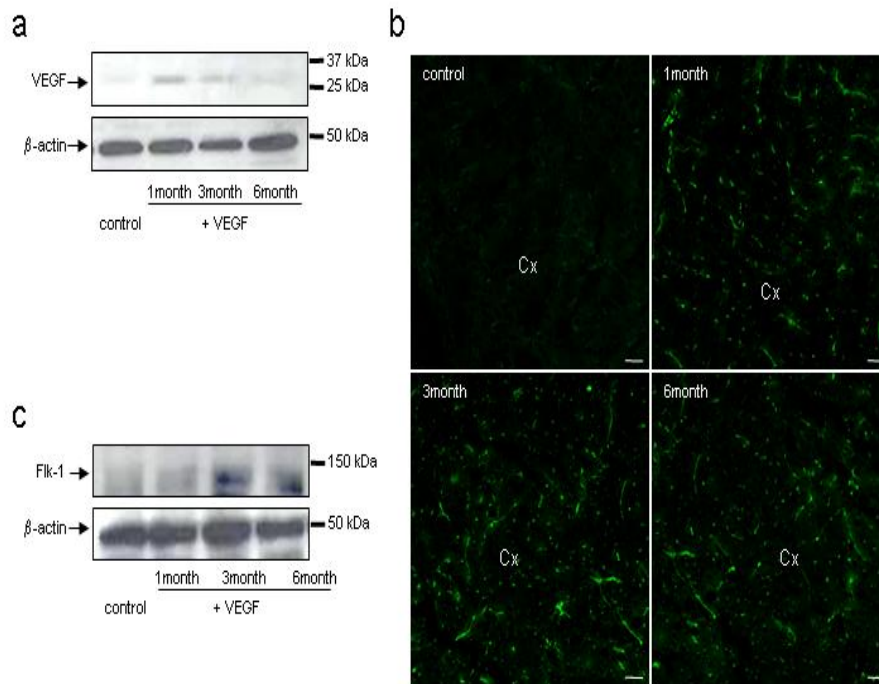
mainly live cells (Fig. S1a). Cell viability (Fig. S1b), and VEGF expression (Fig. S1c) were maintained stable during the 21 days of the *in vitro* study.



**Figure S1.** VEGF-secreting encapsulated cells. **(a)** VEGF-secreting fibroblasts are immobilized within alginate-poly-L-lysine-alginate microcapsules. Phase contrast images at x4 (left image) and x10 (right image) magnifications, obtained with a bright field microscope. Scale bars=450 μm (left image) and 200 μm (right image). **(b)** Viability of VEGF microcapsules-secreting fibroblasts for up to 21 days *in vitro*. **(c)** VEGF production from microencapsulated VEGF-secreting fibroblasts. (Data are expressed as mean ± SD).

In agreement with our recent study [24], human VEGF expression was detected in cerebral cortex from VEGF microcapsules-treated APP/Ps1 mice, whereas it was absent in non-transfected cell microcapsules-treated APP/Ps1 mice, as determined by western blot (Fig. 1a). Cranial implantation of VEGF microcapsules mainly upregulated the expression of VEGF at 1 and 3 months after, and was still detected at 6 months post-implantation (Fig. 1a). These data were also

confirmed by immunofluorescence assay using a specific antibody against human VEGF, and the pattern of VEGF expression was mainly associated with brain capillaries (Fig. 1b). These last findings corroborate those observed in our previous study [24]. Concomitantly, immunoblot analysis revealed that implantation of VEGF microcapsules in APP/Ps1 mice increased the expression of VEGF receptor flk-1 in the cerebral cortex (Fig. 1c).



**Figure 1.** VEGF delivery by VEGF-secreting encapsulated cells to the brain of APP/PS1 mice. (a) VEGF expression in cerebral cortex from VEGF microcapsules-treated APP/Ps1 mice were measured by western blot at 1, 3 and 6 months after implantation. A representative VEGF blot is showed. (b) Detection of VEGF (green) in vessels onto the cerebral cortex (Cx) after VEGF microcapsules implantation in APP/Ps1 mice. Note the absence of VEGF-staining in non-transfected cell microcapsules-treated APP/Ps1 mice. Scale bar = 20  $\mu$ m. (c) Western blot analysis of VEGF receptor flk-1 in cerebral cortex from VEGF microcapsules-treated APP/Ps1 mice (n = 4-7 per group).

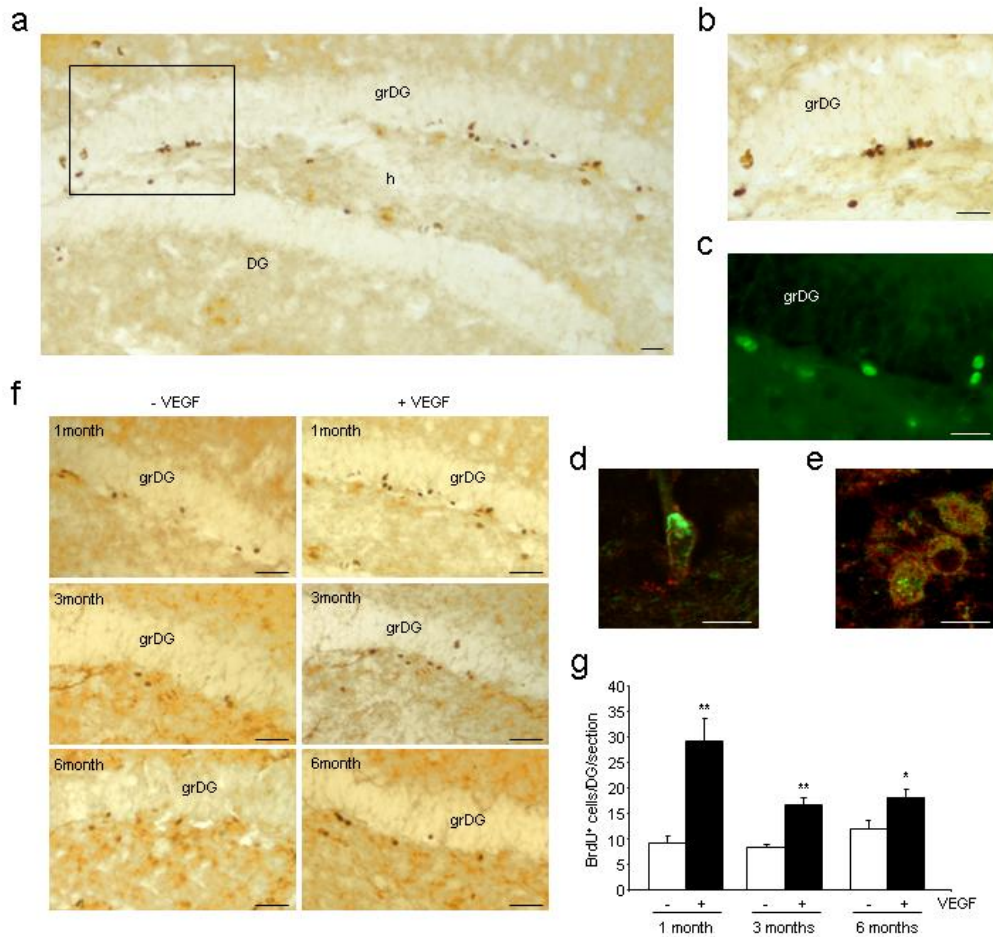


*3.2. Encapsulated VEGF-secreting cells increase proliferation of neuronal progenitors in the hippocampus of APP/Ps1 mice*

Cells incorporating BrdU were found in the hippocampus of all experimental groups. BrdU<sup>+</sup> nuclei were detected both in the granule cell layer of the DG (grDG) and in the dentate hilus in the DG of hippocampus. However, we only analyzed cells in the grDG because only sparse BrdU<sup>+</sup> nuclei could be found in the dentate hilus (Figs. 2a-c). The great majority of positive nuclei were found in the inner part of the grDG. Distribution of BrdU<sup>+</sup> cells was similar in all groups. To determine whether BrdU<sup>+</sup> cells can directly respond to VEGF, we labeled them with the anti-VEGF receptor antibody flk-1, and found that BrdU<sup>+</sup> cells located in the hippocampus express VEGF receptor (Fig. 2d). To verify

the identity of flk-1 immunoreactivity cells in the hippocampus, we performed double immunohistochemistry using an antibody against calbindin, a neuronal marker [26], in combination with the flk-1 antibody. As expected [27], most calbindin<sup>+</sup> cells were also flk-1 immunoreactive (Fig. 2e). This is consistent with VEGF receptor flk-1 expression in granule cells and pyramidal cells in the hippocampus [28].

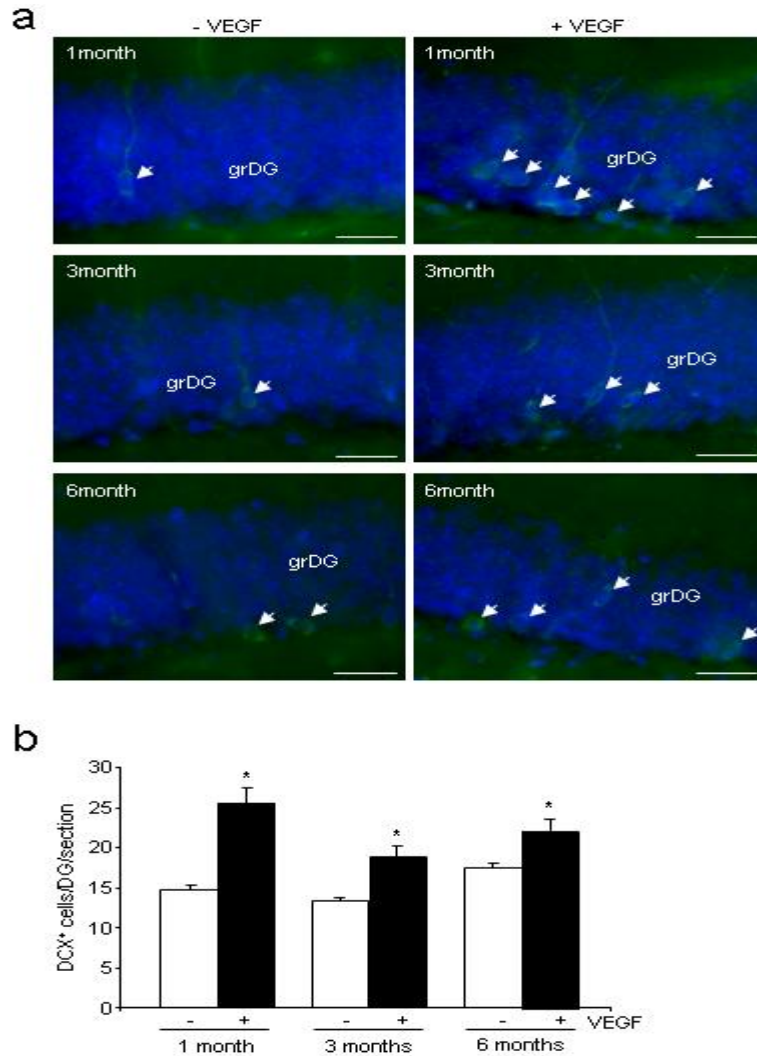
The number of BrdU<sup>+</sup> nuclei in the DG of hippocampus was significantly higher in APP/Ps1 mice after VEGF microcapsule implantation than in control mice (Fig. 2f). As shown in Figure 2g, these differences were observed both after 1 and 3 months ( $p < 0.01$ ) as well as 6 months after VEGF microcapsule implantation in APP/Ps1 mice ( $p < 0.05$ ).



**Figure 2.** Characterization of BrdU-labeled cells in the hippocampal granule cell layer of APP/Ps1 mice. **(a)** Typical BrdU<sup>+</sup> cells in the DG of an adult APP/Ps1 hippocampus, as revealed with DAB. **(b)** Higher magnification of the area marked in A to show BrdU<sup>+</sup> nuclei in greater detail using DAB, and **(c)** fluorescence staining. **(d)** BrdU<sup>+</sup> cell (green nucleus) within the granule cell layer also shows VEGF receptor flk-1 labeling (red signal surrounding the nucleus). **(e)** Double immunostaining with flk-1 (green) and calbindin (red) antibodies show that most hippocampal neurons are flk-1<sup>+</sup> cells. **(f)** Representative BrdU<sup>+</sup> nuclei in the hippocampus of VEGF microcapsules-treated and non-transfected cell microcapsules-treated APP/Ps1 mice for 1, 3 and 6 months. Note that the number of BrdU<sup>+</sup> nuclei is notably higher after VEGF microcapsules implantation. Scale bar = 20  $\mu$ m. **(g)** The histogram indicates that the number of BrdU<sup>+</sup> nuclei in each experimental group. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ,  $n = 4-7$  per group. h, hilus; grDG, granular layer of DG; DG, dentate gyrus. Scale bar = 20  $\mu$ m.

Cell proliferation in the hippocampus of VEGF microcapsules-treated APP/Ps1 mice were also labeled by DCX staining. Representative photomicrographs of DCX staining are shown in Figure 3a. The number

of DCX<sup>+</sup> cells in the DG of hippocampus was significantly higher in VEGF microcapsules-treated APP/Ps1 mice than in non-transfected cell microcapsules-treated APP/Ps1 mice ( $p < 0.05$ , Fig. 3b).

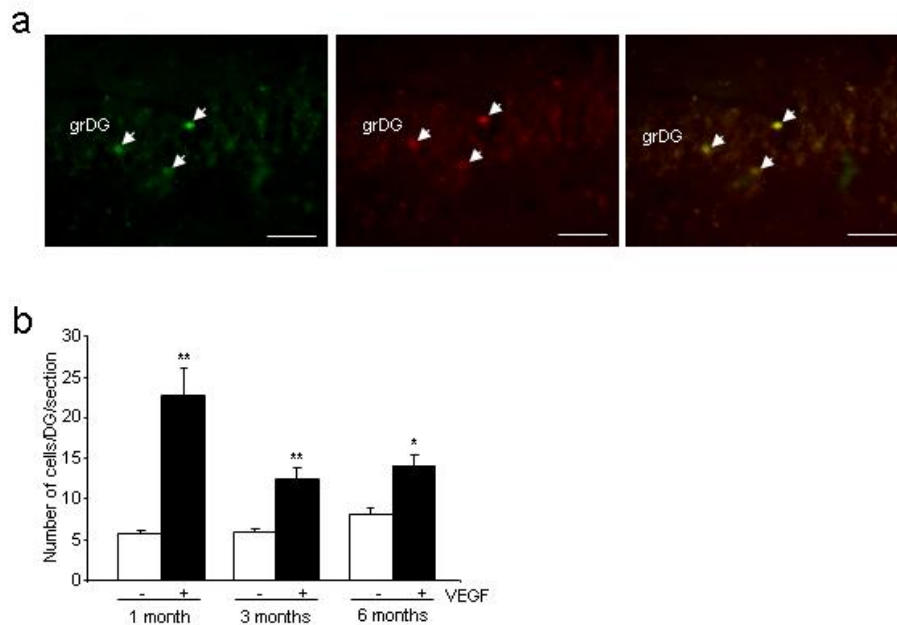


**Figure 3.** Doublecortin expression in the hippocampal granule cell layer of APP/Ps1 mice. (a) Representative photomicrographs of DCX staining in VEGF microcapsules-treated and non-transfected cell microcapsules-treated APP/Ps1 mice for 1, 3 and 6 months. The arrows indicate DCX<sup>+</sup> cells in the granular layer of DG (grDG). Scale bar = 20  $\mu$ m. (b) Number of DCX<sup>+</sup> cells in the hippocampus is increased after VEGF microcapsules implantation. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, \*  $p < 0.05$ , n = 4-7 per group.

To ascertain whether encapsulated VEGF-secreting cells induced the incorporation of BrdU into neurons, brain sections from VEGF microcapsules-treated and non-transfected cell microcapsules-treated APP/Ps1 mice were processed for double-label immunohistochemistry with antibodies against BrdU and calretinin, a neuronal marker.

Cells that incorporated BrdU after VEGF microcapsule implantation included calretinin-expressing neurons of DG of

hippocampus (Fig. 4a). The number of existing hippocampal BrdU<sup>+</sup> cells differentiating into neurons (BrdU / calretinin double-positive cells) was significantly higher in VEGF microcapsules-treated APP/Ps1 mice than in the respective control groups (Fig. 4b). These data strongly suggest that the encapsulated VEGF-secreting cells induced proliferation of cells in the DG, many of which differentiated into neurons that could integrate into the granular layer.



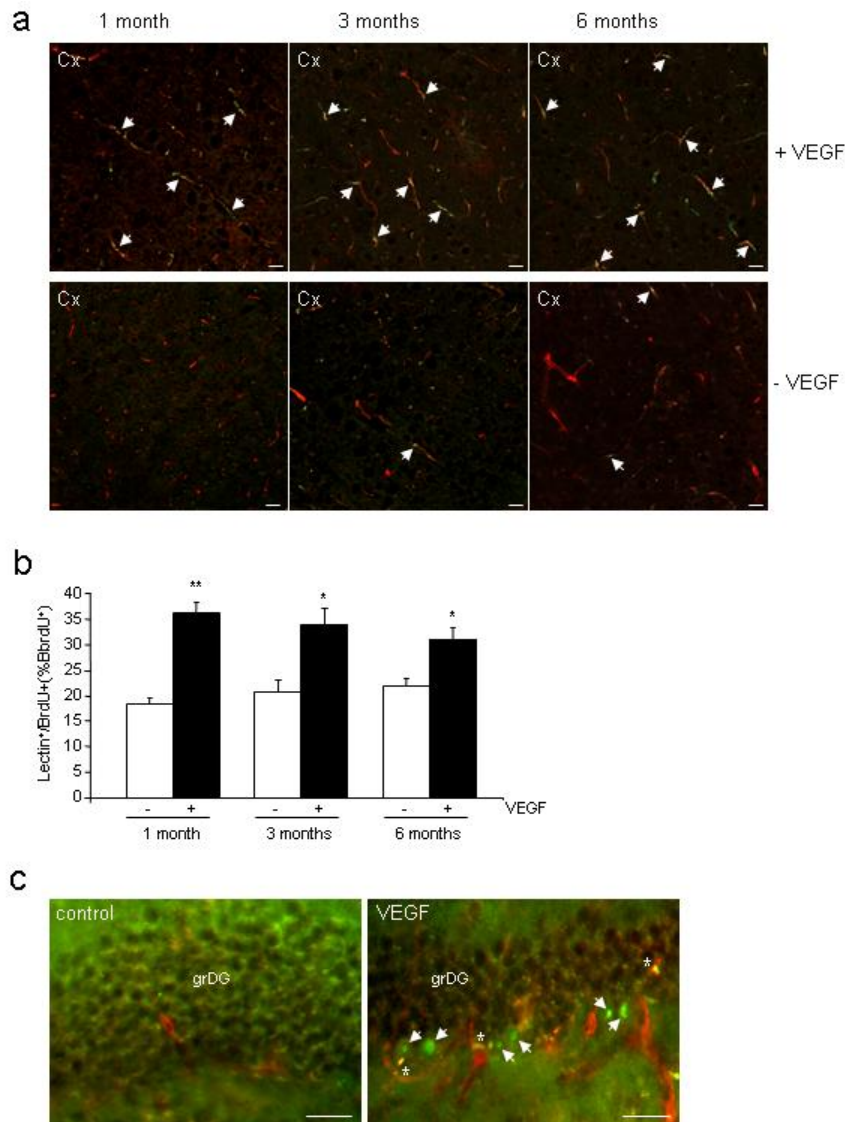
**Figure 4.** Photomicrographs of neural markers in the hippocampal granule cell layer of APP/Ps1 mice. **(a)** Representative photomicrographs of BrdU (green), calretinin (red) and their coexpression in the granular cell layer of DG (grDG) of VEGF microcapsules-treated APP/Ps1 mouse hippocampus. Scale bar = 20  $\mu$ m. **(b)** Number of existing hippocampal BrdU<sup>+</sup> cells and BrdU + calretinin double-positive cells in VEGF microcapsules-treated and non-transfected cell microcapsules-treated APP/Ps1 mice. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, \* $p$ <0.05, \*\*  $p$ <0.01,  $n$  = 4-7 per group.

