



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

**Un nuovo modello murino per la
malattia di Alzheimer:
caratterizzazione morfologica e
cognitivo-comportamentale del topo
congenico C.B6/J-*APP*_{swe}**

Relatore: Chiar.mo
Prof. Fiorenzo Conti

Tesi di Laurea di:
Andrea Brancaleoni

Correlatore: Dott.ssa
Marta Baliaetti

A.A. 2019/2020

INDICE

Introduzione	1
<i>Alterazioni cognitive e non cognitive nella malattia di Alzheimer</i>	3
<i>Modelli animali</i>	5
<i>Scopo del progetto</i>	6
Materiali e Metodi	7
Risultati	17
CURVE DI SOPRAVVIVENZA E CRESCITA.....	17
WESTERN BLOT	18
TEST ELISA.....	19
IMMUNOISTOCHEMICA.....	20
<i>Accumulo di β-amiloide</i>	20
<i>Neurodegenerazione</i>	22
<i>Densità sinaptica</i>	22
<i>Neuroinfiammazione</i>	23
<i>Livello di fosforilazione di tau</i>	26
TEST COMPORTAMENTALI	28
<i>Open Field test</i>	28
<i>Novel Object Recognition test</i>	30
<i>Elevated Plaze Maze test</i>	30
<i>Morris Water Maze test</i>	31
<i>Radial Arm Water Maze test</i>	32
Discussione	34
Bibliografia	41

Introduzione

La malattia di Alzheimer (MA) è stata riconosciuta dall'Organizzazione Mondiale della Sanità come una priorità per la salute pubblica (https://www.who.int/mental_health/neurology/dementia/policy_guidance/en/); essa colpisce circa 44 milioni di persone in tutto il mondo e rappresenta il 50-75 % di tutti i casi di demenza (Lane et al., 2018). In Europa si stima una prevalenza del 5,03 % e un'incidenza di 11,08 ogni 1.000 abitanti/anno, con entrambi gli indici in aumento (Niu et al., 2017). È previsto che il numero di pazienti quadruplicherà entro il 2050, con 1 su 85 persone che vivranno con la patologia (McLaughlin et al., 2010).

A livello istopatologico, la MA è caratterizzata dalla presenza di placche amiloidi e grovigli neurofibrillari; inoltre, si osservano alterazioni del neuropilo, neurodegenerazione, astrogliosi, attivazione microgliale e spesso angiopatia amiloide cerebrale (Lane et al., 2018). Le placche amiloidi sono accumuli extracellulari costituiti da peptidi di β amiloide ($A\beta$) derivati dalla scissione della proteina transmembranaria APP (*Amiloid Precursor Protein*) ad opera delle β - e γ -secretasi (via amiloidogenica). I peptidi $A\beta$ sono oligomeri altamente solubili mentre le placche amiloidi, a formazione più tardiva, sono insolubili e progressivamente più compatte: tale distinzione è fondamentale perché si è sempre più unanimemente concordi sul fatto che le placche amiloidi non siano una buona misura del danno cerebrale nella MA (Gouras et al., 2015), mentre ci sono prove sperimentali che gli oligomeri solubili sono causa di disfunzione sinaptica nelle prime fasi della malattia (per esempio, blocco dei recettori NMDA del glutammato ed interferenza con l'omeostasi del calcio) (Klein et al., 2001). I grovigli neurofibrillari sono il risultato dell'iperfosforilazione di tau (p-Tau), una proteina che partecipa ai processi di assemblaggio e stabilizzazione dei microtubuli: p-Tau si accumula, prima in forma oligomerica e poi nei caratteristici grovigli altamente insolubili, all'interno dei neuroni – in particolare negli assoni – contribuendo alle alterazioni sinaptiche e alla morte neuronale. $A\beta$ contribuisce alla fosforilazione di tau attraverso l'attivazione di numerose chinasi e si ritiene che tau svolga un ruolo centrale nella tossicità mediata da $A\beta$ (Ittner et al., 2010). $A\beta$ e i grovigli neurofibrillari inducono alterazioni strutturali/metaboliche/funzionali nei neuroni e aumento dello *stress* ossidativo con infiltrazioni microgliali attorno alle placche amiloidi (Gao et al., 2018; Tiwari et al., 2019). Studi recenti hanno dimostrato che un aumento della neuroinfiammazione dovuta alla

microglia porta ad un aumento dell'iperfosforilazione di tau (Gao et al., 2018), sottolineando ulteriormente l'interdipendenza dei vari fenomeni.

In Figura 1 sono schematizzati le principali caratteristiche istopatologiche della MA.