### *3.3. Encapsulated VEGF-secreting cells enhances angiogenesis in APP/Ps1 mice*

We determined the extent of angiogenesis 1, 3 and 6 months after VEGF microcapsule implantation in APP/Ps1 mice. BrdU<sup>+</sup> cells in the brain of these mice exhibited endothelial traits (tomato lectin<sup>+</sup>) (Fig. 5a). Accordingly with our previous study [24], encapsulated VEGF-secreting cells stimulate angiogenesis in the cerebral cortex 1 and 3 months post-implantation, but this effect was also maintained until 6 months (Fig. 5a). As shown in Figure 5b, the total number of BrdU<sup>+</sup> cells associated with the endothelial

marker lectin increased in response to VEGF microcapsule implantation.

To evaluate the effect of VEGF on angiogenesis in neuroproliferative zones, endothelial cell growth was also determined in the hippocampus, but no significant increases in total vessel density were seen (data not shown), accordingly with our previous study [24]. However, VEGF microcapsules-induced angiogenic effect was specifically observed in the DG of hippocampus. Implantation of VEGF microcapsule increased lectin staining in the DG in the vicinity of BrdU<sup>+</sup> cells (Fig. 5c).

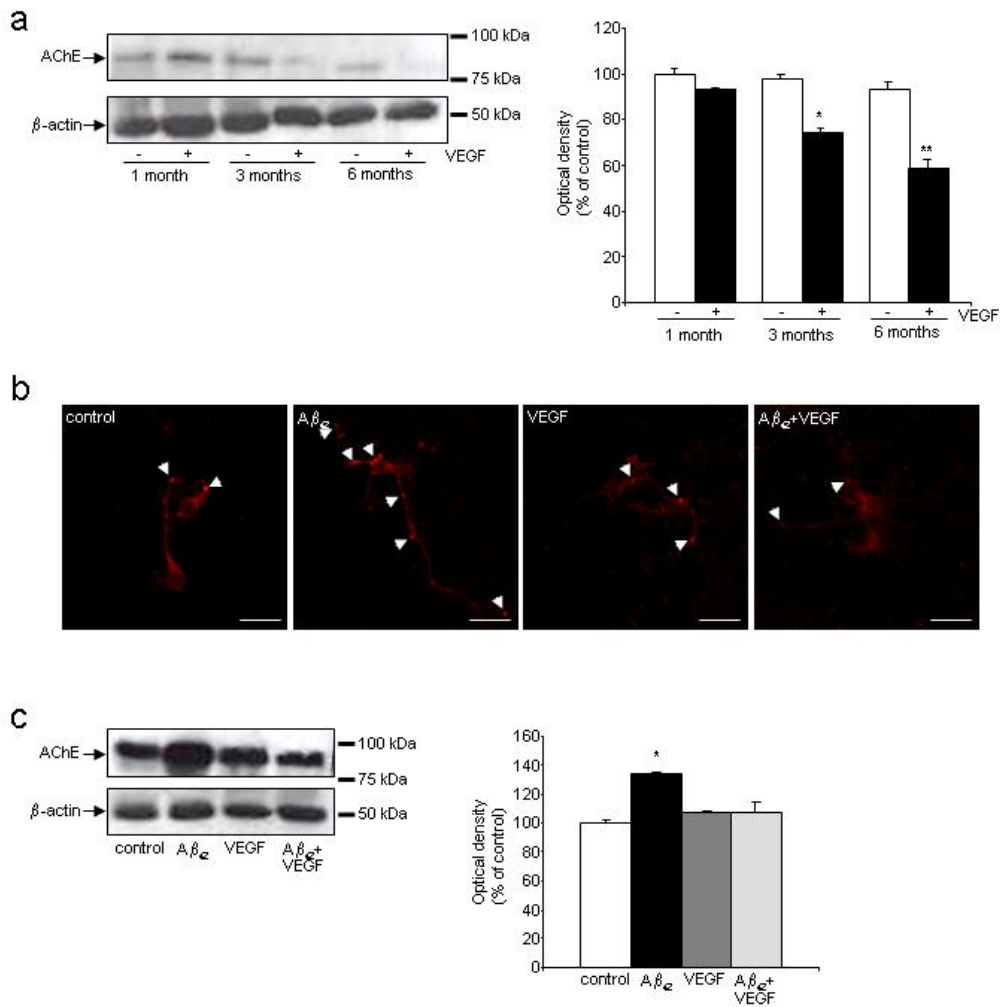


**Figure 5.** Brain angiogenesis in APP/Ps1 mice after implantation of VEGF microcapsules. **(a)** Implantation of VEGF microcapsules induces proliferation of endothelial cells in the cerebral cortex (Cx) from APP/Ps1 mice. Immunofluorescence of newly formed brain vessels (white arrows) with BrdUrd<sup>+</sup> nuclei (green) co-labeled with tomato lectin in the cytoplasm (red). Scale bars = 20  $\mu$ m. **(b)** The histograms indicate that the number of double-labeled BrdUrd<sup>+</sup>/lectin<sup>+</sup> cells significantly increased in VEGF microcapsule-treated APP/Ps1 mice. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ,  $n = 4-7$  per group. **(c)** Fluorescent labeled microphotographs show enhanced double-labeled BrdUrd<sup>+</sup>/lectin<sup>+</sup> cells indicating newly formed brain vessels (white asterisks), and BrdUrd<sup>+</sup> nuclei (white arrows) in the granular cell layer of DG (grDG) in VEGF microcapsules-treated APP/Ps1 mice. Scale bar = 20  $\mu$ m.

#### *3.4. Encapsulated VEGF-secreting cells modulates AChE expression*

Accumulated evidence suggests that the enzyme acetylcholinesterase (AChE) plays a critical role in the regulation of the cytoarchitecture of developing and differentiation of neuronal cells [29-31]. To further study the role of AChE and to address the inter-relationship among AChE expression levels and neuronal proliferation, we measured protein levels of AChE by Western blot in hippocampal samples of VEGF microcapsules-treated APP/Ps1 mice. AChE levels declined after VEGF treatment in APP/Ps1 mice, being statistically significant 3 ( $p < 0.05$ ), and 6 months ( $p < 0.01$ ) after VEGF microcapsule implantation (Fig. 6a).

The cellular distribution pattern of AChE in hippocampal neuronal culture was assessed using immunocytochemistry. Under our culture conditions, AChE immunoreactivity was detected in the majority of hippocampal neurons. AChE protein appeared in the perikarya and dendritic neuritis of neurons, and a high-density staining was particularly found in dendritic growth cones (Fig. 6b). We observed that AChE immunoreactivity increased drastically after  $A\beta_{42}$  treatment for 48 hours. However, when neuronal cell culture was simultaneously treated with  $A\beta_{42}$  and VEGF microcapsules, AChE expression was reduced and similar than that observed in control cultures (Fig. 6b). These findings were also confirmed using Western blot (Fig. 6c).



**Figure 6.** Progressive decline of AChE expression after VEGF microcapsules treatment. **(a)** AChE expression in hippocampal lysates from VEGF microcapsules-treated APP/PS1 mice were measured by western blot at 1, 3 and 6 months after implantation. A representative AChE blot and densitometry histograms are showed. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, \* $p$ <0.05, \*\*  $p$ <0.01,  $n$  = 4-7 per group. **(b)** Confocal microscopic pictures show neurons that are immunostained for AChE. Note that the high immunoreactivity of AChE in the dendrites and growth cones (as indicated by arrows) after A $\beta_{42}$  treatment, and is lower in VEGF microcapsules-treated culture. Scale bar = 20  $\mu$ m. **(c)** A representative AChE blot from the total cell lysate of hippocampal neuronal culture treated with A $\beta_{42}$  and VEGF microcapsules for 48 hours, and the densitometry histogram are shown. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, \* $p$ <0.05,  $n$  = 3 per group.



#### 4. Discussion

The major finding of this study is that the implantation of encapsulated VEGF secreting cells in a mouse model of AD, APP/Ps1 mice enhances proliferation of neuronal progenitors in the hippocampus. Of particular note, these effects were observed with long-term administration, which was maintained for 1, 3 and 6 months. This regimen was adopted because a previous study showed that implantation of VEGF microcapsules in APP/Ps1 mice during 3 months reduces total brain A $\beta$  load, ameliorates apoptotic cell death and behavioral impairment, and these effects were accompanied by increased angiogenesis in cerebral cortex [24].

Generating new neurons is a multistep process that includes proliferation, fate choice, migration, survival, and differentiation. Recently, some factors classically known for their effects on the vascular system have been found to influence different steps of adult neurogenesis [32]. VEGF, identified originally as an angiogenic and vascular permeability factor, and more recently as a neurotrophic and neuroprotective factor [33,34], can also stimulate neurogenesis in rodents [16,18], but also in a variety of neurologic disorders including focal cerebral ischemia [17], and traumatic brain injury [19]. In the present study, we investigated whether implantation of encapsulated VEGF-secreting cells directly onto the cerebral cortex of APP/Ps1 mice would induce brain neurogenesis and angiogenesis in a time-dependent manner. We confirmed stable VEGF expression in our experimental model. As expected, implantation of VEGF microcapsules elevated the level of VEGF in the cerebral cortex from APP/Ps1 mice all through 6 months after surgery. Furthermore, the VEGF receptor flk-1, which plays a major role in proliferation, angiogenesis, and neuroprotection [16,35,36] was enhanced by

VEGF microcapsules grafts. These findings indicate that our experimental approach using encapsulated VEGF-secreting cells ensured a stable and effective increase of the VEGF concentration in the cerebral cortex.

Palmer et al. [37] first proposed a role for VEGF in neurogenesis showing that in the DG new neurons were often observed in the vicinity of blood vessels. The ability of VEGF to stimulate the proliferation of neuronal precursors may be of interest in the context of neurodegenerative diseases, including AD. Neurogenesis occurs in the adult brain throughout life [11], and can be further stimulated by neuropathological states. Neurogenesis may be a natural defense strategy against neurodegeneration in AD. Although neurogenesis was increased in the hippocampus of the AD transgenic APP/Ps1 mouse model [25], the pathological change still worsened and memory impairment could not be reversed over time. This may be due to the amount of increased neurogenesis is not being sufficiently large to compensate for the progressive pathological changes in the AD brain. Therefore, up-regulating neurogenesis in the AD brain, as a potential therapeutic strategy for AD treatment, has been the main objective of our study.

Our data show that encapsulated VEGF secreting cells increase the number of BrdU<sup>+</sup> hippocampal granule cells, measured by an injection protocol to label newborn cells on short-term survival (1 day). This agrees comes along with previous findings indicating a proliferative effects of VEGF on the number of new hippocampal neurons in neuroproliferative zones of intact and ischemic rat brain [16,17]. BrdU<sup>+</sup> cells in the granule zone of hippocampal DG express VEGF receptors, which suggest that VEGF delivery from implanted VEGF microcapsules can directly affect them. In addition, immature neuronal cells in culture express VEGF receptor flk-1

and proliferate in presence of VEGF [16]. VEGF also promotes proliferation of neuronal precursor cells *in vitro* and *in vivo* [38]. Using DCX immunohistochemistry as a marker for neuronal progenitor cells [39,40], we found a significant increase the entire population of DCX<sup>+</sup> cells in all groups of VEGF microcapsules-treated APP/PS1 mice. In addition, and to characterize the neuronal phenotype of these new cells, calretinin immunohistochemistry, firmly established marker [41,42], was used to corroborate results about hippocampal proliferation of neuronal progenitors shown by DCX.

However, further studies will be necessary to elucidate whether encapsulated VEGF secreting cells not only stimulates the proliferation of neuronal precursors in the hippocampus of APP/PS1 mice, but also promotes the survival of proliferating cells of neuronal lineage, consistent with the neurotrophic effects of VEGF demonstrated previously in other systems [17,24,25]. In this regard, we found that VEGF reduced A $\beta$ -induced neuronal death *in vitro* and that this involved activation of PI3K signaling and decreased activation of caspase-3 [24]. Thus, VEGF may modulate survival of these neuronal precursors.

The timing and distribution of VEGF expression correlate with angiogenesis in the VEGF microcapsules-treated APP/Ps1 mice, as manifested by an increase in new vessel formation in the cerebral cortex. These results are in accordance with our previous studies demonstrating an increase in angiogenesis in the cerebral cortex of C57BL/6 and APP/PS1 mice [24]. The data here indicate that both proliferative effects (angiogenesis and neurogenesis) occur for long time (6 months). These findings are especially interested in order to provide a continuous and effective delivery of VEGF by implanted VEGF microcapsules. Furthermore, an increase in vessel sprouting

induced by VEGF was shown around BrdU<sup>+</sup> cells in DG in VEGF microcapsules-treated APP/PS1 mice. This finding is in agreement with the extensively proposed relationship between angiogenesis and neurogenesis [16,37,43]. Our data argues that angiogenesis may be required for the neuroproliferative response to implanted VEGF microcapsules in this hippocampal region. We suggest that these proliferative effects of VEGF delivery from our experimental model by implanted VEGF microcapsules, in addition with neuroprotection actions on A $\beta$ -induced toxicity [24], play a major role in enhanced tissue repair.

On the other hand, the enzyme acetylcholinesterase (AChE) is involved in progenitor cell proliferation and differentiation [29,44]. AChE is highly expressed in newly born, migrating, and poorly differentiated neurons [45]. AChE overexpression would also be physiologically beneficial early on in neurogenesis, by promoting physical connectivity, but a deleterious effect in the final stages, when functional connectivity may be hampered by mitigating ACh-induced synaptogenesis. Indeed, AChE overexpression may affect cell death and neurodegeneration directly. AChE has previously been directly implicated in cell death [46,47], and its overexpression has been associated with disrupted synaptogenesis in embryonic hippocampal neurons [48,49]. In relation to this issue, the progressive loss of dendritic spines and arborizations in cortical neurons in AChE-overexpressing transgenic mice [50] also indicates that excessive AChE is detrimental to neuronal structures. Thus, we suggest that reduction of A $\beta$ -induced AChE overexpression might contribute to diminish neuropathological processes by mitigating cell death and promoting neurogenesis. Supporting this hypothesis, we observed a decrease in AChE expression in VEGF

microcapsules-treated APP/PS1 mice, which may be associated with the increased neuronal progenitor proliferation.

In summary, we showed a successful delivery of VEGF by encapsulated VEGF secreting cells implanted in the brain of APP/Ps1 mice. VEGF overexpressing from VEGF microcapsules exert an unreported effect on proliferative neuronal progenitors, and acetylcholinesterase expression in the hippocampus of APP/Ps1 mice. The present findings provide a possible mechanism whereby VEGF modulate the number of newborn hippocampal neurons as a natural protection approach against neurodegeneration in AD. We suggest that modulation of neurogenesis by this microencapsulation model may be used as therapeutic potential for AD treatment.

#### Acknowledgements

This work was supported by grants from *Fondo de Investigación Sanitaria* (FIS) (PI060155), *Fundación Investigación Médica Mutua Madrileña* (2006.125, 2008.93), and *CIBERNED*. We also acknowledge the support from *Ministerio de Ciencia e Innovación* (SAF 2008-03157). We thank Ximena Alvira-Botero, MD, PhD, for the careful revision of this manuscript.

There are no actual or potential conflicts of interest with other people or organizations.

#### References

- [1] Price DL. New perspectives on Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* 1986;9:489-512.
- [2] Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002;97:53-356.
- [3] Chapman PF, White GL, Jones MW, Cooper-Blacketer D, Marshall VJ, Irizarry M, et al. Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *Nat Neurosci* 1999;2:271-276.
- [4] Verret L, Jankowsky JL, Xu GM, Borchelt DR, Rampon C. Alzheimer's-type amyloidosis in transgenic mice impairs survival of newborn neurons derived from adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci* 2007;27:6771-6780.
- [5] Zhang J, Giesert F, Kloos K, Vogt Weisenhorn DM, Aigner L, Wurst W, et al. A powerful transgenic tool for fate mapping and functional analysis of newly generated neurons. *BMC Neurosci* 2010;11:158.
- [6] Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998; 4: 1313-1317.
- [7] Shors TJ. From stem cells to grandmother cells: how neurogenesis relates to learning and memory. *Cell Stem Cell* 2008;3: 253-258.
- [8] Zhao C, Teng EM, Summers RG, Jr., Ming GL, Gage FH. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 2006; 26:3-11.
- [9] van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:13427-13431.
- [10] Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 2003;301:805-809.
- [11] Lie DC, Song H, Colamarino SA, Ming GL, Gage FH. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:399-421.
- [12] Kuhn HG, Cooper-Kuhn CM, Boekhoorn K, Lucassen PJ. Changes in neurogenesis in dementia and Alzheimer mouse models: are they functionally relevant?. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2007;257:281-289.
- [13] Abdipranoto A, Wu S, Stayte S, Vissel B. The role of neurogenesis in neurodegenerative diseases and its implications for therapeutic development. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2008;7:187-210.

- [14] Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I. Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci* 2001;21:1628-1634.
- [15] Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci* 2001;21:9733-9743.
- [16] Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:11946-11950.
- [17] Sun Y, Jin K, Xie L, Childs J, Mao XO, Logvinova A, Greenberg DA. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest* 2003;111:1843-51.
- [18] Udo H, Yoshida Y, Kino T, Ohnuki K, Mizunoya W, Mukuda T, et al. Enhanced adult neurogenesis and angiogenesis and altered affective behaviors in mice overexpressing vascular endothelial growth factor 120. *J Neurosci* 2008;28:14522-14536.
- [19] Thau-Zuchman O, Shohami E, Alexandrovich AG, Leker RR. Vascular endothelial growth factor increases neurogenesis after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010;30:1008-1016.
- [20] Emerich DF, Lindner MD, Winn SR, Chen EY, Frydel BR, Kordower JH. Implants of encapsulated human CNTF-producing fibroblasts prevent behavioral deficits and striatal degeneration in a rodent model of Huntington's disease. *J Neurosci* 1996;16:5168-5181.
- [21] Bloch J, Bachoud-Levi AC, Deglon N, Lefaucheur JP, Winkel L, Palfi S, et al. Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease, using polymer-encapsulated cells engineered to secrete human ciliary neurotrophic factor: results of a phase I study. *Hum Gene Ther* 2004;15:968-975.
- [22] Orive G, Tam SK, Pedraz JL, Hallé JP. Biocompatibility of alginate-poly-L-lysine microcapsules for cell therapy. *Biomaterials* 2006;27:3691-3700.
- [23] Kim HM, Hwang DH, Lee JE, Kim SU, Kim BG. Ex vivo VEGF delivery by neural stem cells enhances proliferation of glial progenitors, angiogenesis, and tissue sparing after spinal cord injury. *PLoS One* 2009;4:e4987.
- [24] Spuch C, Antequera D, Portero A, Orive G, Hernandez R, Molina JL, et al. The effect of encapsulated VEGF-secreting cells on brain amyloid load and behavioral impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Biomaterials* 2010;31:5608-5618.
- [25] Yu Y, He J, Zhang Y, Luo H, Zhu S, Yang Y, et al. Increased hippocampal neurogenesis in the progressive stage of Alzheimer's disease phenotype in an APP/Ps1 double transgenic mouse model. *Hippocampus* 2009;19:1247-1253.
- [26] Baimbridge KG, Celio MR, Rogers JH. Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci* 1992;15:303-330
- [27] Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci* 1999;19:5731-5740.
- [28] Choi JS, Kim HY, Cha JH, Choi JY, Chun MH, Lee MY. Upregulation of vascular endothelial growth factor receptors Flt-1 and Flk-1 in rat hippocampus after transient forebrain ischemia. *J Neurotrauma* 2007;24:521-531.
- [29] Coleman BA, Taylor P. Regulation of acetylcholinesterase expression during neuronal differentiation. *J Biol Chem* 1996;271:4410-4416.
- [30] Grifman M, Galyam N, Seidman S, Soreq H. Functional redundancy of acetylcholinesterase and neuroigin in mammalian neuritogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13935-13940.
- [31] De Jaco A, Augusti-Tocco G, Biagioni S. Alternative acetylcholinesterase molecular forms exhibit similar ability to induce neurite outgrowth. *J Neurosci Res* 2002;70:756-765.
- [32] Zacchigna S, Lambrechts D, Carmeliet P. Neurovascular signalling defects in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 2008;9:169-181.

- [33] Jin KL, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:10242-10247.
- [34] Storkebaum E, Carmeliet P. VEGF: a critical player in neurodegeneration. *J Clin Invest* 2004;113:14-18.
- [35] Rosenstein JM, Krum JM. New roles for VEGF in nervous tissue--beyond blood vessels. *Exp Neurol* 2004;187:246-253.
- [36] Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-676.
- [37] Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* 2000;425:479-494.
- [38] Zhu Y, Jin K, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor promotes proliferation of cortical neuron precursors by regulating E2F expression. *FASEB J* 2003;17:186-193.
- [39] Gleeson JG, Allen KM, Fox JW, Lamperti ED, Berkovic S, Scheffer I, et al. Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell* 1998;92:63-72.
- [40] Jin K, Galvan V, Xie L, Mao XO, Gorostiza OF, Bredesen DE, et al. Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APP<sup>Sw,Ind</sup>) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:13363-13367.
- [41] Brandt MD, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G, Reuter K, Bick-Sander A, et al. Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci* 2003;24:603-613.
- [42] Kempermann G, Gast D, Kronenberg G, Yamaguchi M, Gage FH. Early determination and long-term persistence of adult-generated new neurons in the hippocampus of mice. *Development* 2003;130:391-399.
- [43] Louissaint A, Rao S, Leventhal C, Goldman SA. Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron* 2002;34:945-960.
- [44] Dori A, Cohen J, Silverman WF, Pollack Y, Soreq H. Functional manipulations of acetylcholinesterase splice variants highlight alternative splicing contributions to murine neocortical development. *Cereb Cortex* 2005;15:419-430.
- [45] Cohen JE, Zimmerman G, Melamed-Book N, Friedman A, Dori A, Soreq H. Transgenic inactivation of acetylcholinesterase impairs homeostasis in mouse hippocampal granule cells. *Hippocampus* 2008;18:182-92.
- [46] Zhang XJ, Yang L, Zhao Q, Caen JP, He HY, Jin QH, et al. Induction of acetylcholinesterase expression during apoptosis in various cell types. *Cell Death Differ* 2002;9:790-800.
- [47] Park SE, Kim ND, Yoo YH. Acetylcholinesterase plays a pivotal role in apoptosome formation. *Cancer Res* 2004;64:2652-2655.
- [48] Dong H, Xiang YY, Farchi N, Ju W, Wu Y, Chen L, et al. Excessive expression of acetylcholinesterase impairs glutamatergic synaptogenesis in hippocampal neurons. *J Neurosci* 2004;24:8950-8960.
- [49] Farchi N, Ofek K, Podoly E, Dong H, Xiang YY, Diamant S, et al. Peripheral site acetylcholinesterase blockade induces RACK1-associated neuronal remodeling. *Neurodegen Dis* 2007;4:171-184.
- [50] Beeri R, Le Novere N, Mervis R, Huberman T, Grauer E, Changeux JP, et al. Enhanced hemicholinium binding and attenuated dendrite branching in cognitively impaired acetylcholinesterase transgenic mice. *J Neurochem* 1997;69:2441-2451.



El tratamiento de las enfermedades del SNC presenta el gran inconveniente de que la sustancia terapéutica tiene que atravesar la BHE para llegar a la diana donde tiene que ejercer su efecto terapéutico.

Entre las distintas alternativas que se han evaluado para el tratamiento de las patologías relacionadas con el SNC, los factores neurotróficos y angiogénicos han demostrado ser los más eficaces pero debido a que no atraviesan la BHE<sup>156</sup> y que su semivida de eliminación es muy corta<sup>157</sup> su administración puede resultar compleja.

La administración de células encapsuladas secretoras del producto de interés terapéutico sobre la corteza cerebral se ha postulado como una alternativa interesante para la administración de sustancias terapéuticas sin que se presente la limitación del paso a través de la BHE.

El VEGF presenta funciones muy importantes a nivel cerebral, tal y como se ha comentado en la introducción, pero de entre todas ellas la más relevante es la de favorecer la formación de nuevos vasos sanguíneos.

En los últimos años, se está extendiendo cada vez más la hipótesis de que el motivo principal del Alzheimer de origen no genético, que representa más del 90% de los casos, podría estar más relacionado con una disminución del aclaramiento de los péptidos de A $\beta$  y no tanto con una sobreproducción de estos<sup>158</sup>. Por lo tanto cabe pensar que un mayor número de vasos sanguíneos a nivel cerebral podría ser beneficioso para que el exceso de péptidos de A $\beta$  pueda ser eliminado.

---

<sup>156</sup> Zhou JP, Feng ZG, Yuan BL, Yu ZS, Li Q, Qu HY, et al. Transduced PTD-BDNF fusion protein protects against beta amyloid peptide-induced learning and memory deficits in mice. *Brain Res.* 2008; 1191: 12-19.

<sup>157</sup> Wang YQ, Guo X, Qui MH, Feng XY, Sun FY. VEGF overexpression enhances striatal neurogenesis in brain of adult rat after a transient middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Res.* 2007; 85: 73-82.

<sup>158</sup> Provias J, Jeynes B. Correlation analysis of capillary APOE, VEGF and eNOS expression in Alzheimer brains. *Curr Alzheimer Res.* 2011; 8: 197-202.

En una primera etapa de este trabajo de investigación se decidió comprobar si el VEGF<sub>165</sub> humano liberado a partir de células microencapsuladas era capaz de aumentar la densidad vascular a nivel cerebral. Para ello, se administraron fibroblastos encapsulados secretores de VEGF humano sobre la corteza cerebral de ratones C57BL/6. Estas células provienen del riñón de hámster recién nacido por lo que se les denomina “Baby hamster kidney cells” y fueron transfectadas para que produjeran VEGF humano.

Posteriormente, los fibroblastos encapsulados fueron implantados en un modelo murino de la enfermedad: el ratón transgénico APP/PS1. Estos ratones son un cruce entre el ratón Tg2576 (sobreeexpresa la proteína  $\beta$ -APP695 humana) y el ratón M146L (mutante para la PS1). En estos ratones se determinó si el incremento de la densidad vascular provocaba un aumento en el aclaramiento de los péptidos de A $\beta$  y si esto se traducía en una disminución de su toxicidad y por tanto en una mejora de la evolución de la enfermedad.

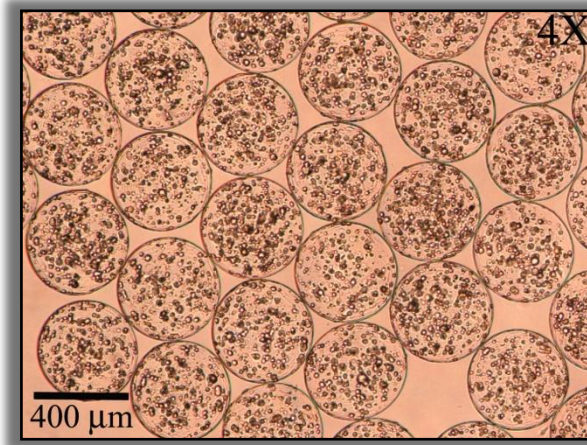
Este trabajo se realizó en varias fases:

- 1. Estudio *in vitro***
- 2. Estudio de la angiogénesis en ratones C57BL/6**
- 3. Estudios en ratones transgénicos APP/PS1**
- 4. Estudios con muestras humanas**

#### **1. Estudio *in vitro***

Tras la encapsulación de los fibroblastos productores de VEGF se realizó un estudio morfológico de las microcápsulas obtenidas observándose que eran completamente homogéneas y uniformes en cuanto a su tamaño y esféricas, tal y como puede apreciarse en la figura 1.

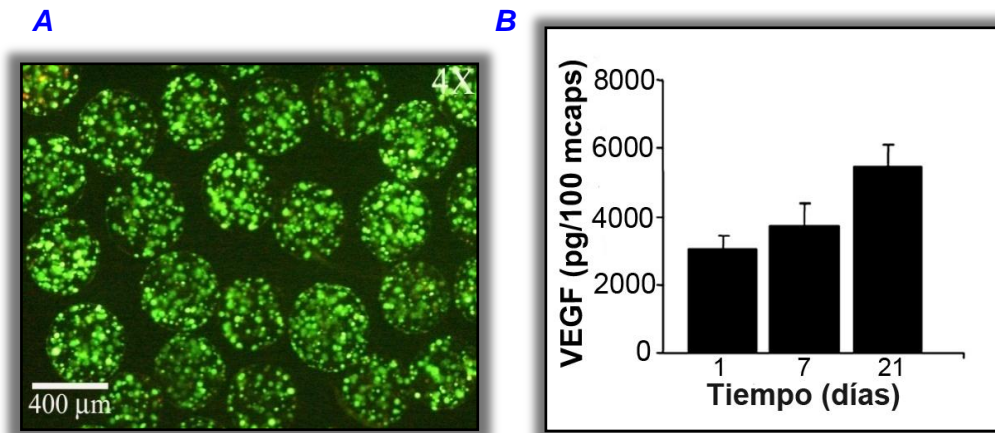




*Figura 1: Microcápsulas con fibroblastos secretores de VEGF*

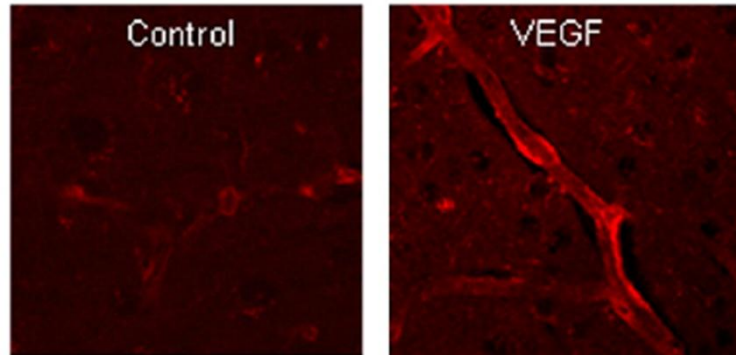
Posteriormente, se procedió a estudiar la viabilidad y la producción de VEGF a partir de las células encapsuladas. En la figura 2A puede observarse que, durante la primera semana del estudio, la gran mayoría de las células permanecían viables. La producción de VEGF tal y como se observa en la figura 2B se incrementó con el paso del tiempo durante los 21 días del estudio. Este aumento en la producción puede deberse a la ligera capacidad de proliferación que tienen los fibroblastos una vez inmovilizados, si bien, dicha proliferación no afecta en ningún caso a la bioseguridad del sistema<sup>159</sup>.

<sup>159</sup> Orive G, Hernández RM, Gascón AR, Igartua M, Pedraz JL. Survival of different cell lines in alginate-agarose microcapsules. Eur J Pharm Sci. 2003; 18: 23-30.



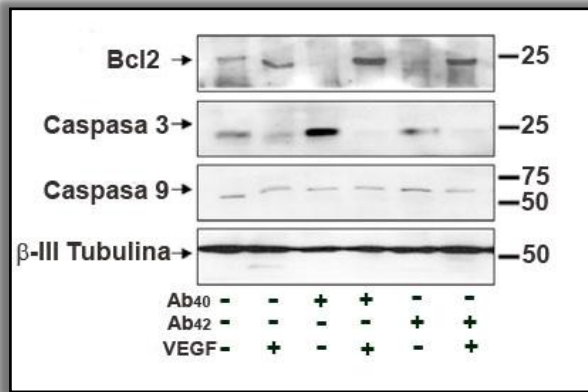
**Figura 2:** (A) Microcápsulas con células secretoras de VEGF teñidas con Etidio y Calceína. (B) Producción de VEGF de los fibroblastos encapsulados a distintos tiempos.

Un aspecto fundamental era comprobar *in vitro* si el VEGF secretado por los fibroblastos encapsulados era funcional. Para ello las microcápsulas productoras de VEGF se adicionaron al cultivo de las “células endoteliales microvasculares cerebrales” (BMVEC), observándose que en dichas células la proliferación y la formación de túbulos (figura 3) eran significativamente superiores en comparación con las BMVEC que habían sido cultivadas con microcápsulas que contenían células no transfectadas. Por tanto puede afirmarse que el VEGF secretado por las células inmovilizadas era biológicamente activo.



**Figura 3:** Tinción con lectina de las células BMVEC cultivadas en presencia de microcápsulas que contenían células sin transfectar (izquierda) y cultivadas en presencia de microcápsulas que contenían células transfectadas para producir VEGF (derecha).

Es un hecho conocido que el VEGF ejerce un potente efecto neuroprotector por lo que se decidió realizar un estudio para determinar su capacidad de protección frente a los efectos tóxicos del A $\beta$  utilizando tanto células neuronales (células primarias de ratón) como endoteliales (línea celular BMVEC). En este estudio tanto las células neuronales como las endoteliales se cultivaron conjuntamente con el A $\beta$  en presencia o en ausencia de las microcápsulas que contenían los fibroblastos secretores de VEGF. La viabilidad de ambos tipos celulares fue significativamente superior cuando fueron cultivadas en presencia de las microcápsulas en comparación con las células que habían sido cultivadas en ausencia de estas demostrando por tanto, la capacidad neuroprotectora del VEGF. El efecto tóxico del A $\beta$  está relacionado sobre todo, con su capacidad de inhibir la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 mientras aumenta la expresión de las caspasas, sin embargo, el VEGF fue capaz de revertir esos dos efectos, tal y como se demuestra en la figura 4.



**Figura 4:** Western blot en células neuronales donde se aprecia una menor expresión de las caspasas y una mayor expresión de la proteína Bcl2 en los grupos tratados con VEGF.

## 2. Estudio de la angiogénesis en ratones C57BL/6

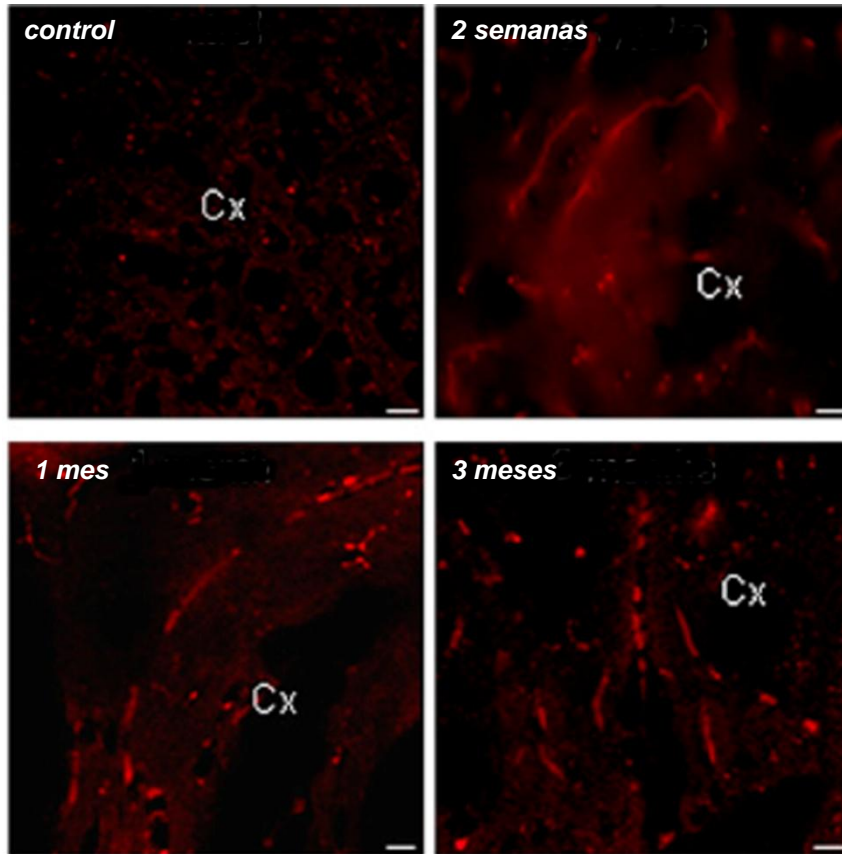
Una vez finalizado el estudio *in vitro* se procedió a comprobar si esos buenos resultados que se habían obtenido se reproducían *in vivo*. Para llevar a cabo este estudio se utilizaron ratones C57BL/6 a los que se les implantaron las microcápsulas productoras de VEGF a nivel de la corteza cerebral mediante una craneotomía tal y como se observa en la figura 5. A los 15 días, 1 y 3 meses se determinó la angiogénesis producida.