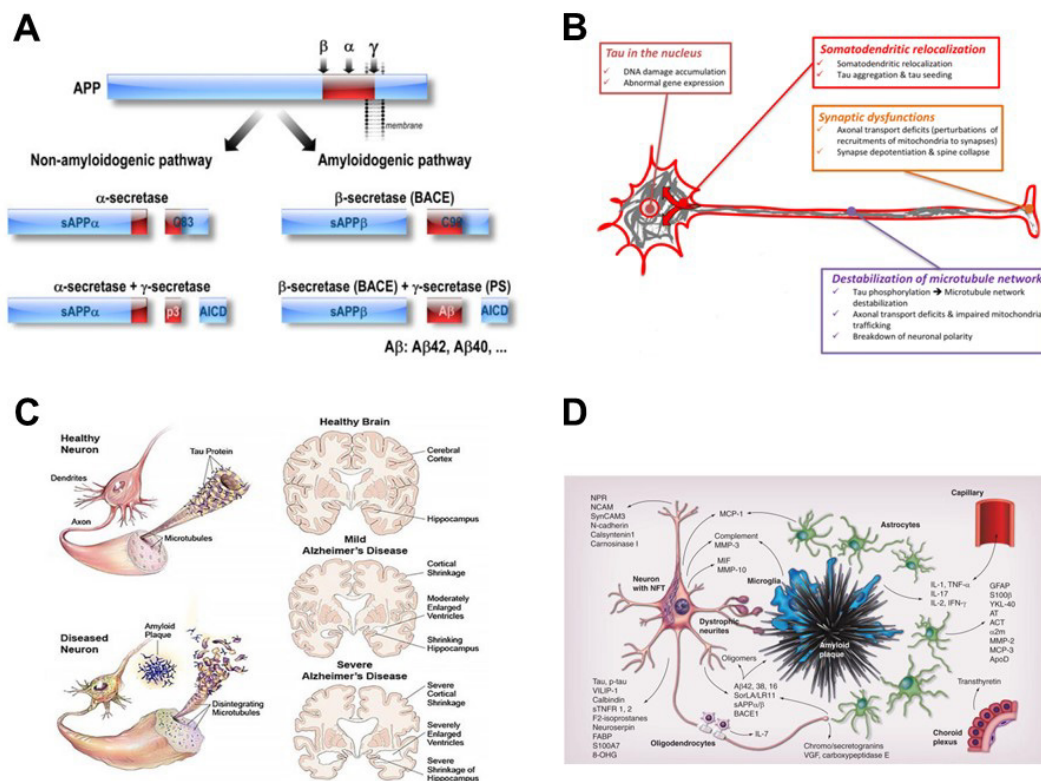


Figura 1. (A) Confronto tra l'elaborazione non amiloidogena e quello amiloidogena dell'*Amyloid Precursor Protein* (APP). Dalla via non amiloidogena vengono prodotti l'sAPPα (fattore neuroprotettivo), il p3 e l'AICD (*APP Intracellular Domain*). Dalla via amiloidogena originano principalmente i peptidi Aβ₄₀ e Aβ₄₂: Aβ₄₀ è più abbondante ma meno tossico; Aβ₄₂ è maggiormente pronò all'aggregazione e funge da *trigger* principale per la formazione delle fibrille. Immagine tratta da Del Prete e colleghi (2014). **(B) Danni neuronali indotti da tau iperfosforilata.** La tau fosforilata anormalmente destabilizza la rete dei microtubuli, con conseguenti alterazioni del trasporto assonico e nel *trafficking* mitocondriale; l'inadeguato supporto energetico porta al depotenziamento delle sinapsi e al collasso delle spine dendritiche; a livello nucleare, l'accumulo della proteina porta a danni del DNA. Modificato da Colin e colleghi (2019). **(C) Schema delle principali alterazioni patologiche.** Il cervello di un paziente affetto da Malattia di Alzheimer presenta una grave riduzione della neocorteccia e dell'ippocampo, associata ad un marcato allargamento dei ventricoli. Fonte: BrightFocus® Foundation. **(D) Rappresentazione dell'infiammazione attorno ad una placca amiloide.** Gli astrociti attivati (in verde) producono una serie di mediatori infiammatori (per esempio, MMP-2, MMP-3, YKL-40), mentre la microglia attivata (in blu) forma infiltrati all'interno della placca amiloide. I neuroni limitrofi vengono danneggiati a seguito del patologico *crosstalk* che instaurano con le cellule gliali che stimola anche l'aumento dell'iperfosforilazione di tau. Immagine tratta da Fagan e colleghi (2012).

Alterazioni cognitive e non cognitive nella malattia di Alzheimer

Nella MA le alterazioni istopatologiche non sono presenti in tutto il cervello in maniera uniforme ma colpiscono alcune regioni specifiche: la corteccia entorinale, l'ippocampo, la neocorteccia e i nuclei della base (Arnold et al., 1991). Tecniche di *neuroimaging in vivo* (MRI, fMRI e PET-FDG) hanno dimostrato la presenza di una significativa riduzione dello spessore corticale (*voxel based morphometry*) e ipometabolismo cerebrale nella fase antecedente alla comparsa dei sintomi (Jack et al., 1999; Weissberger et al., 2017), suggerendo che la MA sia causata da una serie di alterazioni strutturali e funzionali che si instaurano molto prima che si possa giungere ad una probabile/possibile diagnosi – ricordando che il *gold standard* resta l'esame autoptico. Questo ritarda e rende meno efficace ogni intervento terapeutico.

Le manifestazioni cliniche della MA sono piuttosto eterogenee anche se l'elemento centrale è rappresentato da un *deficit* selettivo della memoria dichiarativa, sia semantica sia episodica. In particolare, il *deficit* di memoria episodica riflette un'alterazione di codifica e ritenzione, ma anche di recupero (Eldridge et al., 2000; Roy et al., 2016), cui consegue amnesia anterograda nelle fasi iniziali e, più tardivamente, amnesia retrograda e problemi nell'elaborazione di concetti espressi in forma scritta e/o orale (Isik., 2010). Queste alterazioni sono spesso associate ad un *deficit* di memoria spaziale e, di conseguenza, a disorientamento spazio-temporale (Tromp et al., 2015) che sembrano riconducibili alla precoce disfunzione dell'ippocampo, dove le aree CA1 e CA3, il giro dentato e l'adiacente corteccia entorinale formano un circuito con un ruolo fondamentale nella formazione di nuove memorie (Muller et al., 1987; Rotenberg et al., 1996; Kandel et al., 2019). Alle disfunzioni della memoria spaziale contribuiscono anche altre aree, tra cui la corteccia cingolata posteriore (CCP), il lobo parietale posteriore e la corteccia prefrontale. Particolare attenzione è stata riservata alla corteccia retrospleniale, parte della CCP, in cui si sviluppano molto precocemente atrofia e riduzione del metabolismo (Nestor et al., 2003; Pengas et al., 2008). La corteccia retrospleniale è coinvolta nell'orientamento (Pengas et al., 2012), in quanto parte di un circuito neuronale che medierebbe tra le rappresentazioni egocentriche della corteccia parietale posteriore, sede di integrazione di percezioni multimodali, e la rappresentazione allocentrica che si forma nel circuito ippocampale (Byrne et al., 2007; Vann et al., 2009; Vlček et al., 2014).

Gli stadi iniziali della MA sono caratterizzati anche dall'alterazione delle funzioni esecutive e della memoria a breve termine (*working memory*, WM) che contribuiscono, insieme con il *deficit* della memoria episodica (ma in maniera indipendente da esso) al disorientamento spaziotemporale (Yew et al., 2013). La WM è alla base di numerose attività cognitive grazie al mantenimento delle rappresentazioni correnti, anche se transitorie, di processi cognitivi rilevanti per un particolare scopo (Baddeley, 2007). Sebbene per lungo tempo si sia pensato che l'alterazione della WM nella MA dipendesse dalla disfunzione del centro operativo della corteccia prefrontale (Baddeley, 1992), studi successivi hanno dimostrato una correlazione con la diminuzione del metabolismo nei lobi temporale e parietale inferiore (Kobylecki et al., 2017). Un altro dominio mnestico colpito nella MA è la *prospective memory* (PM). La PM fa riferimento ai processi e alle abilità implicate nel ricordo di intenzioni che devono essere realizzate nel futuro e, nonostante possa essere considerata come una parte della memoria semantica, viene valutata come un aspetto a sé stante per la particolare importanza funzionale che riveste nella vita quotidiana. Sebbene molti studi neuropsicologici suggeriscano che nella PM siano implicate le aree prefrontali, è stato dimostrato che anche una perdita neuronale nel lobo temporale mediale possa causarne *deficit* (Spindola and Brucki, 2011). Nella MA si riscontrano anche alterazioni visuospatiali e visuoperceptivi, dovuti all'interessamento delle vie visive extrastriate dorsale e, in misura maggiore, ventrale (Kurylo and Corkin, 1996; Kirby et al., 2010), che determinano problemi nel riconoscimento di immagini visive (*object recognition*) e nella percezione di relazioni spaziali (Isik, 2010; Atri, 2019). Tuttavia, non è al momento chiaro quanto il *deficit* di attenzione conseguente alla degenerazione del prosencefalo basale e particolarmente del nucleo basale di Meynert (Lawrence and Sahakian, 1995) possa influire sulle capacità visive e visuospatiali. Alcuni studi sembrano suggerire che il *deficit* visivo vada attribuito principalmente al *deficit* di attenzione, mentre il *deficit* visuospatiali ad una alterazione della WM (Alescio-Lautier et al., 2007).

La MA è comunemente associata ad una serie di sintomi non cognitivi (*Non Cognitive Behavioral Change*, NCBC) quali apatia, depressione, disforia, isolamento sociale, ansia, perdita delle inibizioni, illusioni o allucinazioni a contenuto paranoico o persecutorio (Mega et al., 1996; Chung and Cummings, 2000). Inizialmente si riteneva che questi fossero una conseguenza non specifica e tardiva della neurodegenerazione e del conseguente declino cognitivo globale (Brien et al., 2008), ma sempre più studi ne hanno rilevato la presenza in

fase precoce ed alcuni suggeriscono che la loro gravità correli con l'accumulo di A β (Lussier et al., 2020). La fisiopatologia degli NCBC è ancora poco chiara: sono stati identificati alcuni substrati neurologici tramite *imaging* multimodale, ma gli studi a riguardo sono pochi e discordanti. Nell'apatia, sintomo più frequentemente riscontrato, sono coinvolte la corteccia cingolata anteriore (CCA), alcune aree della corteccia prefrontale e lo striato (circuito cortico-striato-talamo-corticale) con una perdita di volume nella CCA particolarmente significativa; nella depressione sembrano coinvolte le cortecce prefrontale laterale e prefrontale superiore, nell'aggressività e nell'agitazione la corteccia insulare e la CCA (Victoroff et al., 2017).