**Figura 5:** Implante de las microcápsulas en la corteza cerebral mediante craneotomía.

Al igual que en el estudio *in vitro* el número de vasos sanguíneos se incrementó significativamente en el grupo tratado, respecto al control (figura 6) lo

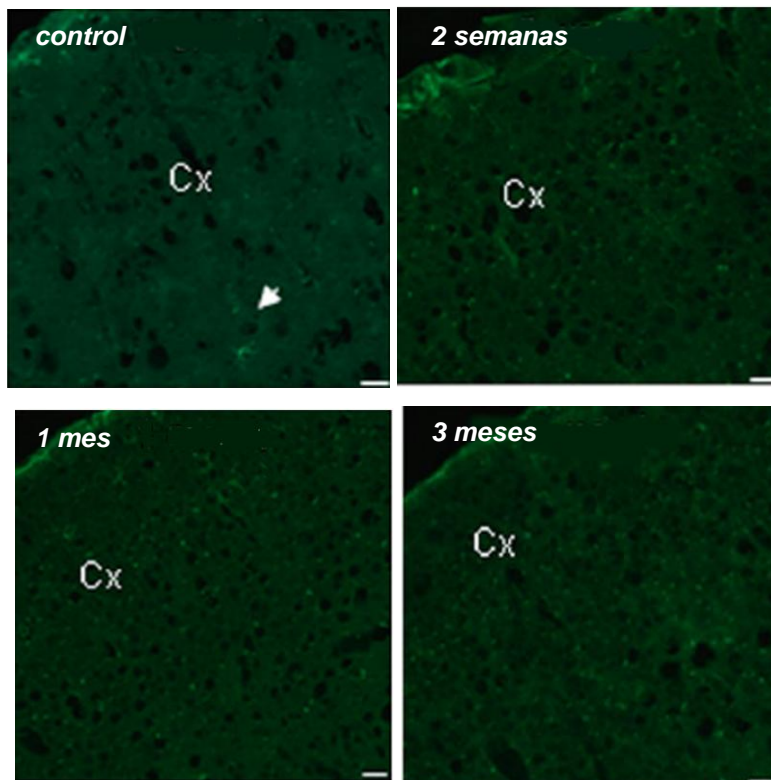
que demuestra por una parte la capacidad de las células inmovilizadas para producir el VEGF *in vivo* de forma sostenida durante al menos 3 meses y por otra parte que el VEGF secretado mantenía su funcionalidad.



**Figura 6:** Tinción de los vasos sanguíneos de la corteza cerebral mediante lectina a distintos tiempos (ratones C57BL/6).

Una de las causas más importantes que provoca el fracaso del implante es la generación de respuesta inflamatoria frente a las microcápsulas administradas. Por tanto para determinar la biocompatibilidad de la formulación se procedió a determinar la presencia de astrocitos reactivos en la proximidad de las microcápsulas mediante la tinción de la proteína gliofibrilar ácida (GFAP). Tal y

como puede observarse en la figura 7 la presencia de astrocitos reactivos en el grupo tratado fue muy escasa y similar a la obtenida en el grupo control. Con estos resultados puede afirmarse que las microcápsulas no generaron respuesta inflamatoria.



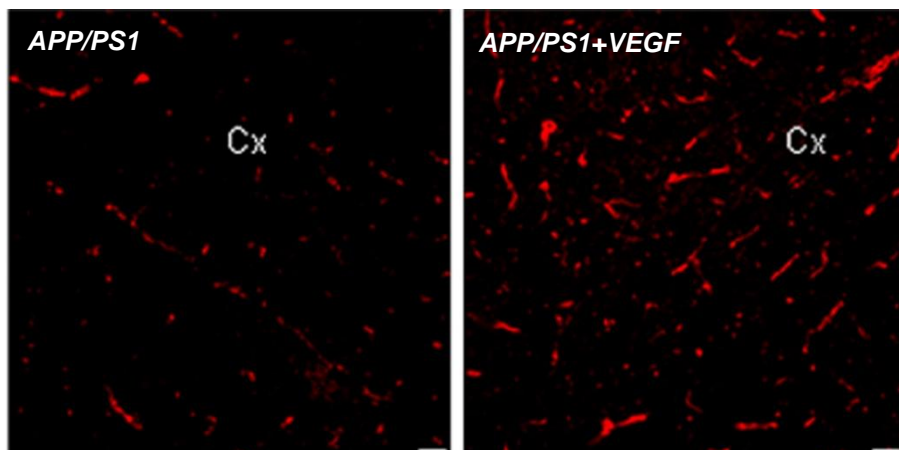
**Figura 7:** Tinción de los astrocitos reactivos (señalados con una flecha blanca) de la corteza cerebral mediante el marcador GFAP.



### 3. Estudios en ratones transgénicos APP/PS1

Tras los prometedores resultados obtenidos tanto en el estudio *in vitro* como en el estudio *in vivo* utilizando ratones C57BL/6 se decidió implantar las microcápsulas en ratones transgénicos APP/PS1 considerados un modelo de la EA<sup>160</sup>.

El primer objetivo del estudio fue comprobar la capacidad del VEGF para inducir angiogénesis en dichos ratones. Según diversos estudios, en la EA la formación de vasos sanguíneos parece estar alterada<sup>161</sup>; y por ello era importante comprobar si se lograba inducir angiogénesis en los ratones transgénicos. Los resultados reflejaron un aumento significativo de la angiogénesis a los 3 meses de haber implantado las microcápsulas (figura 8).

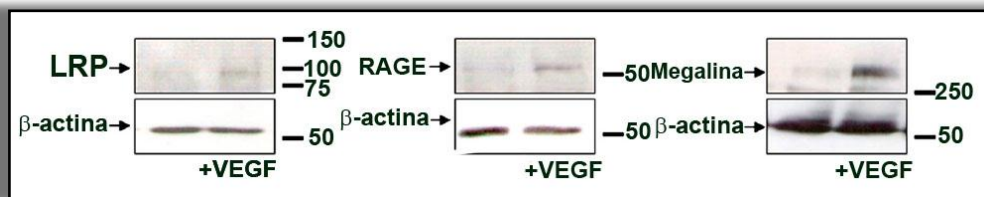


**Figura 8:** Tinción de los vasos sanguíneos de la corteza cerebral mediante lectina a los 3 meses del implante de las microcápsulas (ratones transgénicos APP/PS1).

<sup>160</sup> Lee GD, Aruna JH, Barret PM, Lei DL, Ingram DK, Mouton PR. Stereological analysis of microvascular parameters in a double transgenic model of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull.* 2005; 65: 317-322.

<sup>161</sup> Marchesi VT. Alzheimer's dementia begins as a disease of small blood vessels, damaged by oxidative-induced inflammation and dysregulated amyloid metabolism: implications for early detection and therapy. *FASEB J.* 2011; 25: 5-13.

Una vez demostrado que la densidad vascular aumentaba en la corteza cerebral se quiso comprobar si esos vasos eran realmente funcionales y para ello se estudió si expresaban los receptores del A $\beta$ . Como puede verse en la figura 9, la expresión de LRP, RAGE y Megalina estaba incrementada significativamente en los ratones tratados con respecto a los controles por lo que con estos resultados puede afirmarse que el VEGF no solo era capaz de aumentar la densidad vascular sino que esos vasos sanguíneos eran también capaces de captar el A $\beta$ . Estos resultados pueden tener una repercusión destacable ya que en los pacientes de Alzheimer se ha visto que los receptores de A $\beta$  están alterados por lo que probablemente no estén desempeñando su función correctamente<sup>162</sup>.



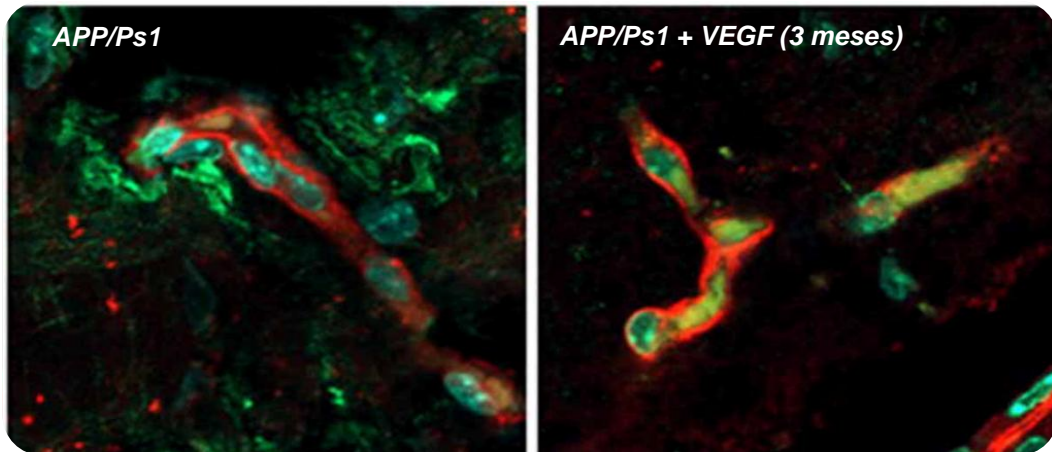
**Figura 9:** Western blot para los receptores de A $\beta$  LRP, RAGE y Megalina donde se observa mayor respuesta en los ratones tratados con VEGF.

Otro dato muy relevante obtenido en este estudio fue, que debido al aumento de los vasos sanguíneos, el aclaramiento del A $\beta$  se vio incrementado en los ratones tratados con VEGF (figura 10) y con ello los niveles de A $\beta$  tanto en la corteza cerebral (figura 11A) como en el hipocampo (figura 11B) descendieron significativamente. Estos resultados coinciden plenamente con la

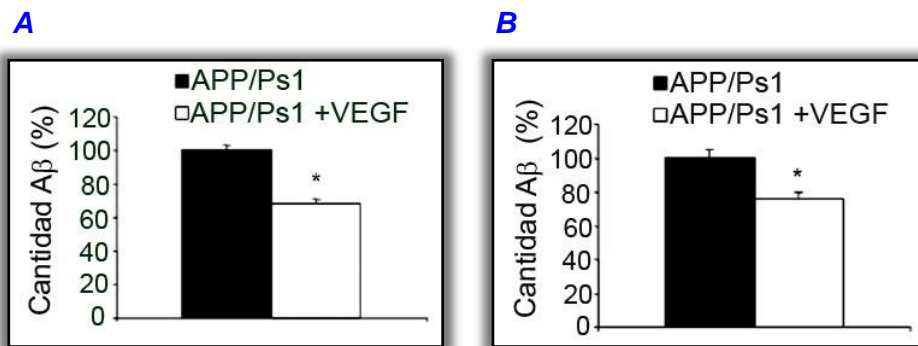
<sup>162</sup> Deane R, Wu Z, Zlokovic BV. RAGE (Yin) versus LRP (Yang) balance regulates Alzheimer amyloid  $\beta$ -peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke*. 2004; 35: 2628-2631.



hipótesis vascular cada vez más extendida entre la comunidad científica y defendida en esta tesis<sup>163</sup>.



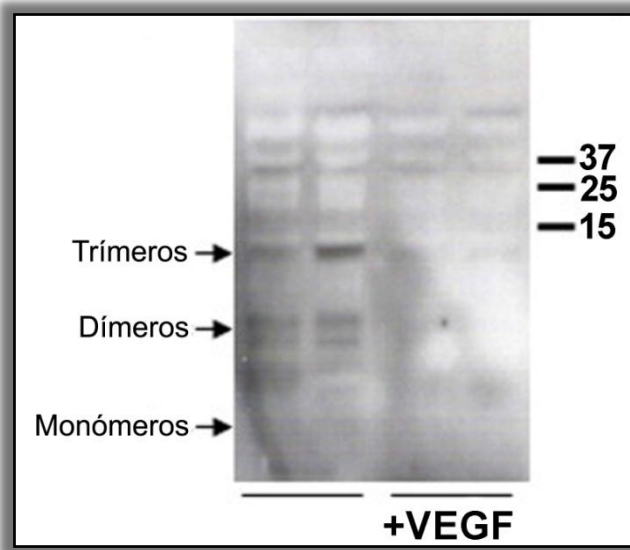
**Figura 10:** Imagen de la corteza cerebral: (Izquierda) Ratón no tratado donde puede apreciarse una gran cantidad de A $\beta$  (verde). (Derecha) Ratón tratado con VEGF donde puede observarse una disminución del A $\beta$  en la corteza cerebral a la vez que puede apreciarse un aumento de este en el interior de los vasos sanguíneos (rojo).



**Figura 11:** (A) Cantidad de A $\beta$  en corteza cerebral. (B) Cantidad de A $\beta$  en hipocampo.

<sup>163</sup> De la Torre JC. The vascular hypothesis of Alzheimer's disease: Bench to bedside and beyond. Neurodegener Dis. 2010; 7: 116-121.

En relación a los niveles de A $\beta$ , es muy importante mencionar que no solo descendió el número de placas sino también la cantidad de A $\beta$  soluble (figura 12). En los últimos años, se ha relacionado más a los péptidos solubles que a las propias placas de A $\beta$  con la alteración cognitiva y la muerte neuronal que se producen en la EA<sup>164,165</sup> por lo que el descenso del A $\beta$  soluble puede reducir en gran medida la toxicidad neuronal.



**Figura 12:** Western blot donde se mide la expresión de los péptidos de A $\beta$  solubles.

Una vez que se comprobó la disminución de los niveles de A $\beta$  (tanto de los péptidos solubles como de los insolubles) se procedió a determinar si esa disminución se traducía en la mejora de algunos de los síntomas y signos más

<sup>164</sup> Sandberg A, Luheshi LM, Sölvander S, Pereira de Barros T, Macao B, Knowles TPJ, et al. Stabilization of neurotoxic Alzheimer amyloid- $\beta$  oligomers by protein engineering. Proc Natl Acad Sci USA. 2010; 107: 15595-15600.

<sup>165</sup> Maltsev AV, Bystryak S, Galzitskaya OV. The role of  $\beta$ -amyloid peptide in neurodegenerative diseases. Ageing Res Rev. 2011; 10: 440-452

significativos de la EA como son la muerte neuronal o la fosforilación de la proteína *tau*.

Tal y como puede observarse en la figura 13 se produjo una disminución significativa en la muerte neuronal a nivel de la corteza cerebral (figura 13, parte A). Esta disminución podría deberse al efector neuroprotector del VEGF ya que varias rutas metabólicas relacionadas con dicho efecto como son la fosfatoinositol-3 quinasa/Akt y la MEK/ERK<sup>166,167</sup> (figura 13, parte B) estaban más activadas en los ratones tratados. La primera de las rutas metabólicas mencionadas previene la disfunción mitocondrial regulando la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2<sup>168</sup>, mientras que la segunda de ellas funciona como un factor transcripcional capaz de activar varias rutas metabólicas encargadas de la proliferación, la diferenciación y la supervivencia celular<sup>169</sup>. Además, la expresión de las caspasas 3 y 9, dos proteínas estrechamente ligadas a la apoptosis celular y sobreexpresadas por el A $\beta$ <sup>170</sup>, fue menor en los ratones tratados con VEGF que en los ratones control tal y como se recoge en las figuras 13C y 13D.

---

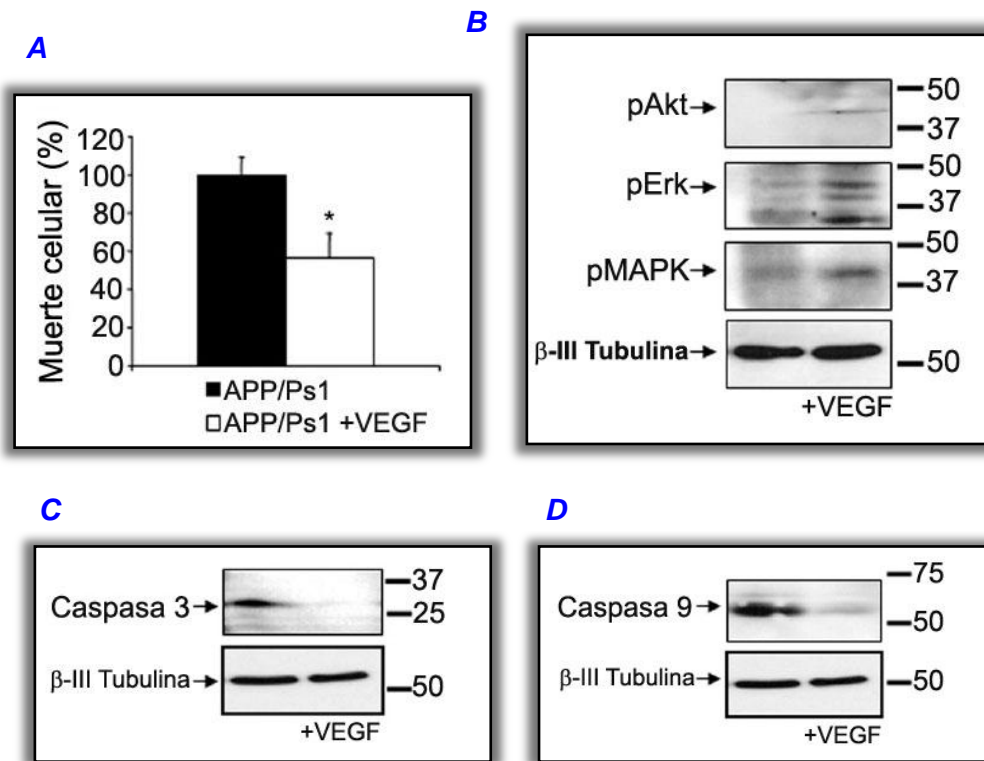
<sup>166</sup> Kilic Ü, Kilic E, Järve A, Guo Z, Spudich A, Bieber K, et al. Human vascular endothelial growth factor protects axotomized retinal ganglion cells in vivo by activating ERK-1/2 and Akt pathways. *J Neurosci*. 2006; 26: 12439-12446.

<sup>167</sup> Kilic E, Kilic Ü, Wang Y, Bassetti CL, Marti HH, Hermann DM. The phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway mediates VEGF's neuroprotective activity and induces blood brain barrier permeability after focal cerebral ischemia. *FASEB J*. 2006; 20: E307-E314.

<sup>168</sup> Kilic E, Dietz GP, Hermann DM, Bähr M. Intravenous TAT-Bcl-XI is protective after middle cerebral artery occlusion in mice. *Ann Neurol*. 2002; 52: 617-622.

<sup>169</sup> Irving EA, Bamford M. Role of mitogen-and stress-activated kinases in ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002; 22: 631-647.

<sup>170</sup> Folin M, Baiguera S, Fioravanzo L, Conconi MT, Grandi C, Nussdorfer GG, et al. Caspase-8 activation and oxidative stress are involved in the cytotoxic effect of  $\beta$ -amyloid on rat brain microvascular endothelial cells. *Int J Mol Med*. 2006; 17: 431-435.

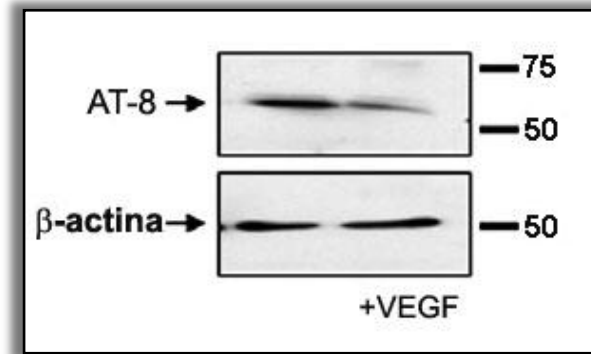


**Figura 13:** (A) Porcentaje de la muerte neuronal a nivel de la corteza cerebral en ratones tratados y no tratados con VEGF. (B) Western blot donde puede observarse una mayor expresión de las vías metabólicas pAkt y pErk en los ratones tratados con VEGF. (C) y (D) Western blot donde se aprecia una menor expresión de las caspasas 3 y 9 respectivamente en los animales tratados con VEGF.