Modelli animali

Malgrado i progressi fatti nella comprensione dei meccanismi patogenetici e il notevole avanzamento nelle tecniche diagnostiche (per esempio, *neuroimaging*, *biomarker* liquorali, questionari clinici e valutazioni neuropsicologiche sempre più capaci di diagnosticare la malattia in fase precoce) (Dubois et al., 2009), non ci sono attualmente protocolli terapeutici capaci di cambiare il corso della MA e solo due classi di farmaci – gli inibitori della colinesterasi e gli antagonisti del recettore NMDA del glutammato – sono state approvate per il suo trattamento (Briggs et al., 2016). Negli ultimi anni l'immunoterapia con peptidi A β ha attratto un crescente interesse per la potenziale capacità di ridurre la tossicità dei frammenti amiloidogenici; purtroppo si sono riscontrate reazioni avverse (per esempio, meningoencefaliti), conseguenza di un'eccessiva risposta Th1-mediata, che hanno fatto interrompere gli studi clinici che erano stati avviati (Schenk, 2002; Lemere, 2009).

Sono quindi necessarie ulteriori ricerche volte ad approfondire i processi patogenetici e a valutare/testare nuove strategie terapeutiche. Effettuare questo tipo di studi con approccio *human-based* presenta diverse limitazioni, sia tecniche (per esempio, variabilità genetica, ambientale e di stile di vita, nonché difficoltà nell'individuare coorti omogenee da un punto di vista clinico dovute all'incertezza diagnostica, soprattutto in fase precoce) sia etiche (per esempio, necessità di approcci invasivi) (Davis, 2017). Per questo motivo, accurati modelli animali geneticamente modificati possono essere utili nel garantire una traslazione affidabile dalla ricerca preclinica a quella clinica. Il modello ideale dovrebbe mimare tutti gli aspetti della malattia, inclusi la progressione nel tempo e il coinvolgimento di strutture anatomiche omologhe a quelle coinvolte nell'uomo, ma soprattutto dovrebbe replicare, per quanto possibile, le alterazioni cognitive e non cognitive tipiche della MA (Do Carmo and Cuello,

2013). Allo stato attuale nessun modello risponde a tali requisiti (Drummond and Wisniewski, 2018).

Scopo del progetto

Nel nostro laboratorio è stato creato un topo congenico (C.B6/J-*APP_{swe}*) introducendo il gene *APP_{swe}* nel *background* genetico del topo Balb-c dal topo Tg2576 (Hsiao et al., 1996). I topi Balb-c hanno elevate capacità riproduttive, le femmine sono ottime “balie”, e i maschi mostrano una ridotta aggressività rispetto ad altri ceppi. L’eccessiva aggressività riscontrata in diversi modelli murini di MA (Vloeberghs et al., 2006; Pugh et al., 2007; Alexander et al., 2011) determina una significativa, prematura, mortalità che rende difficile studiare le fasi avanzate della malattia, obbligando, tra l’altro, alla stabulazione singola soprattutto dei maschi, creando così una situazione di deprivazione ambientale che può influenzare negativamente l’esito delle ricerche. I topi Balb-c hanno un’altra caratteristica molto interessante, ovvero una risposta Th2 polarizzata (Kuroda et al., 2000; Cao et al., 2008) che li rende particolarmente utili per testare nuove procedure di vaccinazione con peptidi A β ; infatti, i topi Balb-c non transgenici sono stati ampiamente utilizzati per studiare nuovi epitopi (Qu et al., 2010; Hoogerhout et al., 2011) e strategie adiuvanti (He et al., 2005; Cao et al., 2008).

In questo studio vogliamo caratterizzare da un punto di vista morfologico e cognitivo il modello CB6/J-*APP_{swe}* in modo da avere una prospettiva realistica della sua capacità di mimare la MA. Ci aspettiamo che la potenziale minore aggressività possa determinare una maggiore sopravvivenza degli animali ed agevolare così l’indagine delle fasi avanzate e un minor ricorso all’isolamento, con conseguente miglioramento della valutazione cognitivo-comportamentale (Mumtaz et al., 2018). Ci aspettiamo inoltre che il topo CB6/J-*APP_{swe}* mantenga le caratteristiche che hanno reso il topo Tg2576 uno dei modelli maggiormente impiegati negli studi preclinici della MA.

Materiali e Metodi

Tutte le procedure sono state condotte in accordo alla legislazione dell'Unione Europea (Direttiva 2010/63/EU) e approvate dal Ministero della Salute (168/2016-PR).

ANIMALI

Il topo congenico C.B6/J-*APP_{swe}* è stato creato introducendo il gene umano mutato *APP_{swe}* (trasversione di 2 paia di basi – G a T e A a C – a livello dei codoni 670 e 671 che determina Lys⁶⁷⁰ → Asn e Met⁶⁷¹ → Leu) in un *background* genetico Balb-c a partire da un *milieu* misto C57BL/6 e SJL (topo Tg2576, Taconic Biosciences, Inc) attraverso 10 *backcross*. Il trasferimento del transgene è stato confermato tramite PCR eseguita su un campione biotico prelevato dalle code degli animali. Il nome del nuovo modello murino è stato definito in accordo alle “*Guidelines for Nomenclature of Mouse and Rat Strains*” (<http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/strains.shtml>).

Gli animali sono stati stabulati in gabbie di plastica (4/6 topi) dotate di oggetti di arricchimento quali *tunnel* di cartone, carta nido e bastoncini di legno. I parametri ambientali sono stati costantemente monitorati (temperatura di 20-22 °C, umidità relativa del 50-55 % e ciclo artificiale luce/buio di 12 ore), lasciando libero accesso a cibo ed acqua. Lo stato di salute dei topi è stato valutato dal Veterinario Designato e gli animali in condizioni giudicate non idonee sono stati esclusi.

CURVE DI SOPRAVVIVENZA E CRESCITA

Sessanta topi *Wild Type* – senza transgene – e sessanta topi C.B6/J-*APP_{swe}* (50 % femmine e 50 % maschi) sono stati seguiti, a partire dall'8a settimana di vita, fino alla morte naturale. Il peso corporeo di ciascun animale è stato misurato settimanalmente.

WESTERN BLOT

Dodici topi *Wild Type* e 12 topi C.B6/J-*APP_{swe}* (50 % femmine e 50 % maschi) di 3, 6, 9, 12 e 16-18 mesi di età sono stati sacrificati per dislocazione cervicale. Gli ippocampi e le cortecce cerebrali *in toto* sono stati rimossi e omogenizzati in un tampone di lisi (2 % SDS, 0,2 % PMSF, 1 % aprotinina e 0,2 % leupeptina; 5 % peso del tessuto/volume del tampone), sonicati (8 µm di ampiezza per 30 secondi) e centrifugati a 10.000xg per 1 ora a 10 °C. I sovrantanti sono stati raccolti e mantenuti a -80 °C fino al momento dell'uso. Laddove non diversamente specificato, le procedure sono state condotte a 4 °C. La concentrazione di proteine è stata determinata con il metodo di Lowry (Lowry et al., 1951) e 30 µg sono stati utilizzati, previa verifica con *test* di linearità. I campioni sono stati fatti bollire per 3 minuti

e separati utilizzando *gel* di poliacrilammide al 4-20 % (Bio-Rad Laboratories, Inc). Le proteine sono state quindi trasferite dai *gel* alle membrane di nitrocellulosa e queste ultime sono state successivamente incubate in *fat dry milk* al 5 % in tampone fosfato in soluzione salina (PBS) più Tween al 10 % (*blocking buffer*) a 4 °C *overnight*. Le membrane sono state incubate negli anticorpi primari (6E10 (1:1.000, BioLegend) per l'APP umana; 22C11 (1:1.000, Millipore) per l'APP umana e murina) per 2 ore a temperatura ambiente. Dopo i lavaggi nel *blocking buffer*, le membrane sono state incubate con l'anticorpo secondario coniugato con perossidasi di rafano (ImmunoReagents) diluito 1:8.000 in *blocking buffer* e visualizzate usando un *kit* di rilevazione della chemiluminescenza (Amersham Biosciences). L'analisi quantitativa è stata eseguita mediante *imaging* computerizzato (KS300, Zeiss). Le densità ottiche delle bande sono state normalizzate usando l'actina (1:1.000, Millipore) come *housekeeping*.

TEST ELISA

Dodici topi C.B6/J-APP_{swe} (50 % femmine e 50 % maschi) di 3, 6, 9, 12 e 16-18 mesi di età sono stati sacrificati per dislocazione cervicale. Gli ippocampi e le cortecce cerebrali *in toto* sono stati rimossi, pesati e congelati in azoto liquido fino all'utilizzo. La concentrazione dei frammenti A β ₄₀ e A β ₄₂ (solubili ed insolubili e quindi *trigger* per la formazione delle placche amiloidi) è stata determinata tramite l'uso di *kit* ELISA commerciali (Thermo Fisher Scientific) in accordo alle istruzioni riportate. Tutti i campioni sono stati testati in doppio e i risultati espressi in pg/ml.

IMMUNOISTOCIMICA

Otto topi *Wild Type* e 8 topi C.B6/J-APP_{swe} (50 % femmine e 50 % maschi) di 3, 6, 9, 12 e 16-18 mesi di età saranno anestetizzati tramite iniezione intraperitoneale di 2,2,2-tribromoetanolo (200 mg/kg di peso corporeo) e perfusi con paraformaldeide al 4 % in tampone fosfato (PB). Dagli animali già sacrificati, i cervelli sono stati espantati e *post-fissati* per 24 ore a 4 °C. Entrambi gli emisferi sono stati sezionati tramite vibratomo in sezioni trasversali di 40 μ m di spessore a partire dall'inizio dell'ippocampo dorsale fino alla comparsa dell'ippocampo ventrale, ovvero da 1.340 a 2.460 μ m caudalmente al bregma. Le sezioni sono state lavate in PBS, trattate con acido formico al 70 % (solo per gli anticorpi 6E10 e 4G8), permeabilizzate con lo 0,1 % di Triton-X, e bloccate in una soluzione al 10 % di *normal horse serum* con l'aggiunta di Triton-X allo 0,1 %. Gli anticorpi primari (6E10 (1:1.000, BioLegend); 4G8 (1:1.000, BioLegend); anti-NeuN (1:1.000, Millipore); anti-

sinaptofisina (1:250, Millipore); anti-GFAP (1:1.000, Millipore); anti-iba1 (1:1.000, Wako); anti-ptau (1:20, Thermo Fisher Scientific)) (Tabella 1) sono stati diluiti in PBS contenente *normal horse serum* all'1 % e Triton-X allo 0,1 % e le sezioni sono state incubate *overnight* a 4 °C. L'anticorpo secondario biotinilato (Vector Laboratories) è stato diluito 1:200 in PBS contenente l'1,5 % di *normal horse serum* e le sezioni sono state incubate per 2 ore a temperatura ambiente. Dopo trattamento con 3 % di H₂O₂, le sezioni sono state mantenute nel complesso avidina-biotina perossidasi (1:50) per 1 ora; quindi, sono state trattate con una soluzione al 3 % di 3,3-diaminobenzidinatetraidrocloreuro e, dopo diversi lavaggi, montate su vetrino, deidratate in una scala crescente di etanolo, delipidate in xilene e coperte. I controlli sono stati preparati omettendo l'anticorpo primario. L'analisi quantitativa - densitometria (6E10, 4G8, sinaptofisina, p-Tau) e conta cellulare (NeuN, GFAP, iba1) - è stata eseguita mediante *imaging* computerizzato (KS300, Zeiss).

Tabella 1. Caratteristiche degli anticorpi primari

6E10	L'anticorpo 6E10 reagisce con i residui amminoacidici 4-10 dell'APP umana, mentre l'anticorpo 4G8 con i residui amminoacidici 17-21 dell'APP sia umana sia murina. Entrambi gli anticorpi riconoscono sia la molecola intera sia i frammenti che derivano dal suo processamento amiloidogenico; l'anticorpo 4G8 lega preferenzialmente le strutture a β -sheet delle fibrille ed è quindi più adatto per l'identificazione delle placche amiloidi (Baghallab et al., 2018).
4G8	
NeuN	NeuN (<i>neuron-specific nuclear protein</i>) è una proteina espressa esclusivamente dai neuroni. La sua funzione non è stata ancora del tutto chiarita, ma sembra avere un ruolo regolatorio a livello nucleare (Mullen et al., 1992). È stato dimostrato che essa scompare nei neuroni piramidali ippocampali danneggiati o morenti (Gusel'nikova and Korzhevskiy, 2015), garantendo quindi una valutazione della neurodegenerazione anche in fase iniziale.
sinaptofisina	La sinaptofisina è una glicoproteina delle vescicole sinaptiche ed è un indicatore della densità sinaptica. L'alterazione funzionale e strutturale delle sinapsi costituisce uno dei più importanti e precoci <i>marker</i> della malattia di Alzheimer (Selkoe, 2002).
GFAP	GFAP (<i>glial fibrillary acid protein</i>) e iba1 (<i>ionized calcium-binding adaptor molecule</i>) sono proteine espresse specificamente dalle cellule astrocitarie e microgliali, rispettivamente; la concentrazione di GFAP aumenta in caso di reazione astrocitaria, mentre iba1 è <i>iper</i> -espressa durante l'attivazione microgliale (Goss et al., 1991; Ito et al., 1998). Astrogliosi e microgliosi sono aspetti chiave dell'istopatologia della malattia di Alzheimer.
iba1	
p-Tau	Se iperfosforilata e fosforilata in maniera anomala, ovvero in siti diversi da quelli funzionali, tau subisce alterazioni che contribuiscono al disassemblaggio del citoscheletro neuronale con conseguenze gravi e progressive sui neuroni.

TEST COMPORTAMENTALI

Sedici topi *Wild Type* e 16 topi C.B6/J-*APP_{swe}* (50 % femmine e 50 % maschi) di 3, 6, 9, 12 e 16-18 mesi di età sono stati testati. Gli animali già valutati sono stati sottoposti ad *handling* per 5 minuti al giorno per 5 giorni consecutivi, al fine di farli abituare all'operatore e alla stanza di svolgimento dei *task*. La stanza è stata debolmente illuminata, in maniera diffusa e dal basso verso l'alto in corrispondenza dei 4 angoli. I *test* a cui gli animali sono stati sottoposti sono, in sequenza temporale: *Open Field test (OF)*, *Novel Object Recognition test (OR)*, *Elevated Plus Maze test (EPM)*, *Morris Water Maze test (MWM)*, e *Radial Arm Water Maze test (RAWM)*. Questi protocolli sono stati selezionati per valutare la locomozione, la memoria di riconoscimento, il livello di ansia, la memoria spaziale a lungo termine e la *working* e la *reference memory* spaziali, rispettivamente. Le *performance* degli animali sono state registrate da una videocamera connessa ad un *computer* ed analizzate tramite il *software* EthoVision XT10 (Noldus). Prima e dopo ogni *test*, tutta la strumentazione è stata pulita con etanolo al 70 % per eliminare possibili segnali olfattivi interferenti.