Por otra parte, también se observó una disminución de la fosforilación de la proteína *tau* lo cual podría ser debido a la capacidad que tiene el VEGF de inhibir la GSK-3 $\beta$ ; unas de las enzimas encargada de fosforilar la proteína *tau*<sup>171</sup>. En los últimos años se ha demostrado que la proteína *tau* fosforilada conjuntamente con el A $\beta$ , juega un papel importante en los daños neuronales

<sup>171</sup> Nassif M, Hoppe J, Santin K, Frozza R, Zamin LL, Simão F, et al. Beta-amyloid peptide toxicity in organotypic hippocampal slice culture involves Akt/PKB, GSK-3 beta, and PTEN. *Neurochem Int.* 2007; 50: 229-35.

que se observan en la EA<sup>172</sup>, haciendo más relevante si cabe este último dato. En la figura 14 puede observarse como el anticuerpo AT-8, un anticuerpo específico para la proteína *tau* fosforilada, se expresa menos en los animales tratados con VEGF.



**Figura 14:** Western blot donde puede apreciarse que la expresión de la proteína *tau* fosforilada es menor en los ratones tratados con VEGF.

Finalmente, para poder determinar si la función cognitiva se veía mejorada tras la administración de las células secretoras de VEGF microencapsuladas se realizaron varios tests como el “T maze”, el “test de reconocimiento de objetos” y el “laberinto elevado en cruz”<sup>173</sup>. En estos estudios se emplearon dos grupos control distintos; un grupo conformado por los animales enfermos no tratados y otro conformado por animales que no tenían la enfermedad.

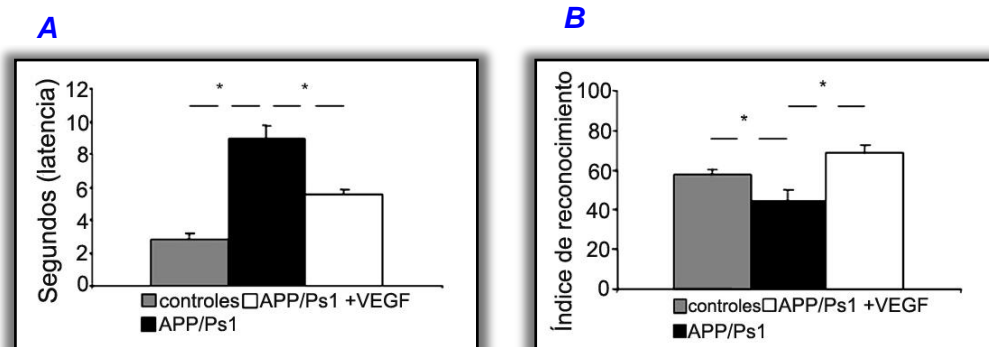
El “T maze” se realiza en un laberinto con forma de T. Cuando el animal da dos vueltas consecutivas al laberinto, en la segunda vuelta, puede elegir entre ir al brazo que no ha visitado en la vuelta anterior (alternancia espontánea) o ir al mismo brazo (considerado error en este estudio). En este estudio se miden la alternancia espontánea y el número de errores así como el tiempo que tarda en completar las dos vueltas (latencia). Se considera que cuanto menor sea la

<sup>172</sup> Ittner LM, Götz J. Amiloid-β and tau-a toxic pas de deux in Alzheimer’s disease. Nat Rev Neurosci. 2011; 12: 67-72.

<sup>173</sup> Lalonde R, Kim HD, Fukuchi K. Exploratory activity, anxiety, and motor coordination in bigenic APP<sup>swe</sup>+PS1/DeltaE9 mice. Neurosci Lett. 2004; 369: 156-161.

alternancia espontánea y mayor la latencia más afectada se encuentra la orientación espacial. Cuando se realizó este estudio los niveles de alternancia espontánea no mejoraron sin embargo, la latencia disminuyó de manera significativa en los ratones tratados con VEGF (figura 15, parte A).

En el “test de reconocimiento de objetos” al animal se le pone en contacto con un objeto y una vez que el animal se ha familiarizado con dicho objeto se le da un segundo objeto desconocido para él. Se mide el tiempo que el animal pasa explorando cada objeto. El índice de reconocimiento, esto es, el tiempo que el animal pasa explorando el objeto desconocido dividido entre el tiempo que pasa explorando ambos objetos, es usado para valorar el estado de la memoria no espacial a corto plazo. En función de los resultados puede decirse que los ratones tratados vieron mejorado, de forma significativa, su estado cognitivo (figura 15, parte B).



**Figura 15:** (A) Disminución de la latencia en la alternancia espontánea en el “T maze”. (B) Resultados del “test de reconocimiento de objetos” donde se observa en los ratones tratados una mayor preferencia por el nuevo objeto.

En la EA no solo está afectada la memoria, el paciente presenta otro tipo de síntomas neuropsiquiátricos, como son la apatía, la ansiedad y la depresión, que también son importantes<sup>174</sup> y para ver si estos mejoraban se realizó el test del “laberinto elevado en cruz”.

Dicho test se realiza en un laberinto conformado por dos brazos abiertos y dos cerrados, durante el estudio se determina el tiempo que el ratón pasa en los brazos abiertos y en los brazos cerrados así como el número de entradas en ambos tipos de brazos. A continuación, con esos datos se calculan los siguientes ratios: 1. entradas en los brazos abiertos/entradas totales. 2. tiempo en el brazos abiertos /tiempo en los dos tipos de brazos. Ambos ratios están relacionados con el nivel ansiedad que presenta el animal. En función de los resultados obtenidos (tabla 1) puede afirmarse que el nivel de ansiedad disminuyó de manera significativa en los ratones tratados. Por tanto el VEGF es capaz de mejorar otro tipo de síntomas relacionados con la EA además de los síntomas cognitivos.

---

<sup>174</sup> Jaworski T, Dewachter I, Seymour CM, Borghgraef P, Devijver H, Kügler S, et al. Alzheimer’s disease: Old problem, new views from transgenic and viral models. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1802: 808-818.

<b>Medidas</b>	<b>Controles</b>	<b>APP/PS1</b>	<b>APP/PS1 tratados con VEGF</b>
<b>Día 1</b>			
<b>Brazo abierto/total (%)</b>			
<b>Entradas</b>	31,58 ± 1,94	67,25 ± 1,4 <sup>a</sup>	57,2 ± 1,73 <sup>c</sup>
<b>Duración</b>	18,51 ± 2,72	35,76 ± 8,2 <sup>b</sup>	54,85 ± 10,2
<b>Día 2</b>			
<b>Brazo abierto/total (%)</b>			
<b>Entradas</b>	30,19 ± 1,96	74,05 ± 2,7 <sup>a</sup>	43,13 ± 1,37 <sup>c</sup>
<b>Duración</b>	6,64 ± 1,81	35,43 ± 4,02 <sup>a</sup>	25,06 ± 3,3 <sup>c</sup>

Los datos se expresan como media ± DE

<sup>a</sup>P<0,01

<sup>b</sup>P<0,05 en comparación con los ratones no transgénicos

<sup>c</sup>P<0,05 en comparación con los APP/PS1

**Tabla 1:** Entradas y duración de estas a los distintos brazos (abiertos y cerrados) en los dos días consecutivos en los que se realizó el estudio.

#### **4. Estudios con muestras humanas**

Debido a que la sustancia terapéutica secretada por las células era el VEGF, se decidió medir los niveles de dicho factor en el LCR y en la corteza cerebral de pacientes con Alzheimer y personas de edad avanzada sin Alzheimer.

A la vista de los resultados obtenidos (tabla 2) puede afirmarse que los niveles de VEGF en la EA, como ya ha sido anteriormente publicado por varios



grupos de investigación<sup>175,176</sup>, presentan una clara alteración respecto a los niveles determinados en personas adultas que no han desarrollado la enfermedad.

Hasta la fecha no se han podido esclarecer las razones exactas por las que se producen estas alteraciones. Uno de los posibles motivos para que los niveles de VEGF en la corteza cerebral se encuentren disminuidos podría ser que al presentar esta sustancia una gran afinidad por las placas de A $\beta$ , podría encontrarse unido a ellas disminuyendo la fracción de VEGF libre.

Respecto al aumento detectado en el LCR, puede pensarse que dicha sobreproducción de VEGF podría estar provocada por el estado de hipoxia que se genera tras la alteración de los vasos sanguíneos característica de esta enfermedad<sup>177</sup>.

	CONTROL (pg/ml)	PACIENTES CON ALZHEIMER (pg/ml)
<b>LCR</b>	4,7 $\pm$ 1,4	10,61 $\pm$ 2,3
<b>Corteza cerebral</b>	8,4 $\pm$ 3,1	3,8 $\pm$ 1,6

*Tabla 2: Niveles de VEGF en el LCR y corteza cerebral en muestras humanas de pacientes con Alzheimer y sin Alzheimer.*

<sup>175</sup> Thirumangalakudi L, Samany PG, Owoso A, Wiskar B, Grammas P. Angiogenic proteins are expressed by brain blood vessels in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2006; 10: 111-118.

<sup>176</sup> Mateo I, Llorca J, Infante J, Rodríguez-Rodríguez E, Fernández-Viadero C, Peña N, et al. Low serum VEGF levels are associated with Alzheimer's disease, Acta Neurol Scand. 2007; 116: 56-58.

<sup>177</sup> Tarkowski E, Issa R, Sjögren M, Wallin A, Blennow K, Tarkowski A, et al. Increased intrathecal levels of the angiogenic factors VEGF and TGF- $\beta$  in Alzheimer's disease and vascular dementia. Neurobiol Aging. 2002; 23: 237-243.

A día de hoy no se sabe con la suficiente certeza si la neurogénesis puede llegar a tener alguna importancia en la EA pero si se conoce que está relacionada con el mantenimiento del aprendizaje y de la memoria en la edad adulta y que uno de los lugares en los que tiene lugar, como es el hipocampo, está profundamente dañado en la EA<sup>178</sup>. Por ello, se cree que activar o aumentar dicha neurogénesis para que las neuronas del hipocampo puedan ser renovadas puede ser una buena estrategia para hacer frente a la EA. Varios factores de crecimiento entre los que se encuentra el VEGF han demostrado aumentar la neurogénesis en el cerebro adulto<sup>179</sup> sin embargo, poco se sabe sobre la capacidad neurogénica del VEGF en la EA.

Para estudiar la capacidad neurogénica del VEGF en la EA, en una segunda etapa de esta memoria experimental, se implantaron microcápsulas con fibroblastos secretores de VEGF en la corteza cerebral de ratones transgénicos APP/PS1. Como ya ha sido mencionado en la introducción, cuando se ha estudiado la neurogénesis en los distintos modelos de ratones transgénicos existentes para la EA los resultados han sido bastantes contradictorios por ello cabe mencionar que en el caso concreto de este modelo de ratón la neurogénesis está aumentada<sup>180</sup>. Sin embargo, con el paso del tiempo, se observan tanto degeneración neuronal como pérdida de memoria. Uno de los posibles motivos podría ser que el aumento de la neurogénesis no sea suficiente como para compensar la cantidad de neuronas afectadas por la enfermedad.

---

<sup>178</sup> Lopez-Toledano MA, Ali Faghihi M, Patel NS, Wahlestedt C. Adult neurogenesis: A potential tool for early diagnosis in Alzheimer's disease. *J Alzheimer Dis.* 2010; 20: 395-408.

<sup>179</sup> Thau-Zuchman O, Shohami E, Alexandrovich AG, Leker RR. Vascular endothelial growth factor increases neurogenesis after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010; 30: 1008-1016.

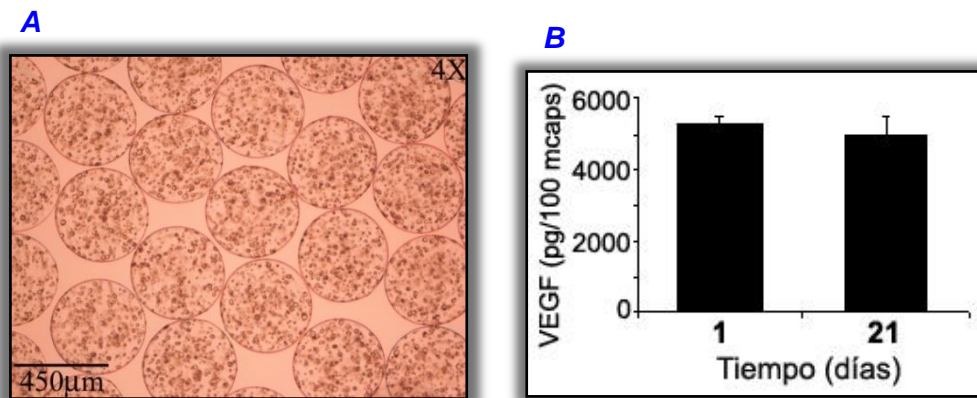
<sup>180</sup> Yu Y, He J, Zhang Y, Luo H, Zhu S, Yang Y, et al. Increased hippocampal neurogenesis in the progressive stage of Alzheimer's disease phenotype in an APP/PS1 double transgenic mouse model. *Hippocampus.* 2009; 19: 1247-1253.

Este trabajo se realizó en dos fases:

1. Estudio *in vitro*
2. Estudios en ratones transgénicos APP/PS1

### 1. Estudio *in vitro*

Antes de proceder al implante se realizó tanto un estudio morfológico de las microcápsulas como una comprobación de la capacidad de las células inmovilizadas de secretar el VEGF de forma sostenida *in vitro*. Como puede comprobarse en la figura 16, todas las cápsulas presentaban un tamaño muy parecido así como una forma esférica mientras que la producción de VEGF se mantuvo durante al menos 3 semanas.



**Figura 16:** (A) Morfología de las microcápsulas con fibroblastos secretores de VEGF. (B) Producción *in vitro* de VEGF a distintos tiempos a partir de las células encapsuladas

## **2. Estudios en ratones transgénicos APP/PS1**

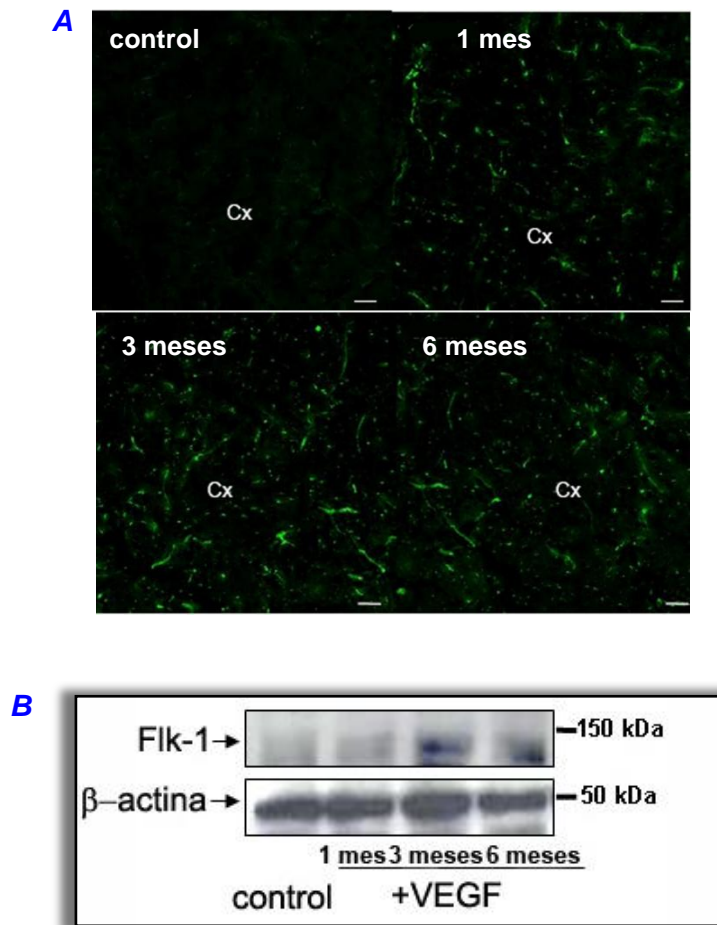
En este caso la duración del estudio fue de 6 meses lo que permitió comprobar los efectos del VEGF a más largo plazo. Los análisis se realizaron a los 1, 3 y 6 meses. Además, de forma paralela a la determinación de la actividad neurogénica del VEGF también se estudió la angiogénesis tanto en la corteza cerebral como en el hipocampo.

Durante los 6 meses que duró el estudio, se pudo detectar VEGF humano a nivel de la corteza cerebral (figura 17, parte A), lo que demuestra que las células inmovilizadas expresan y secretan el producto terapéutico durante al menos 6 meses. De hecho nuestro grupo de investigación ha demostrado una liberación sostenida de eritropoyetina (EPO) usando esta tecnología de hasta casi un año con una única administración a nivel subcutáneo<sup>181</sup>. Además, es importante destacar que el VEGF fue también capaz de incrementar la expresión del receptor flk-1 en la corteza cerebral (figura 17, parte B). Este receptor tiene un papel muy importante tanto en la angiogénesis como en la neurogénesis mediada por el VEGF<sup>182</sup>, por lo que el aumento de este receptor incrementa las posibilidades de que el VEGF pueda ejercer su efecto sobre las neuronas y las células endoteliales.

---

<sup>181</sup> Orive G, De Castro M, Kong HJ, Hernández RM, Ponce S, Mooney DJ, et al. Bioactive cell-hydrogel microcapsules for cell-based drug delivery. *J Control Release*. 2009; 135: 203-210.