Open Field test (OF)

L'arena per l'OF consiste in un *box* quadrato di 60x60 cm e di 30 cm di altezza, digitalmente diviso in 16 aree di 15x15 cm (Figura 2A). Ogni animale è stato testato singolarmente rilasciandolo al centro dell'arena e lasciandolo libero di esplorarla per 5 minuti. I parametri analizzati sono stati: distanza totale percorsa, velocità media, e numero di attraversamenti delle linee di demarcazione delle aree.

Novel Object Recognition test (OR)

Il *test* è stato svolto in un'arena quadrata delle dimensioni di 35x35 cm e 30 cm di altezza. Il primo giorno l'animale è stato lasciato libero di esplorare l'arena vuota per cinque minuti (*habituation*); il giorno successivo gli animali sono stati rilasciati nell'arena, in presenza di due oggetti identici (*familiarization session*). I topi che non hanno esplorato (muso posizionato entro 2 cm intorno all'oggetto) per almeno 20 secondi sono stati esclusi; 24 ore dopo, un oggetto familiare è stato sostituito con uno nuovo e i topi sono stati rimessi nell'arena per una sessione di 10 minuti (*test*) (Figura 2B). Gli oggetti sono stati scelti in accordo con Leger e colleghi (2013). Durante il *test*, la disposizione degli oggetti è stata controbalanciata in modo tale che metà degli animali di ogni gruppo ha avuto l'oggetto nuovo sul lato destro e metà sul lato sinistro (Hernandez-Rapp et al., 2015). Il tempo speso esplorando l'oggetto nuovo e quello speso esplorando l'oggetto familiare sono stati misurati.

L'attività esplorativa è stata definita sulla base del seguente indice: $(\text{Tempo speso intorno all'oggetto nuovo} / (\text{Tempo speso intorno all'oggetto familiare} + \text{Tempo speso intorno all'oggetto nuovo})) \times 100$.

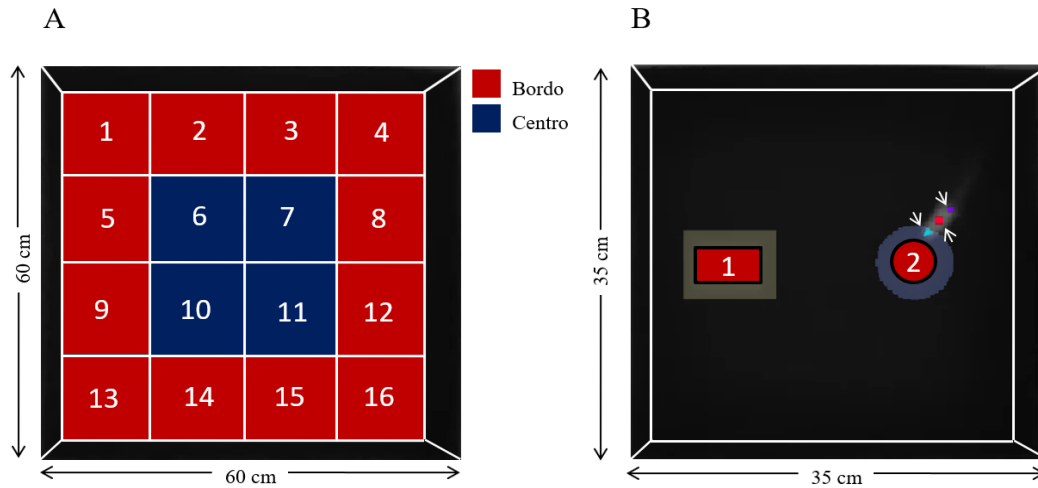


Figura 2. (A) *Open Field test setting*: delle 16 aree in cui l'arena viene suddivisa, le 12 esterne individuano il bordo e le 4 interne il centro. **(B) *Novel Object Recognition test setting*:** visualizzazione degli oggetti 1 e 2 e delle zone circostanti di esplorazione; le frecce indicano i punti del topo tracciati dal *software* di analisi di immagine, ovvero naso, baricentro e base della coda.

Elevated Plaze Maze test (EPM)

L'arena è formata da quattro bracci (due chiusi e due aperti) che misurano 5 cm in larghezza e 30 cm in lunghezza, 15 cm in altezza il braccio chiuso e 0,25 cm in altezza il braccio aperto; i bracci si estendono da una zona centrale di 5x5 cm; l'apparato è rialzato da terra di 60 cm (Figura 3). Ogni topo è stato posto nella parte centrale dell'arena con il muso rivolto verso uno dei bracci aperti ed è stato lasciato libero di esplorare per 5 minuti con lo sperimentatore fuori dal campo visivo. Il grado di ansia è stato definito dalla percentuale di tempo che l'animale ha trascorso nei bracci aperti, assumendo che maggiore sia questo tempo, minore sia il grado di ansia (Walf and Frye, 2007).

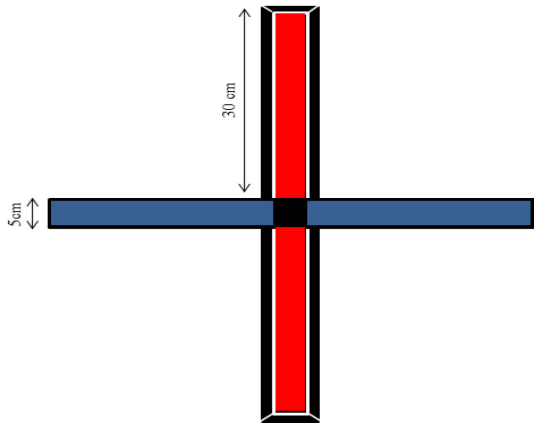


Figura 3. *Elevated Plus Maze test setting*: le aree rosse indicano i bracci chiusi e quelle blu i bracci aperti.

Morris Water Maze test (MWM)

È stata usata una vasca circolare di 110 cm di diametro e 25 cm di altezza riempita con acqua opaca (22 ± 5 °C) e digitalmente divisa in quattro quadranti: Nord Est, Sud Est, Nord Ovest, Sud Ovest (Figura 4). Una piattaforma cilindrica trasparente di 10 cm di diametro è stata posizionata nel quadrante Sud Ovest, 1 cm sotto il livello dell'acqua; numerose *cue* sono state fissate intorno alla vasca per fornire agli animali dei riferimenti spaziali. Nei primi cinque giorni (*training*), i topi sono stati rilasciati 4 volte/sessione con una sessione al mattino e una al pomeriggio. I punti di rilascio sono stati scelti in maniera semi-*random* per evitare che gli animali imparassero la via per raggiungere la piattaforma senza utilizzare le *spatial cue* e per equilibrare i punti di rilascio a maggiore e minore distanza dalla piattaforma (Vorhees and Williams, 2006). Durante il *training* i topi sono stati rilasciati con il muso rivolto verso la parete della vasca e sono stati lasciati liberi di nuotare per 60 secondi o fino al raggiungimento della piattaforma. Gli animali che non hanno raggiunto la piattaforma entro il tempo assegnato sono stati guidati verso di essa. In entrambi i casi, i topi sono stati tenuti sulla piattaforma per 15 secondi e alla fine dei quattro rilasci sono stati asciugati, riscaldati e riposti nelle rispettive gabbie in attesa della successiva sessione. Il sesto giorno (*test*), 24 ore dopo l'ultimo rilascio del periodo di *training*, la piattaforma è stata rimossa ed è stato eseguito un rilascio da un punto mai precedentemente usato. Gli animali sono stati lasciati liberi di nuotare per 120 secondi. Dopo il *test*, come procedura di controllo, è stato effettuato un *cued learning*: una bandierina è stata posta sulla piattaforma per renderla visibile e i topi sono stati rilasciati quattro volte, cambiando la posizione della piattaforma e il punto di rilascio ogni volta, cosicché non fossero in grado di utilizzare *cue* distali per risolvere il *task*. L'apprendimento spaziale è stato valutato nella fase di *training* attraverso

la latenza (tempo impiegato per raggiungere la piattaforma); la memoria spaziale a lungo termine è stata valutata il giorno del *test* misurando la percentuale di tempo speso nel quadrante *target* (il quadrante dove precedentemente era posizionata la piattaforma) e suddividendo gli animali in *impaired* (I) per un valore $< 25\%$ e *non-impaired* (NI) per un valore $> 30\%$. Gli animali con esito tra 25 e 30 % sono stati esclusi per evitare possibili *bias* di classificazione.

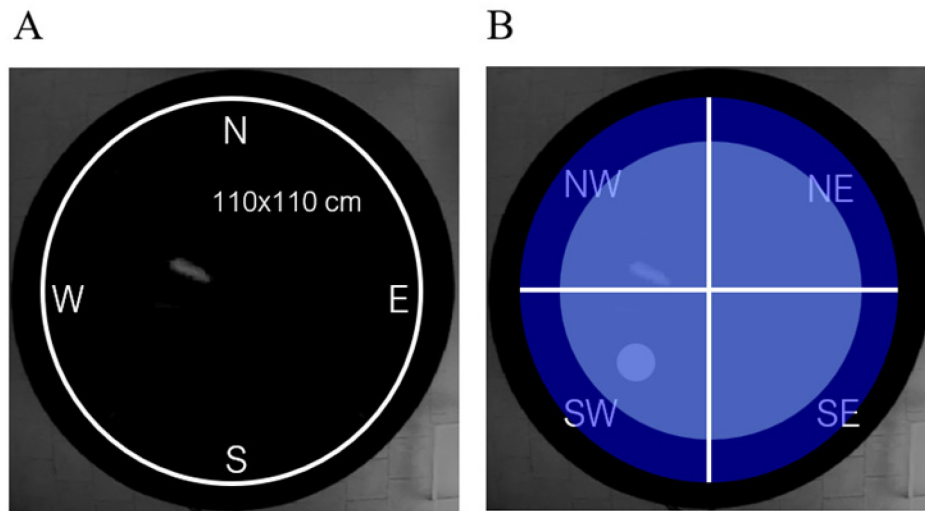


Figura 4. Morris Water Maze test. (A) Individuazione digitale dei 4 punti cardinali con cui convenzionalmente la vasca viene orientata. (B) I 4 punti di rilascio dell'animale durante la fase di *training*; il bordo esterno rappresenta l'area di tigmotassi mentre il cerchio nel quadrante SW indica la posizione della piattaforma. N, Nord; E, Est; S, Sud; W, Ovest; NW, Nord Ovest; NE, Nord Est; SE, Sud Est; SW, Sud Ovest.

Radial Arm Water Maze test (RAMW)

Il *test* è stato svolto come descritto in Alamed et al. (2006). L'apparato è formato da una vasca circolare di 110 cm di diametro e 25 cm di altezza, divisa in sei bracci rettangolari di 25 cm di larghezza e 35 cm di lunghezza, che si irradiano con un angolo di 60° da uno spazio aperto centrale di 40 cm di diametro (Figura 5). Una piattaforma trasparente di 15 cm di diametro è stata posizionata nella parte terminale di uno dei bracci (*goal arm*) a circa 2 cm di distanza dal bordo e dalle pareti e mantenuta nella stessa posizione per ciascun animale; il *goal arm* deve essere diverso tra un animale e l'altro per evitare segnali odorosi interferenti. Delle *cue* geometriche sono state fissate lungo il bordo della vasca. Il primo giorno (*training*) sono stati effettuati tre blocchi di rilascio (6 rilasci nel blocco 1, 6 rilasci nel blocco 2, e 3 rilasci nel blocco 3); nei blocchi 1 e 2 la piattaforma è stata resa

alternativamente visibile – tramite una bandierina – e nascosta (3 rilasci visibile e 3 nascosta), mentre nel blocco 3 la piattaforma è stata sempre nascosta. Il secondo giorno i topi sono stati testati in tre blocchi di 5 rilasci ciascuno con la piattaforma sempre nascosta. Gli animali sono stati rilasciati nella parte terminale di un braccio con il muso rivolto verso il centro della vasca e sono stati lasciati liberi di nuotare per 60 secondi o fino al raggiungimento della piattaforma; il braccio di rilascio è stato cambiato ogni volta in maniera *random*. Gli animali che non hanno raggiunto la piattaforma entro il tempo assegnato sono stati guidati verso di essa. In entrambi i casi, i topi sono stati tenuti sulla piattaforma per 15 secondi e alla fine dei rilasci di ciascuna sessione sono stati asciugati, riscaldati e riposti nelle proprie gabbie di stabulazione in attesa della sessione successiva. Sono stati calcolati gli errori medi in blocchi di 3 rilasci, mantenendo distinti i 2 giorni; sono considerati errori l'ingresso con tutte e quattro le zampe in un braccio diverso dal *goal arm* e la permanenza dell'animale per più di 15 secondi all'interno di uno stesso braccio o della zona centrale (assenza di scelta). Il parametro utilizzato per valutare la prestazione è stato il numero di errori nell'ultimo blocco del secondo giorno. Sono stati esclusi tutti quegli animali che hanno evidenziato una *chaining response*, ovvero l'ingresso, per raggiungere la piattaforma, in bracci adiacenti a quello di rilascio per tre volte o più (Janus, 2004) e tutti i *no swimmer*.

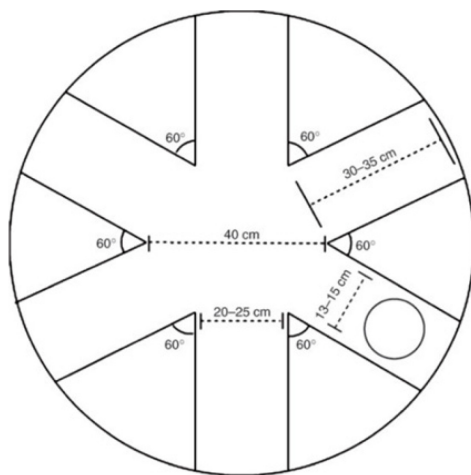


Figura 5. Radial Arm Water Maze test setting: il cerchio rappresenta la piattaforma e il braccio in cui è posizionato, diverso per ciascun animale, il cosiddetto *goal arm*.

In tabella 2 sono descritti in dettaglio i domini cognitivo-comportamentali valutati dai *test* e i substrati etologici su cui si basano.