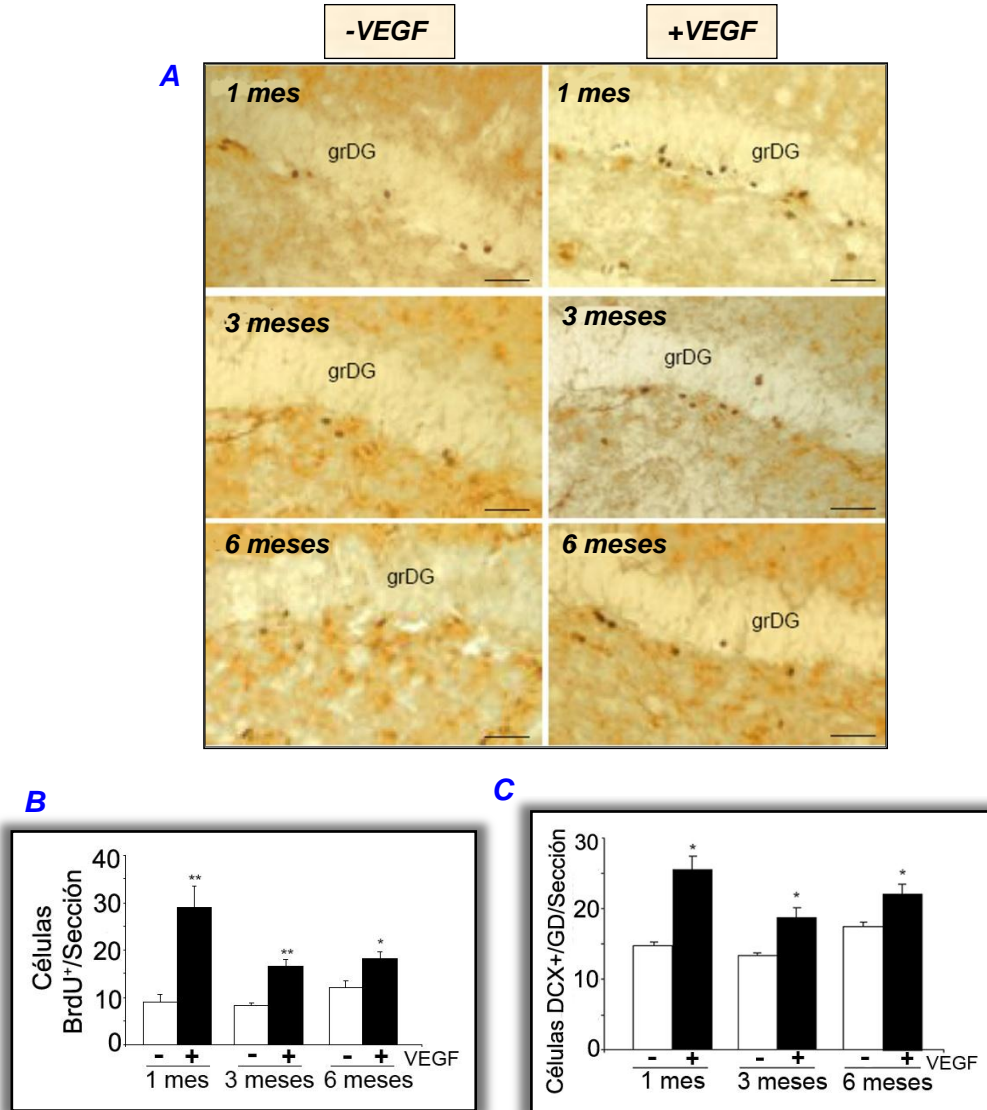
<sup>182</sup> Bernal GM, Peterson DA. Phenotypic and gene expression modification with normal brain aging in GFAP-positive astrocytes and neural stem cells. *Aging Cell*. 2011;10: 466-482.



**Figura 17:** (A) Detección de VEGF (verde) en la corteza cerebral a distintos tiempos después de implantar las microcápsulas. (B) Western blot para el receptor Flk-1 donde se observa una mayor expresión de este en los ratones tratados.

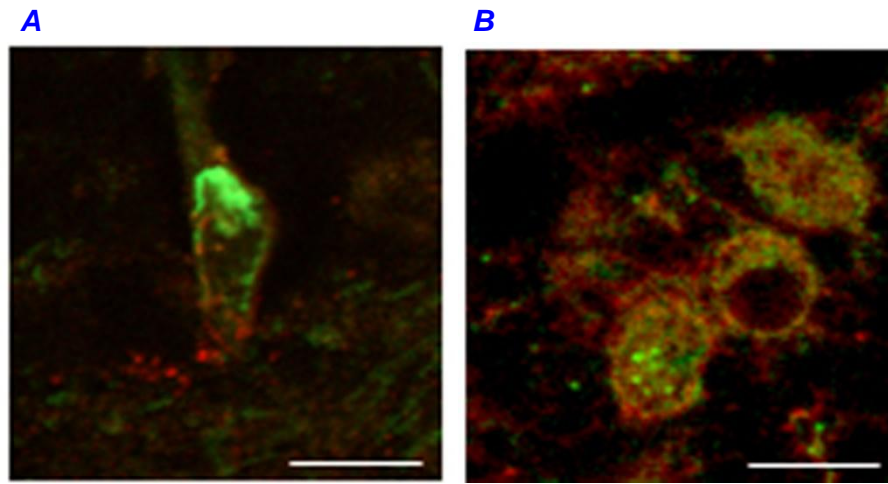
A los 3 tiempos anteriormente señalados, en los animales tratados, se observó que en el hipocampo el número de células que incorporaban el BrdU<sup>+</sup> era mayor en comparación con el grupo control (figura 18, A y B). Además, mediante una tinción para doblecortina, un marcador que expresan los precursores neuronales, se demostró que el número de precursores neuronales también era superior en los animales tratados (figura 18, C). Estos resultados

indican que el número de células que estaban proliferando, en uno de los lugares principales donde ocurre la neurogénesis, era más elevado.



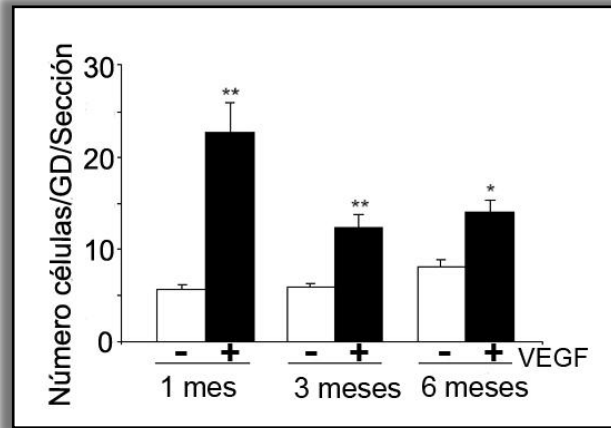
**Figura 18:** (A) Inmunohistoquímica mediante el compuesto BrdU en el hipocampo de los animales tratados y sin tratar a distintos tiempos. (B) Histograma con el número de núcleos BrdU positivos en cada grupo experimental. (C) Histograma con el número de células positivas para la doblecortina en cada grupo experimental.

En el hipocampo tanto las células que captaban el BrdU<sup>+</sup> (figura 19, A) como las que expresaban el marcador neuronal calbindina (Figura 19, B) expresaban en su mayoría el receptor flk-1. Por ello puede pensarse que el VEGF secretado por la células encapsuladas tiene capacidad de actuar directamente sobre ellas.



**Figura 19:** (A) Doble tinción BrdU (verde)/flk-1 (rojo). (B) Doble tinción calbindina (rojo)/flk-1 (verde).

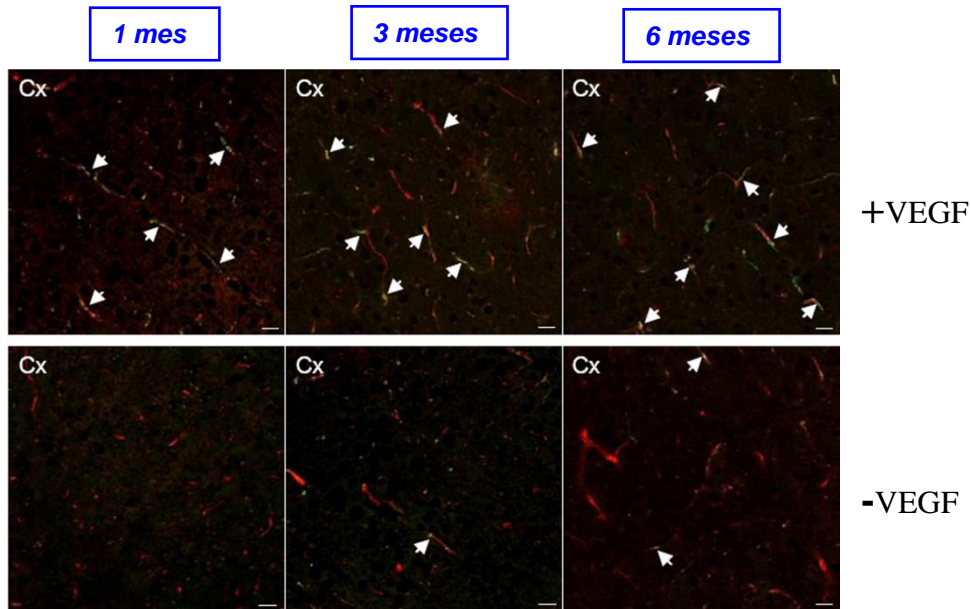
Posteriormente, se realizó una doble tinción con BrdU y calretinina, un marcador específico para las neuronas, y se pudo demostrar que el número de células positivas para los dos marcadores era mayor en los ratones tratados. Con estos datos, puede afirmarse que el número de células precursoras neuronales que se estaban diferenciando a neurona era significativamente superior en los ratones tratados con VEGF tal y como se muestra en la figura 20.



**Figura 20:** Histograma del número de células positivas tanto para BrdU como para calretinina en el hipocampo de los ratones tratados y sin tratar con VEGF.

Cuando se midió la densidad de los vasos sanguíneos en la corteza cerebral se vio que al mes y a los 3 meses había una mayor densidad en los ratones tratados, tal y como pudo observarse en el estudio anterior. Sin embargo, lo más destacable fue que a los 6 meses esas diferencias se mantenían, por lo que puede afirmarse que el efecto angiogénico se mantiene al menos durante 6 meses (figura 21).



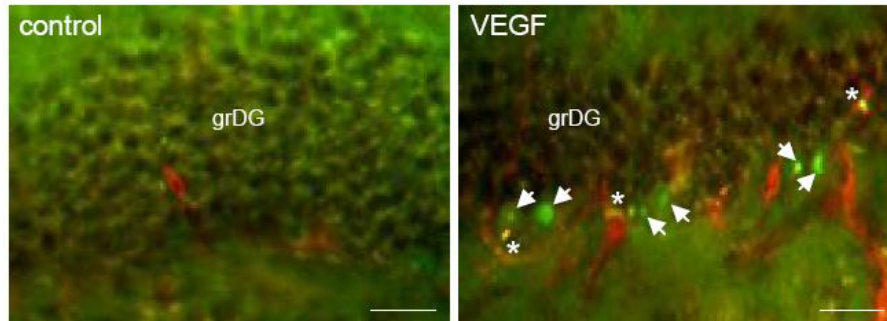


**Figura 21:** Doble tinción BrdU/lectina donde puede apreciarse un mayor número de vasos sanguíneos en los animales tratados con VEGF: Núcleo verde (BrdU) y citoplasma rojo (lectina).

A nivel del hipocampo, tal y como ocurría en el experimento anterior, no se observaron diferencias significativas en el número de vasos sanguíneos pero concretamente en el giro dentado (parte del hipocampo donde se produce la neurogénesis) se observaron más células positivas a la doble tinción con lectina/BrdU, tal y como puede apreciarse en la figura 22. Este hecho parece estar en consonancia con lo publicado en otros estudios en los que se ha propuesto una estrecha relación entre la angiogénesis y la neurogénesis<sup>183,184</sup>.

<sup>183</sup> Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci USA. 2002; 99: 11946-11950.

<sup>184</sup> Louissaint A, Rao S, Leventhal C, Goldman SA. Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. Neuron. 2002; 34: 945-960.



**Figura 22:** Figura en la que se muestran células positivas para la doble tinción BrdU/lectina (asteriscos) y células positivas para BrdU (flechas blancas).

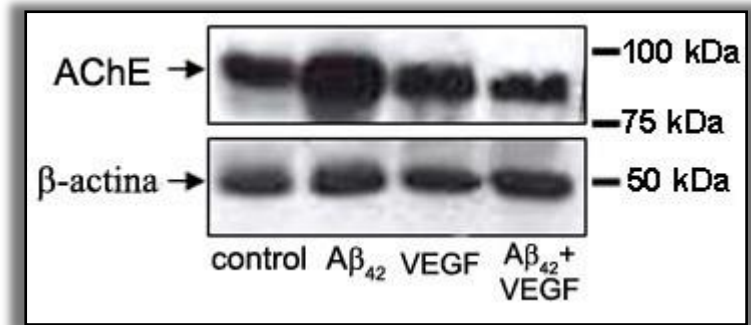
Una de las enzimas que podría estar relacionada con el proceso de neurogénesis es la acetilcolinesterasa<sup>185</sup>. Aunque en las primeras fases del proceso parece tener un efecto beneficioso en las últimas fases dicho efecto parece volverse perjudicial para las neuronas, incluso en algún estudio se le ha llegado a relacionar con la muerte celular<sup>186</sup>. Por ello podría pensarse que una reducción de la hiperexpresión de esta enzima generada por el A $\beta$  debería ser beneficioso tanto para la supervivencia neuronal como para el proceso de neurogénesis. Para poder comprobar si el VEGF secretado por las células inmovilizadas tenía algún efecto sobre la hiperexpresión de la acetilcolinesterasa provocada por el A $\beta$  se realizaron varios estudios:

- 1- Estudio *in vitro*: en este estudio se utilizaron neuronas provenientes del hipocampo. A dichas neuronas se les añadió en el cultivo bien A $\beta$ 42 solo o A $\beta$ 42 y microcápsulas que contenían células productoras de VEGF. Con esto pudo demostrarse, tal y como se aprecia en la figura 23, que aunque el A $\beta$ 42 aumentó la expresión de la acetilcolinesterasa,

<sup>185</sup> Dori A, Cohen J, Silverman WF, Pollack Y, Soreq H. Functional manipulations of acetylcholinesterase splice variants highlight alternative splicing contributions to murine neocortical development. *Cereb Cortex*. 2005; 15: 419-430.

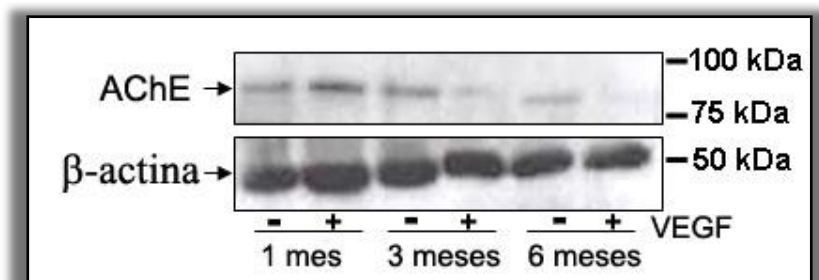
<sup>186</sup> Park SE, Kim ND, Yoo YH. Acetylcholinesterase plays a pivotal role in apoptosome formation. *Cancer Res*. 2004; 64: 2652-2655.

el VEGF disminuyó dicha expresión hasta conseguir equipararla con la del grupo control.



**Figura 23:** Western blot donde puede apreciarse el efecto del VEGF sobre la hiperexpresión de la enzima acetilcolinesterasa provocada por el Aβ<sub>42</sub>.

2- Estudio *in vivo*: se quiso comprobar si en el propio hipocampo de los ratones transgénicos APP/PS1 el VEGF también conseguía reducir la expresión de la acetilcolinesterasa. En estos animales pudo demostrarse que los niveles de la acetilcolinesterasa disminuían de manera significativa, respecto a los animales no tratados, tanto 3 mes como 6 meses después del implante de las microcápsulas productoras de VEGF (figura 24).



**Figura 24:** Western blot donde se aprecia una disminución de la expresión de la acetilcolinesterasa en los ratones tratados con VEGF.

Estos datos pueden ser muy relevantes ya que los fármacos denominados inhibidores de la acetilcolinesterasa (uno de los pocos fármacos comercializados para el tratamiento de la EA) al tener un efecto inhibitorio sobre dicha enzima podrían estar favoreciendo la neurogénesis en los pacientes que los toman.

En resumen, los datos obtenidos en este trabajo experimental demuestran que el VEGF puede ser un factor que presente una actividad terapéutica muy importante en el tratamiento de la EA: por una parte porque disminuye los dos componentes principales de la EA como son los péptidos de A $\beta$  y la proteína *tau* fosforilada y por otra parte por su potente capacidad neuroprotectora. Estos efectos pueden incluso llegar a mejorar ciertos síntomas cognitivos como la memoria a corto plazo y también otros síntomas no relacionados con la función cognitiva pero si con la EA como por ejemplo la ansiedad. Además, se ha demostrado que el VEGF ejerce un potente efecto neurogénico; teniendo en cuenta la extensa degeneración neuronal que se produce en la EA este efecto puede resultar muy útil para regenerar las neuronas dañadas

También ha quedado reflejado que la tecnología de encapsulación de células es un método muy eficaz para la liberación continua de factores neurotróficos incluso a nivel cerebral. Los efectos angiogénicos y neurogénicos mediados por el VEGF pudieron detectarse hasta 6 meses después de la administración de las microcápsulas y para ello solo fue necesario administrar una única dosis de microcápsulas en las que se inmovilizaron las células que secretan VEGF. Es importante mencionar que el VEGF presenta una semivida muy corta, lo que implica que cuando se administra mediante métodos convencionales es necesaria una administración repetida.

Aunque los resultados hayan sido muy satisfactorios es importante mencionar que la tecnología de encapsulación de células todavía debe superar varios retos antes de convertirse en una realidad a nivel clínico. La principal limitación, si se compara con la administración por vía sistémica de sustancias terapéuticas, es que el implante de las cápsulas en el SNC requiere cirugía

haciendo que la administración sea más complicada. Además, una vez implantadas, la recuperación de estas del cerebro del paciente puede ser complicada, en el caso de que sea necesario detener el tratamiento. En este aspecto resulta de vital importancia desarrollar sistemas que permitan retirar las microcápsulas de una forma segura y sencilla.

Finalmente, el uso de esta tecnología hace que sea complicado controlar la dosis exacta que se administra ya que la cantidad de producto terapéutico secretado por las células inmovilizadas no es siempre la misma. En el caso de que se produzca una sobreproducción pueden generarse efectos secundarios importantes tal y como sucede con el VEGF que a altas dosis puede llegar incluso a generar edemas<sup>187</sup>. También puede darse el caso contrario, esto es, que se produzca una cantidad del producto terapéutico inferior a la necesaria o incluso que las células dejen de producir el producto terapéutico. Por tanto resulta necesario generar líneas celulares con una producción muy estable y mantenida en el tiempo.

---

<sup>187</sup> Yasuhara T, Shingo T, Muraoka K, Wen JY, Kameda M, Takeuchi A, et al. The differences between high and low-dose administration of VEGF to dopaminergic neurons of in vitro and in vivo Parkinson's disease model. *Brain Res.* 2005; 1038: 1-10.



De los resultados obtenidos en esta memoria experimental pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- 1- Se ha desarrollado un sistema de terapia celular para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer basado en la microencapsulación de fibroblastos productores del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Las microcápsulas conteniendo fibroblastos secretores de VEGF son estables, esféricas y de tamaño uniforme, además, son capaces de secretar cantidades terapéuticas de VEGF en condiciones de cultivo *in vitro*. El VEGF secretado es biológicamente activo tal y como se ha demostrado utilizando cultivos de células endoteliales microvasculares cerebrales. Así mismo el VEGF secretado es capaz de proteger de los efectos neurotóxicos del  $\beta$ -amiloide tal y como se ha puesto de manifiesto en cultivos de neuronas primarias y células endoteliales microvasculares cerebrales.
- 2- La administración de las microcápsulas, a ratones C57BL/6, a nivel de la corteza cerebral mediante una craneotomía ha revelado que estas son capaces de producir y secretar VEGF activo durante al menos tres meses, provocando un incremento significativo de la angiogénesis que se mantiene durante este periodo de tiempo. Así mismo se ha demostrado una alta biocompatibilidad del implante ya que no se ha detectado la presencia significativa de astrocitos GFAP reactivos durante la realización del ensayo.
- 3- La administración intracraneal de las microcápsulas a ratones doblemente transgénicos APP/PS1 ha demostrado un incremento muy significativo de la angiogénesis a los tres meses del implante. Se ha puesto de manifiesto la expresión de LRP, RAGE y Megalina por parte de los vasos neoformados lo que revela que estos son funcionales y por tanto capaces de captar el  $\beta$ -amiloide. A los tres meses de la administración se ha observado una importante reducción del

porcentaje de placas de  $\beta$ -amiloide a nivel de la corteza cerebral y del hipocampo así como de la cantidad de  $\beta$ -amiloide soluble. Paralelamente a la disminución del  $\beta$ -amiloide también se ha detectado una disminución de los niveles de la proteína *tau* fosforilada a nivel de la corteza cerebral probablemente debido al efecto del VEGF sobre la enzima glucógeno sintasa quinasa. Todos estos efectos se traducen en una disminución de la muerte neuronal a nivel de la corteza cerebral tal y como se ha demostrado al observarse una reducción significativa en los niveles de caspasa 3 y caspasa 9.

- 4- Los cambios histológicos y bioquímicos producidos por las cápsulas que contienen fibroblastos secretores de VEGF se traducen en cambios significativos en el estado cognitivo de los ratones. Para ello se han realizado diversos test como el T-maze y el test de reconocimiento de objetos cuyos resultados han puesto de manifiesto una mejora importante en el comportamiento de los ratones transgénicos que fueron tratados con las microcápsulas. Además, otros síntomas neurosiquiátricos característicos de la enfermedad de Alzheimer como la apatía, la ansiedad y la depresión también mejoraron tal y como se ha puesto de manifiesto en los resultados obtenidos en el test del laberinto elevado en cruz.
- 5- En un segundo ensayo realizado con ratones APP/PS1 se ha demostrado que la acción angiogénica y sus efectos se siguen manteniendo seis meses después de implantar las microcápsulas a nivel de la corteza cerebral. Además en este ensayo se ha observado que el VEGF liberado es capaz de incrementar la neurogénesis en el hipocampo de los ratones tratados.
- 6- En estudios *in vitro* se ha puesto de manifiesto que las microcápsulas que contienen fibroblastos secretores de VEGF también actúan a nivel de los neurotransmisores al ser capaces de disminuir la expresión de la



acetilcolinesterasa en cultivos con células neuronales provenientes del hipocampo. Este efecto también ha sido evidenciado en ratones transgénicos APP/PS1 después de la administración de las cápsulas a nivel de la corteza cerebral. En dicho ensayo se ha observado un descenso significativo en la expresión de acetilcolinesterasa a nivel del hipocampo con respecto a los ratones no tratados. Dicho efecto se ha puesto de manifiesto al mes de la administración de las microcápsulas y se ha mantenido durante los 6 meses de duración del ensayo.



- Altman R**, Rutledge JC. The vascular contribution to Alzheimer's disease. *Clin Sci (Lond)*. 2010; 119: 407-421.
- Ashe KH**, Zahs KR. Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. *Neuron*. 2010; 66: 631-645.
- Bell RD**, Deane R, Chow N, Long X, Sagare A, Singh I, et al. SRF and myocardin regulate LRP-mediated amyloid-beta clearance in brain vascular cells. *Nat Cell Biol*. 2009; 11: 143-153.
- Bell RD**, Zlokovic BV. Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2009; 118: 103-113.
- Bernal GM**, Peterson DA. Phenotypic and gene expression modification with normal brain aging in GFAP-positive astrocytes and neural stem cells. *Aging Cell*. 2011;10: 466-482.
- Bertram L**, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet*. 2007; 39: 17-23.
- Bettens K**, Sleegers K, Van Broeckhoven C. Current status on Alzheimer disease molecular genetics: from past, to present, to future. *Hum Mol Genet*. 2010; 19: 4-11.
- Breteler MMB**. Vascular risk factors for Alzheimer's disease: An epidemiologic perspective. *Neurobiol Aging*. 2000; 21: 153-160.
- Brody DL**, Holtzman DM. Active and passive immunotherapy for neurodegenerative disorders. *Annu Rev Neurosci*. 2008; 31: 175-193.
- Brunden KR**, Trojanowski JQ, Lee VMY. Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nat Rev Drug Discov*. 2009; 8: 783-793.
- Bürger S**, Noack M, Kirazov LP, Kirazov EP, Naydenov CL, Kouznetsova E, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) affects processing of amyloid precursor protein and  $\beta$ -amyloidogenesis in brain slice cultures derived from transgenic Tg2576 mouse brain. *Int J Dev Neurosci*. 2009; 27: 517-523.
- Bürger S**, Yafai Y, Bigl M, Wiedemann P, Schliebs R. Effect of VEGF and its receptor antagonist SU-5416, an inhibitor of angiogenesis, on processing of the  $\beta$ -amyloid precursor protein in primary neuronal cells derived from brain tissue of Tg2576 mice. *Int J Dev Neurosci*. 2010; 28: 597-604.
- Carro E**, Trejo JL, Gerber A, Loetscher H, Torrado J, Metzger F, et al. Therapeutic actions of insulin-like growth factor I on APP/PS2 mice with severe brain amyloidosis. *Neurobiol Aging*. 2006; 27: 1250-1257.
- Cattaneo A**, Capsoni S, Paoletti F. Towards non invasive nerve growth factor therapies for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2008; 15: 255-283.
- Chapuis J**, Tian J, Shi J, Bensemain F, Cottel D, Lendon C, et al. Association study of the vascular endothelial growth factor gene with the risk of developing Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2006; 27:1212-1215.
- Chow N**, Bell RD, Deane R, Streb JW, Chen J, Brooks A, et al. Serum response factor and myocardin mediate arterial hypercontractility and cerebral blood flow dysregulation in Alzheimer's phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 823-828.
- Cirrito JR**, Deane R, Fagan AM, Spinner ML, Parsadanian M, Finn MB, et al. P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid- $\beta$  deposition in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest*. 2005; 115: 3285-3290.
- Ciavardelli D**, Silvestri E, Del Viscovo A, Bomba M, De Gregorio D, Moreno M, et al. Alterations of brain and cerebellar proteomes linked to A $\beta$  and tau pathology in a female triple-transgenic murine model of Alzheimer's disease. *Cell Death Dis*. 2010; 1: e90
- Citron M**. Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat Rev Drug Discov*. 2010; 9: 387-398.
- Claassen JAHR**, Jansen RWMM. Cholinergically mediated augmentation of cerebral perfusion in Alzheimer's disease and related cognitive disorders: The cholinergic-vascular hypothesis. *J Gerontol*. 2006; 61A: 267-271.
- Cole SL**, Vassar R. Linking vascular disorders and Alzheimer's disease: Potential involvement of BACE1. *Neurobiol Aging*. 2009; 30: 1535-1544.

- Dawson HN**, Cantillana V, Jansen M, Wang H, Vitek MP, Wilcock DM, et al. Loss of tau elicits axonal degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2010; 169: 516-531.
- De la Torre JC**. Alzheimer disease as a vascular disorder. *Stroke*. 2002; 33: 1152-1162.
- De la Torre JC**. Cerebrovascular gene linked to Alzheimer's disease pathology. *Trends Mol Med*. 2005; 11: 534-536.
- De la Torre JC**. Carotid artery ultrasound and echocardiography testing to lower the prevalence of Alzheimer's disease. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2009; 18: 319-328.
- De la Torre JC**. The vascular hypothesis of Alzheimer's disease: Bench to bedside and beyond. *Neurodegener Dis*. 2010; 7: 116-121.
- Deane R**, Yan SD, Subramanian RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, et al. RAGE mediates amyloid- $\beta$  peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med*. 2003; 9: 907-913.
- Deane R**, Wu Z, Zlokovic BV. RAGE (Yin) versus LRP (Yang) balance regulates Alzheimer amyloid  $\beta$ -peptide clearance through transport across the blood-brain barrier. *Stroke*. 2004; 35: 2628-2631.
- Deane R**, Sagare A, Hamm K, Parisi M, Lane S, Finn MB, et al. ApoE isoform-specific disruption of amyloid  $\beta$  peptide clearance from mouse brain. *J Clin Invest*. 2008; 118: 4002-4013.
- Del Bo R**, Scarlato M, Ghezzi S, Martinelli Boneschi F, Fenoglio C, Galbiati S, et al. Vascular endothelial growth factor gene variability is associated with increased risk for AD. *Ann Neurol*. 2005; 57: 373-380.
- Demars M**, Hu YS, Gadadhar A, Lazarov O. Impaired neurogenesis is an early event in the etiology of familial Alzheimer's disease in transgenic mice. *J Neurosci Res*. 2010; 88: 2103-2117.
- Di Stefano A**, Iannitelli A, Laserra S, Sozio P. Drug delivery strategies for Alzheimer's disease treatment. *Expert Opin Drug Deliv*. 2011; 8: 581-603.
- Dickstein DL**, Walsh J, Brautigam H, Stockton SD, Gandy S, Hof PR. Role of vascular risk factors and vascular dysfunction in Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med*. 2010; 77: 82-102.
- Dori A**, Cohen J, Silverman WF, Pollack Y, Soreq H. Functional manipulations of acetylcholinesterase splice variants highlight alternative splicing contributions to murine neocortical development. *Cereb Cortex*. 2005; 15: 419-430.
- Duyckaerts C**, Potier MC, Delatour B. Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol*. 2008; 115: 5-38.
- Duyckaerts C**, Delatour B, Potier MC. Classification and basic pathology of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2009; 118: 5-36.
- Engel T**, Hernández F, Avila J, Lucas JJ. Full reversal of Alzheimer's disease-like phenotype in a mouse model with conditional overexpression of glycogen synthase kinase-3. *J Neurosci*. 2006; 26: 5083-5090.
- Etcheberrigaray R**, Tan M, Dewachter I, Kuiperi C, Van der Auwera I, Wera S, et al. Therapeutic effects of PKC activators in Alzheimer's disease transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 11141-11146.
- Fernández-Verdecia CI**, Díaz del Guante MA, Castillo-Díaz L, Álvarez-Blanco J. Neurogénesis como diana terapéutica para la enfermedad de Alzheimer. *Rev Neurol*. 2009; 49: 193-201.
- Ferrer I**, Boada Rovira M, Sánchez Guerra ML, Rey MJ, Costa-Jussá F. Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease. *Brain Pathol*. 2004; 14: 11-20.
- Fisher A**. Cholinergic treatments with emphasis on m1 muscarinic agonist as potential disease-modifying agents for Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*. 2008; 5: 433-442.
- Folin M**, Baiguera S, Fioravanzo L, Conconi MT, Grandi C, Nussdorfer GG, et al. Caspase-8 activation and oxidative stress are involved in the cytotoxic effect of  $\beta$ -amyloid on rat brain microvascular endothelial cells. *Int J Mol Med*. 2006; 17: 431-435.
- Fryer JD**, Simmons K, Parsadanian M, Bales KR, Paul SM, Sullivan PM, et al. Human apolipoprotein E4 alters the amyloid- $\beta$  40:42 ratio and promotes the formation of cerebral amyloid angiopathy in an amyloid precursor protein transgenic model. *J Neurosci*. 2005; 25: 2803-2810.

- Galvan V**, Greenberg DA, Jin K. The role of vascular endothelial growth factor in neurogenesis in adult brain. *Mini Rev Med Chem*. 2006; 6: 667-669.
- Ghosal K**, Vogt DL, Liang M, Shen Y, Lamb BT, Pimplikar SW. Alzheimer's disease-like pathological features in transgenic mice expressing the APP intracellular domain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106: 18367-18377.
- Ghosal K**, Stathopoulos A, Pimplikar SW. APP intracellular domain impairs adult neurogenesis in transgenic mice by inducing neuroinflammation. *PLoS ONE*. 2010; 5: e11866.
- Girouard H**, Iadecola C. Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke and Alzheimer disease. *J Appl Physiol*. 2006; 100: 328-335.
- Giuffrida ML**, Caraci F, Pignataro B, Cataldo S, De Bona P, Bruno V, et al. Beta-amyloid monomers are neuroprotective. *J Neurosci*. 2009; 29: 10582-10587.
- Götz J**, Deters N, Doldissen A, Bokhari L, Ke Y, Wiesner A, et al. A decade of tau transgenic animal models and beyond. *Brain Pathol*. 2007; 17: 91-103.
- Götz J**, Ittner LM. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci*. 2008; 9: 532-544.
- Griffiths HH**, Morten IJ, Hooper NM. Emerging and potential therapies for Alzheimer's disease. *Expert Opin Ther Targets*. 2008; 12: 693-704.
- Grueninger F**, Bohrmann B, Czech C, Ballard TM, Frey JR, Weidensteiner C, et al. Phosphorylation of tau at S422 is enhanced by A $\beta$  in TauPS2APP triple transgenic mice. *Neurobiol Dis*. 2010; 37: 294-306.
- Hansson Petersen CA**, Alikhani N, Behbahani H, Wiehager B, Pavlov PF, Alafuzoff I, et al. The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 13145-13150.
- Harold D**, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2009; 41: 1088-1093.
- Herring A**, Yasin H, Ambrée O, Sachser N, Paulus W, Keyvani K. Environmental enrichment counteracts Alzheimer's neurovascular dysfunction in tgCRND8 mice. *Brain Pathol*. 2008; 18: 32-39.
- Hickman SE**, Allison EK, El Khoury J. Microglial dysfunction and defective  $\beta$ -Amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice. *J Neurosci*. 2008; 28: 8354-8360.
- Howlett DR**, Bowler K, Soden PE, Riddell D, Davis JB, Richardson JC, et al. A $\beta$  deposition and related pathology in an APP x PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Histol Histopathol*. 2008; 23: 67-76.
- Huang Y**. A $\beta$ -independent roles of apolipoprotein E4 in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Mol Med*. 2010; 16: 287-294.
- Humpel C**, Marksteiner J. Cerebrovascular damage as a cause for Alzheimer's disease. *Curr Neurovasc Res*. 2005; 2: 341-347.
- Imbimbo BP**. Alzheimer's disease:  $\gamma$ -secretase inhibitors. *Drug Discov Today Ther Strateg*. 2008; 5: 169-175.
- Imbimbo BP**, Hutter-Paier B, Villetti G, Facchinetti F, Cenacchi V, Volta R, et al. CHF5074, a novel gamma-secretase modulator, attenuates brain beta-amyloid pathology and learning deficit in a mouse model of Alzheimer's disease. *Br J Pharmacol*. 2009; 156: 982-93.
- Irving EA**, Bamford M. Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002; 22: 631-647.
- Ittner LM**, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, et al. Dendritic function of tau mediates amyloid- $\beta$  toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell*. 2010; 142: 387-397.
- Ittner LM**, Götz J. Amyloid- $\beta$  and tau-a toxic pas de deux in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2011; 12: 67-72.
- Jack CR**, Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol*. 2010; 9: 119-128.

- Jacobsen S**, Comery T, Kreft A, Mayer S, Zaleska M, Riddell D, et al. GSI-953 is a potent APP-selective gammasecretase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2009; 5 (4 suppl 1): P139.
- Jaworski T**, Dewachter I, Seymour CM, Borghgraef P, Devijver H, Kügler S, et al. Alzheimer's disease: Old problem, new views from transgenic and viral models. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1802: 808-818.
- Jin K**, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 11946-11950.
- Jin K**, Peel AL, Mao XO, Xie L, Cottrell BA, Henshall DC, et al. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 343-347.
- Jin K**, Galvan V, Xie L, Mao XO, Gorostiza OF, Bredesen DE, et al. Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APPsw,Ind) mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101: 13363-13367
- Jin M**, Shepardson N, Yang T, Chen G, Walsh D, Selkoe DJ. Soluble amyloid  $\beta$ -protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce tau hyperphosphorylation and neuritic degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108: 5819-5824.
- Johnson NA**, Jahng GH, Weiner MW, Miller BL, Chui HC, Jagust WJ, et al. Pattern of cerebral hypoperfusion in Alzheimer disease and mild cognitive impairment measured with arterial spin-labeling MR imaging: initial experience. *Radiology*. 2005; 234: 851-859.
- Kakinuma Y**, Furihata M, Akiyama T, Arikawa M, Handa T, Katare RG, et al. Donepezil, an acetylcholinesterase inhibitor against Alzheimer's dementia, promotes angiogenesis in an ischemic hindlimb model. *J Mol Cell Cardiol*. 2010; 48: 680-693.
- Kilic E**, Dietz GP, Hermann DM, Bähr M. Intravenous TAT-Bcl-XI is protective after middle cerebral artery occlusion in mice. *Ann Neurol*. 2002; 52: 617-622.
- Kilic E**, Kilic Ü, Wang Y, Bassetti CL, Marti HH, Hermann DM. The phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway mediates VEGF's neuroprotective activity and induces blood brain barrier permeability after focal cerebral ischemia. *FASEB J*. 2006; 20: E307-E314.
- Kilic Ü**, Kilic E, Järve A, Guo Z, Spudich A, Bieber K, et al. Human vascular endothelial growth factor protects axotomized retinal ganglion cells in vivo by activating ERK-1/2 and Akt pathways. *J Neurosci*. 2006; 26: 12439-12446.
- Lalonde R**, Kim HD, Fukuchi K. Exploratory activity, anxiety, and motor coordination in bigenic APPsw+PS1/DeltaE9 mice. *Neurosci Lett*. 2004; 369: 156-161.
- Lambert JC**, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 2009; 41: 1094-1099.
- Landgren S**, Palmér MS, Skoog I, Minthon L, Wallin A, Andreassen N, et al. No association of VEGF polymorphisms with Alzheimer's disease. *Neuromol Med*. 2010; 12: 224-228.
- Lee C**, Agoston DV. Vascular endothelial growth factor is involved in mediating increased *de novo* hippocampal neurogenesis in response to traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2010; 27: 541-553.
- Lee GD**, Aruna JH, Barret PM, Lei DL, Ingram DK, Mouton PR. Stereological analysis of microvascular parameters in a double transgenic model of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull*. 2005; 65: 317-322.
- Llorca J**, Rodríguez-Rodríguez E, Dierssen-Sotos T, Delgado-Rodríguez M, Berciano J, Combarros O. Meta-analysis of genetic variability in the  $\beta$ -amyloid production, aggregation and degradation metabolic pathways and the risk of Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand*. 2008; 117: 1-14.
- Lopez-Toledano MA**, Ali Faghihi M, Patel NS, Wahlestedt C. Adult neurogenesis: a potential tool for early diagnosis in Alzheimer's disease?. *J Alzheimers Dis*. 2010; 20: 395-408.
- Louissaint A**, Rao S, Leventhal C, Goldman SA. Coordinated interaction of neurogenesis and angiogenesis in the adult songbird brain. *Neuron*. 2002; 34: 945-960.