Tabella 2. *Test comportamentali e loro correlati funzionali*

OF	L'OF (<i>Open Field test</i>) si basa sulla naturale propensione dei roditori ad esplorare un ambiente nuovo in cerca di cibo e <i>partner</i> sessuali e/o per accertarsi dell'assenza di predatori e altri pericoli. È stato usato per valutare l'attività locomotoria spontanea al fine di individuare eventuali <i>deficit</i> fisici negli animali congenici che avrebbero potuto condizionare i <i>test</i> cognitivo-comportamentali successivi.
OR	L'OR (<i>Novel Object Recognition test</i>) si basa sulla tendenza dei roditori ad esplorare preferenzialmente un oggetto nuovo rispetto ad uno familiare. Questo <i>test</i> consente di valutare la memoria di riconoscimento, parte integrante della memoria episodica; anche se esistono differenze significative tra la memoria episodica umana e animale, sembra che siano coinvolte aree cerebrali simili (per esempio, ippocampo, regione paraippocampale, e corteccia prefrontale) (Allen and Fortin, 2013). Pertanto, nonostante i limiti, l'OR può fornire informazioni utili su un dominio mnestico profondamente e precocemente colpito nella malattia di Alzheimer (Tsai, 2018).
EPM	L'EPM (<i>Elevated Plus Maze test</i>) poggia sulla progressiva avversione dei roditori nei confronti degli spazi aperti al crescere del loro stato ansioso. Questo <i>test</i> consente di studiare il grado di ansia degli animali e le aree cerebrali ad esso correlate - regioni limbiche, ippocampo, amigdala, nucleo del rafe dorsale (Walf and Fyre, 2007). Tra le sub-sindromi neuropsichiatriche, l'ansia colpisce circa il 40 % dei pazienti con malattia di Alzheimer (Zhao et al., 2016).
MWM	Il MWM (<i>Morris Water Maze test</i>) si basa sull'avversione dei roditori, pur ottimi nuotatori, nei confronti dell'acqua: l'acqua funge da stimolo negativo e li motiva a cercare una via di fuga, nello specifico, la piattaforma. L'animale deve servirsi di punti di riferimento spaziali per ricordare la posizione dell' <i>escape point</i> . È un <i>test</i> complesso che coinvolge numerose aree cerebrali (per esempio, ippocampo, neostriato, corteccie entorinale, peririnale, prefrontale e cingolata posteriore) ed è stato usato per valutare la memoria spaziale a lungo termine.
RAWM	Il RAWM (<i>Radial Arm Water Maze test</i>), basato sullo stesso istinto etologico del MWM, valuta la <i>working</i> e la <i>reference memory</i> in un <i>task</i> reso particolarmente impegnativo dalla presenza dei 6 bracci. La <i>reference memory</i> può essere considerata un analogo della <i>prospective memory</i> , in quanto si definisce come la capacità di apprendere un aspetto di un determinato <i>task</i> comportamentale che rimane costante (Webster et al., 2014). Studi sull'uomo e sugli animali suggeriscono il coinvolgimento dell'ippocampo e delle corteccie prefrontali e parietali.

ANALISI STATISTICA

I risultati sono stati espressi come media $\pm$ deviazione standard (variabili continue) o come percentuale (variabile categorica). Le curve di sopravvivenza sono state confrontate con il *test* Log-rank (Mantel-Cox). Le variabili continue sono state analizzate attraverso ANOVA ad una via o ANOVA a due vie utilizzando, in questo ultimo caso, come fattori interagenti

genotipo ed età o genotipo e *timing*; il *test* di Tukey è stato applicato per i confronti *post hoc*. La variabile categorica è stata analizzata mediante χ^2 *test*. La significatività è stata accettata per $p < 0,05$.

Risultati

CURVE DI SOPRAVVIVENZA E CRESCITA

I numeri in corsivo sono provvisori perché il monitoraggio è ancora in corso negli animali maschi.

Le curve di sopravvivenza dei topi *Wild Type* e *C.B6/J-APP_{swe}* sono diverse, con *lifespan* media e massima più alte nei controlli (per esempio, 93 vs. 81 e 144 vs. 131). Dividendo i due generi, le differenze tra i due genotipi si confermano sia nelle femmine che nei maschi, anche se con un *pattern* genere-specifico: le femmine *Wild Type* e *C.B6/J-APP_{swe}* sono simili fino a circa la 60a settimana, mentre i maschi *Wild Type* e *C.B6/J-APP_{swe}* mostrano differenze precoci a causa di un'alta percentuale di morti prima della 24a settimana negli animali congenici. Le *lifespan* media e massima sono di 102 e 83 e di 144 e 131 settimane per le femmine *Wild Type* e *C.B6/J-APP_{swe}* e di 86 e 42 e di 133 e 82 settimane per i maschi *Wild Type* e *C.B6/J-APP_{swe}* (Figure 6A).

Per quel che riguarda le curve di crescita, le femmine *C.B6/J-APP_{swe}* mostrano un valore di peso corporeo significativamente e costantemente inferiore rispetto alle femmine *Wild Type*; i maschi, invece, nonostante una differenza significativa, tendono a ridurre il *gap* con il tempo (Figura 6B).

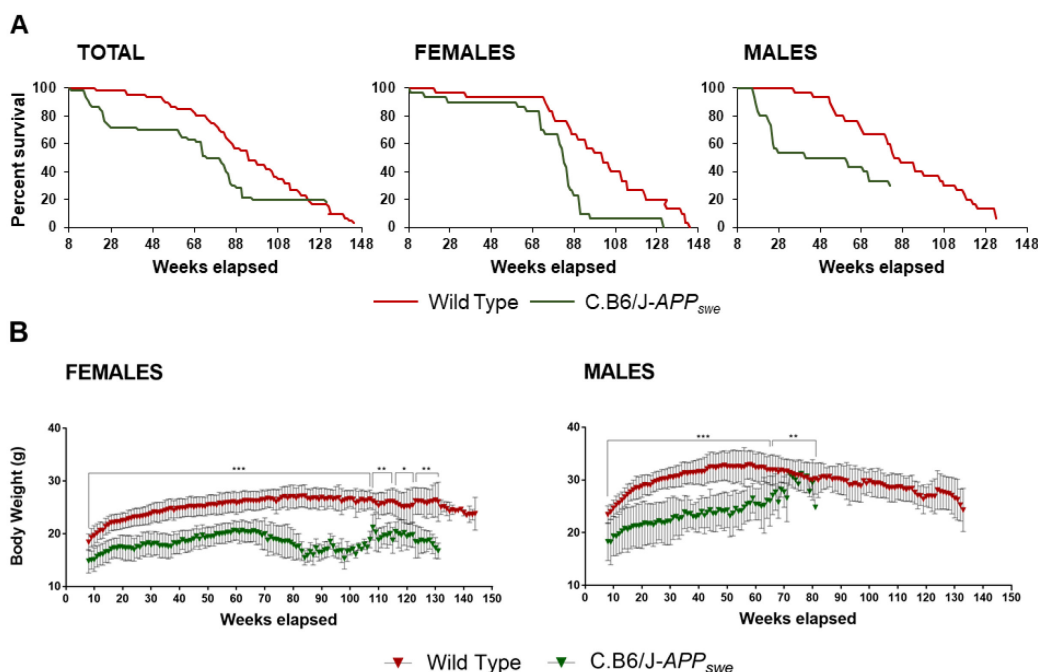


Figura 6. Curve di sopravvivenza (A) e crescita (B) di topi femmine e maschi, *Wild Type* e *C.B6/J-APP_{swe}*. (A) Solo le femmine sono state sottoposte ad analisi

statistica ed hanno evidenziato una differenza significativa ($p < 0,001$). (B) *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

WESTERN BLOT

L'APP umana si riscontra già a 3 mesi sia nell'ippocampo sia nella corteccia cerebrale, senza alcuna differenza significativa tra le fasce di età (Figura 7A). Per l'APP umana e murina, i topi CB6/J-*APP_{swe}* mostrano valori significativamente maggiori rispetto ai topi *Wild Type* a 3, 6, e 9 mesi in ippocampo e a 3 e 6 mesi in corteccia cerebrale. Negli animali di controllo, il livello di proteina è significativamente più alto nei controlli di 12 vs. 3, 6, e 9 mesi in ippocampo e di 3 vs. 6 e 9 mesi e di 12 vs. 9 mesi in corteccia cerebrale; negli animali congenici, invece, in corteccia cerebrale, nei topi di 3 e 6 vs. 9 mesi (Figura 7B).