- Ma H**, Lesné S, Kotilinek L, Steidl-Nichols JV, Sherman M, Younkin L, et al. Involvement of  $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) in amyloid precursor protein-mediated enhancement of memory and activity-dependent synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 8167-8172.
- Maltsev AV**, Bystryak S, Galzitskaya OV. The role of  $\beta$ -amyloid peptide in neurodegenerative diseases. *Ageing Res Rev*. 2011; 10: 440-452
- Mandel SA**, Amit T, Kalfon L, Reznichenko L, Weinreb O, Youdim MB. Cell signaling pathways and iron chelation in the neurorestorative activity of green tea polyphenols: special reference to epigallocatechin gallate (EGCG). *J Alzheimers Dis*. 2008; 15: 211-222.
- Mangialasche F**, Solomon A, Winblad B, Mecocci P, Kivipelto M. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol*. 2010; 9: 702-716.
- Marchesi VT**. Alzheimer's dementia begins as a disease of small blood vessels, damaged by oxidative-induced inflammation and dysregulated amyloid metabolism: implications for early detection and therapy. *FASEB J*. 2011; 25: 5-13.
- Mateo I**, Llorca J, Infante J, Rodríguez-Rodríguez E, Fernández-Viadero C, Peña N, et al. Low serum VEGF levels are associated with Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand*. 2007; 116: 56-58.
- McConlogue L**, Buttini M, Anderson JP, Brigham EF, Chen KS, Freedman SB, et al. Partial reduction of BACE1 has dramatic effects on Alzheimer plaque and synaptic pathology in APP transgenic mice. *J Biol Chem* 2007; 282: 26326-26334.
- McEvoy LK**, Brewer JB. Quantitative structural MRI for early detection of Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother*. 2010; 10: 1675-1688.
- Medeiros R**, Prediger RDS, Passos GF, Pandolfo P, Duarte FS, Franco JL, et al. Connecting TNF- $\alpha$  signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer disease: relevance for the behavioral and synaptic deficit induced by amyloid  $\beta$  protein. *J Neurosci*. 2007; 27: 5394-5404.
- Meraz-Ríos MA**, Lira-De León KI, Campos-Peña V, De Anda-Hernández MA, Mena-López R. Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2010; 112: 1353-1367.
- Meyer-Luehmann M**, Spiess-Jones TL, Prada C, Garcia-Alloza M, de Calignon A, Rozkalne A, et al. Rapid appearance and local toxicity of amyloid- $\beta$  plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*. 2008; 451: 720-725.
- Miao J**, Vitek MP, Xu F, Previti ML, Davis J, Van Nostrand WE. Reducing cerebral microvascular amyloid- $\beta$  protein deposition diminishes regional neuroinflammation in vasculotropic mutant amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci*. 2005; 25: 6271-6277.
- Moser KV**, Humpel C. Vascular endothelial growth factor counteracts NMDA-induced cell death of adult cholinergic neurons in rat basal nucleus of Meynert. *Brain Res Bull*. 2005; 65: 125-131.
- Nassif M**, Hoppe J, Santin K, Frozza R, Zamin LL, Simão F, et al. Beta-amyloid peptide toxicity in organotypic hippocampal slice culture involves Akt/PKB, GSK-3 beta, and PTEN. *Neurochem Int*. 2007; 50: 229-35.
- Nikolaev A**, McLaughlin T, O'Leary DDM, Tessier-Lavigne M. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature*. 2009; 457: 981-990.
- Oddo S**, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: Intracellular A $\beta$  and synaptic dysfunction. *Neuron*. 2003; 39: 409-421.
- Oddo S**, Vasilevko V, Caccamo A, Kitazawa M, Cribbs DH, LaFerla FM. Reduction of soluble A $\beta$  and tau, but not soluble A $\beta$  alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles. *J Biol Chem*. 2006; 281: 39413-39423.
- Orive G**, Hernández RM, Gascón AR, Igartua M, Pedraz JL. Survival of different cell lines in alginate-agarose microcapsules. *Eur J Pharm Sci*. 2003; 18: 23-30.
- Orive G**, De Castro M, Kong HJ, Hernández RM, Ponce S, Mooney DJ, et al. Bioactive cell-hydrogel microcapsules for cell-based drug delivery. *J Control Release*. 2009; 135: 203-210.
- Ortuzar N**, Argandoña EG, Bengoetxea H, Lafuente JV. Combination of intracortically administered VEGF and environmental enrichment enhances brain protection in developing rats. *J Neural Transm*. 2011; 118: 135-144.

- Pan W**, Solomon B, Maness LM, Kastin AJ. Antibodies to beta-amyloid decrease the blood to brain transfer of beta-amyloid peptide. *Exp Biol Med.* 2002; 227: 609-615.
- Park SE**, Kim ND, Yoo YH. Acetylcholinesterase plays a pivotal role in apoptosome formation. *Cancer Res.* 2004; 64: 2652-2655.
- Patel NS**, Mathura VS, Bachmeier C, Beaulieu-Abdelahad D, Laporte V, Weeks O, et al. Alzheimer's  $\beta$ -amyloid peptide blocks vascular endothelial growth factor mediated signaling via direct interaction with VEGFR-2. *J Neurochem.* 2010; 112: 66-76.
- Pereira C**, Agostinho P, Moreira PI, Cardoso SM, Oliveira CR. Alzheimer's disease-associated neurotoxic mechanisms and neuroprotective strategies. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2005; 4: 383-403.
- Pimplikar SW**, Nixon RA, Robakis NK, Shen J, Tsai LH. Amyloid-independent mechanisms in Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci.* 2010; 30: 14946-14954.
- Poirier R**, Wolfer DP, Welzl H, Tracy J, Galsworthy MJ, Nitsch RM, et al. Neuronal neprilysin overexpression is associated with attenuation of  $A\beta$ -related spatial memory deficit. *Neurobiol Dis.* 2006; 24: 475-483.
- Porayette P**, Gallego MJ, Kaltcheva MM, Bowen RL, Meethal SV, Atwood CS. Differential processing of amyloid- $\beta$  precursor protein directs human embryonic stem cell proliferation and differentiation into neuronal precursor cells. *J Biol Chem.* 2009; 284: 23806-23817.
- Postina R**, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, et al. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest.* 2004; 113: 1456-1464.
- Price JL**, McKeel DW, Buckles VD, Roe CM, Xiong C, Grundman M, et al. Neuropathology of nondemented aging: presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease. *Neurobiol Aging.* 2009; 30: 1026-1036.
- Priller C**, Mitteregger G, Paluch S, Vassallo N, Staufenbiel M, Kretschmar HA, et al. Excitatory synaptic transmission is depressed in cultured hippocampal neurons of APP/PS1 mice. *Neurobiol Aging.* 2009; 30: 1227-1237.
- Provias J**, Jeynes B. Correlation analysis of capillary APOE, VEGF and eNOS expression in Alzheimer brains. *Curr Alzheimer Res.* 2011; 8: 197-202.
- Qi JP**, Wu H, Yang Y, Wang DD, Chen YX, Gu YH, et al. Cerebral ischemia and Alzheimer's disease: The expression of Amyloid- $\beta$  and Apolipoprotein E in human hippocampus. *J Alzheimers Dis.* 2007; 12: 335-341.
- Qui C**, Xu W, Fratiglioni L. Vascular and psychosocial factors in Alzheimer's disease: epidemiological evidence toward intervention. *J Alzheimers Dis.* 2010; 20: 689-697.
- Radde R**, Duma C, Goedert M, Jucker M. The value of incomplete mouse models of Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2008; 35(Suppl 1): S70-S74.
- Relkin NR**, Szabo P, Adamiak B, Burgut T, Monthe C, Lent RW, et al. 18-Month study of intravenous immunoglobulin for treatment of mild Alzheimer disease. *Neurobiol Aging.* 2009; 30: 1728-36.
- Resende R**, Moreira PI, Proença T, Deshpande A, Busciglio J, Pereira C, et al. Brain oxidative stress in a triple-transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med.* 2008; 4: 2051-2057.
- Richards JG**, Higgings GA, Ouagazzal AM, Ozmen L, Kew JNC, Bohrmann B, et al. PS2APP transgenic mice, coexpressing hPS2mut and hAPPswe, show age-related cognitive deficits associated with discrete brain amyloid deposition and inflammation. *J Neurosci.* 2003; 23: 8989-9003.
- Roberson ED**, Scarce-Levie K, Palop JJ, Yan F, Chen IH, Wu T, et al. Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science.* 2007; 316: 750-754.
- Rockenstein E**, Mante M, Alford M, Adame A, Crews L, Hashimoto M, et al. High  $\beta$ -secretase activity elicits neurodegeneration in transgenic mice despite reductions in amyloid- $\beta$  levels. *J Biol Chem.* 2005; 280: 32957-32967.



- Rosengarten B**, Paulsen S, Burr O, Kaps M. Neurovascular coupling in Alzheimer patients: Effect of acetylcholine-esterase inhibitors. *Neurobiol Aging*. 2009; 30: 1918-1923.
- Rosenmann H**, Grigoriadis N, Eldar-Levy H, Avital A, Rozenstein L, Touloumi O, et al. A novel transgenic mouse expressing double mutant tau driven by its natural promoter exhibits tauopathy characteristics. *Exp Neurol*. 2008; 212: 71-84.
- Ruitenbergh A**, den Heijer T, Bakker SLM, van Swieten JC, Koudstaal PJ, Hofman A, et al. Cerebral hypoperfusion and clinical onset of dementia: The Rotterdam study. *Ann Neurol*. 2005; 57: 789-794.
- Saeki K**, Nose Y, Hirao N, Takasawa R, Tanuma S. Amyloid precursor protein binding protein Fe65 is cleaved by caspases during DNA damage-induced apoptosis. *Biol Pharm Bull*. 2011; 34: 290-294.
- Salloway S**, Sperling R, Gilman S, Fox NC, Blennow K, Raskind M, et al. A phase 2 multiple ascending dose trial of bapineuzumab in mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology*. 2009; 73: 2061-2070.
- Sandberg A**, Luheshi LM, Söllvander S, Pereira de Barros T, Macao B, Knowles TPJ, et al. Stabilization of neurotoxic Alzheimer amyloid- $\beta$  oligomers by protein engineering. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107: 15595-15600.
- SantaCruz K**, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M et al. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science*. 2005; 309: 476-481.
- Schneeberger A**, Mandler M, Ottawa O, Zauner W, Mattner F, Schmidt W. Development of AFFITOPE vaccines for Alzheimer's disease (AD)-from concept to clinical testing. *J Nutr Health Aging*. 2009; 13: 264-267.
- Schwab C**, Hosokawa M, McGeer PL. Transgenic mice overexpressing amyloid beta protein are an incomplete model of Alzheimer disease. *Exp Neurol*. 2004; 118: 52-64.
- Selkoe DJ**. Alzheimer's disease: Genes, proteins and therapy. *Physiol Rev*. 2001; 81: 741-766.
- Shankar GM**, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, et al. Amyloid- $\beta$  protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med*. 2008; 14: 837-842.
- Siemers ER**, Friedrich S, Dean RA, Sheturaman G, DeMattos R, Jennings D, et al. Safety, tolerability and biomarker effects of an A $\beta$  monoclonal antibody administered to patients with Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2008; 4 (4suppl 2): T774.
- Smach MA**, Charfeddine B, Othman LB, Lammouchi T, Ltaief A, Nafati S, et al. -1154G/A and -2578C/A polymorphisms of the vascular endothelial growth factor gene in Tunisian Alzheimer patients in relation to  $\beta$ -amyloid (1-42) and total tau protein. *Neurosci Lett*. 2010; 472: 139-142.
- Snow AD**, Cummings J, Lake T, Hu Q, Esposito L, Cam J, et al. Exebryl-1: A novel small molecule currently in human clinical trials as a disease-modifying drug for the treatment of Alzheimer's disease. *Alzheimer Dement*. 2009; 5 (4 suppl 1): P418.
- Soares H**, Raha N, Sikpi M, Liston D, Brodny M, Coffman K, et al. A $\beta$  variability and effect of gamma secretase inhibition on cerebrospinal fluid levels of A $\beta$  in healthy volunteers. *Alzheimers Dement*. 2009; 5 (4 Suppl 1): P252-253.
- Storkebaum E**, Lambrechts D, Carmeliet P. VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *BioEssays*. 2004; 26: 943-954.
- Sun MK**, Alkon DL. Cerebral hypoperfusion and amyloid-induced synergistic impairment of hippocampal CA1 synaptic efficacy and spatial memory in young adult rats. *J Alzheimers Dis*. 2004; 6: 355-366.
- Takeda S**, Sato N, Takeuchi D, Kurinami H, Shinohara M, Niisato K, et al. Angiotensin receptor blocker prevented  $\beta$ -Amyloid-induced cognitive impairment associated with recovery of neurovascular coupling. *Hypertension*. 2009; 54: 1345-1352.
- Tarawneh R**, Holtzman DM. Critical issues for successful immunotherapy in Alzheimer's disease: development of biomarkers and methods for early detection and intervention. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2009; 8: 144-159.

- Tariot P**, Sabbagh M, Flitman S, Reyes P, Taber L, Seely L. A safety, tolerability and pharmacokinetic study of dimebon in patients with Alzheimer's disease already receiving donepezil. *Alzheimer's Dement.* 2009; 5(suppl 1): P251.
- Tarkowski E**, Issa R, Sjögren M, Wallin A, Blennow K, Tarkowski A, et al. Increased intrathecal levels of the angiogenic factors VEGF and TGF- $\beta$  in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurobiol Aging.* 2002; 23: 237-243.
- Terwel D**, Muyliaert D, Dewachter I, Borghgraef P, Croes S, Devijver H, et al. Amyloid activates GSK-3 $\beta$  to aggravate neuronal tauopathy in bigenic mice. *Am J Pathol.* 2008; 172: 786-798.
- Thal DR**. The precapillary segment of the blood-brain barrier and its relation to perivascular drainage in Alzheimer's disease and small vessel disease. *Scientific World Journal.* 2009; 9: 557-563.
- Thal DR**, Capetillo-Zarate E, Larionov S, Staufenbiel M, Zurbrugg S, Beckmann N. Capillary cerebral amyloid angiopathy is associated with vessel occlusion and cerebral blood flow disturbances. *Neurobiol Aging.* 2009; 30: 1936-1948.
- Thau-Zuchman O**, Shohami E, Alexandrovich AG, Leker RR. Vascular endothelial growth factor increases neurogenesis after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010; 30: 1008-1016.
- Thirumangalakudi L**, Samany PG, Owoso A, Wiskar B, Grammas P. Angiogenic proteins are expressed by brain blood vessels in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2006; 10: 111-118.
- Thuret S**, Toni N, Aigner S, Yeo GW, Gage FH. Hippocampus-dependent learning is associated with adult neurogenesis in MRL/MpJ mice. *Hippocampus.* 2009; 19: 658-669.
- Tobinick EL**, Gross H. Rapid improvement in verbal fluency and aphasia following perispinal etanercept in Alzheimer's disease. *BMC Neurol.* 2008; 8: 27.
- Ullrich C**, Pirchl M, Humpel C. Hypercholesterolemia in rats impairs the cholinergic system and leads to memory deficits. *Mol Cell Neurosci.* 2010; 45: 408-417.
- Vagnucci AH**, Li WW. Alzheimer's disease and angiogenesis. *Lancet.* 2003; 361: 605-608.
- Vossel KA**, Zhang K, Brodbeck J, Daub AC, Sharma P, Finkbeiner S, et al. Tau reduction prevents Abeta-induced defects in axonal transport. *Science.* 2010; 330: 198.
- Van Uden E**, Mallory M, Veinbergs I, Alford M, Rockenstein E, Masliah E. Increased extracellular amyloid deposition and neurodegeneration in human amyloid precursor protein transgenic mice deficient in receptor-associated protein. *J Neurosci.* 2002; 22: 9298-9304.
- Verret L**, Jankowsky JL, Guillian MX, Borchelt DR, Rampon C. Alzheimer's type amyloidosis in transgenic mice impairs survival of newborn neurons derived from adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci.* 2007; 27: 6771-6780.
- Wang Y**, Jin K, Mao XO, Xie L, Banwait S, Marti HH, et al. VEGF-overexpressing transgenic mice show enhanced post-ischemic neurogenesis and neuromigration. *J Neurosci Res.* 2007; 85: 740-747.
- Wang YQ**, Guo X, Qiu MH, Feng XY, Sun FY. VEGF overexpression enhances striatal neurogenesis in brain of adult rat after a transient middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Res.* 2007; 85: 73-82.
- Waring SC**, Rosenberg RN. Genome-wide association studies in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2008; 65: 329-334.
- Willen M**, Dewachter I, Smyth N, Van Dooren T, Borghgraef P, Haass C, et al.  $\beta$ -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 increases amyloid deposition in brain parenchyma but reduces cerebrovascular amyloid angiopathy in aging BACE x APP[V717I] Double-transgenic mice. *Am J Pathol.* 2004; 165: 1621-1631.
- Winblad BG**, Minthon L, Floesser A, Imbert G, Dumortier T, He Y, et al. Results of the first-in-man study with the active A $\beta$  immunotherapy CAD106 in Alzheimer patients. *Alzheimers Dement.* 2009; 5 (4suppl1): 113-114.
- Wines-Samuelson M**, Schulte EC, Smith MJ, Aoki C, Liu X, Kelleher RJ, et al. Characterization of age-dependent and progressive cortical neuronal degeneration in *Presenilin* conditional mutant mice. *PLoS ONE.* 2010; 5: e10195.

- Wollmer MA.** Cholesterol-related genes in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1801: 762-773.
- Wu Z,** Guo H, Chow N, Sallstrom J, Bell RD, Deane R, et al. Role of the MEOX2 homeobox gene in neurovascular dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Med.* 2005; 11: 959-965.  
[www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)  
[www.nsgene.dk](http://www.nsgene.dk)
- Yamada M,** Ihara M, Okamoto Y, Maki T, Washida K, Kitamura A, et al. The influence of chronic cerebral hypoperfusion on cognitive function and amyloid  $\beta$  metabolism in APP overexpressing mice. *PLoS ONE.* 2011; 6: e16567.
- Yang SP,** Bae DG, Kang HJ, Gwag BJ, Gho YS, Chae CB. Co-accumulation of vascular endothelial growth factor with beta-amyloid in the brain of patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2004; 25: 283-290.
- Yasuhara T,** Shingo T, Muraoka K, Wen JY, Kameda M, Takeuchi A, et al. The differences between high and low-dose administration of VEGF to dopaminergic neurons of in vitro and in vivo Parkinson's disease model. *Brain Res.* 2005; 1038: 1-10.
- Yu Y,** He J, Zhang Y, Luo H, Zhu S, Yang Y, et al. Increased hippocampal neurogenesis in the progressive stage of Alzheimer's disease phenotype in an APP/PS1 double transgenic mouse model. *Hippocampus.* 2009; 19: 1247-1253.
- Zhang C,** Wu B, Beglopoulos V, Wines-Samuelson M, Zhang D, Dragatsis I, et al. Presenilins are essential for regulating neurotransmitter release. *Nature.* 2009; 460: 632-637.
- Zhou JP,** Feng ZG, Yuan BL, Yu ZS, Li Q, Qu HY, Sun MJ. Transduced PTD-BDNF fusion protein protects against beta amyloid peptide-induced learning and memory deficits in mice. *Brain Res.* 2008; 1191: 12-19.
- Ziabreva I,** Perry E, Perry R, Minger SL, Ekonomou A, Przyborski S, et al. Altered neurogenesis in Alzheimer's disease. *J Psychosom Res.* 2006; 61: 311-316.
- Zlokovic BV.** Vascular disorder in Alzheimer's disease: role in pathogenesis of dementia and therapeutic targets. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002; 54: 1553-1559.
- Zlokovic BV.** Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 2005; 28: 202-208.