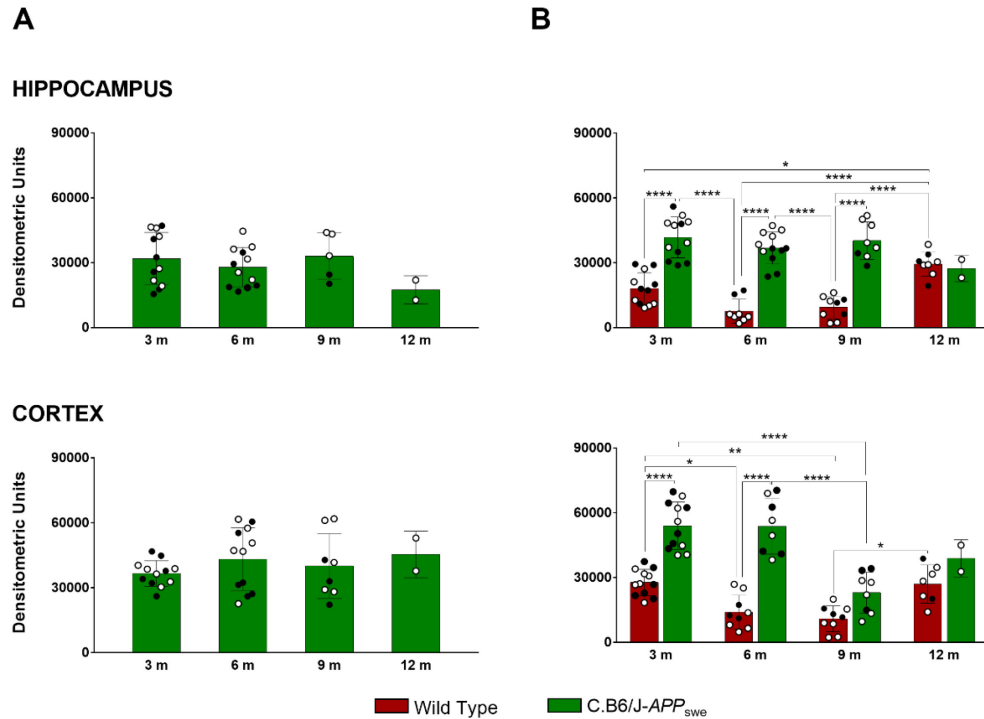


Figura 7. Espressione di APP umana in animali C.B6/J-*APP_{swe}* (A) e di APP umana e murina in animali *Wild Type* e C.B6/J-*APP_{swe}* (B). Le significatività sono dovute: i) in ippocampo, all'età ($F_{3,63} = 4,24$, $p = 0,008$), al genotipo ($F_{1,63} = 99,05$, $p < 0,001$) e all'interazione tra genotipo ed età ($F_{3,63} = 8,69$, $p < 0,001$); ii) in corteccia cerebrale, all'età ($F_{3,59} = 23,54$, $p < 0,001$), al genotipo ($F_{1,59} = 77,00$, $p < 0,001$) e all'interazione tra genotipo ed età ($F_{3,59} = 7,70$, $p < 0,001$). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ****, $p < 0,0001$. I cerchi bianchi rappresentano le femmine e quelli neri i maschi.

TEST ELISA

Nell'ippocampo e nella corteccia cerebrale, il frammento $A\beta_{40}$ insolubile è significativamente meno concentrato a 3, 6, e 9 mesi rispetto a quello solubile di tutte le età; inoltre, nella corteccia cerebrale, il valore del frammento $A\beta_{40}$ solubile risulta significativamente inferiore a 3 vs. 6 e 9 mesi (Figura 8A). Nell'ippocampo, il frammento $A\beta_{42}$ insolubile è significativamente meno concentrato rispetto a quello solubile a 3 e 9 mesi. 3, 6, e 9 mesi, il frammento $A\beta_{42}$ insolubile è significativamente più concentrato a 6 vs. 3 e 9 mesi e quello solubile è significativamente meno concentrato a 3 vs. 6 e 9 mesi. In corteccia cerebrale, il frammento $A\beta_{42}$ insolubile è significativamente meno concentrato a 3, 6, e 9 mesi rispetto a quello solubile di tutte le età e il frammento $A\beta_{42}$ insolubile a 3 vs. 6 e 9 mesi (Figura 8B).

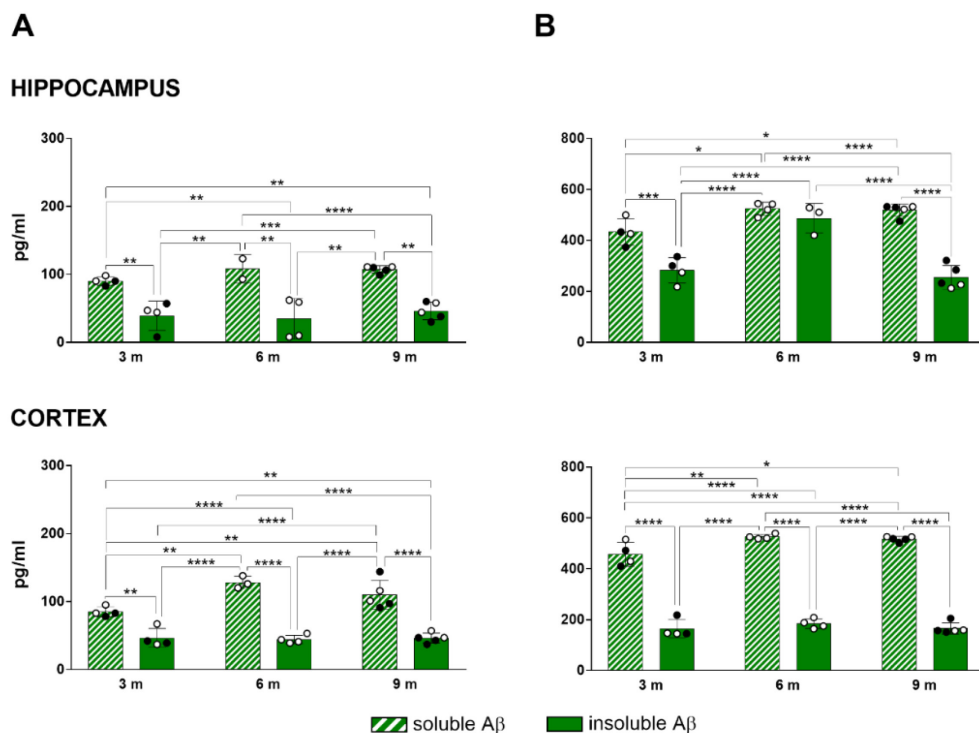


Figura 8. Concentrazione dei frammenti solubili e insolubili $A\beta_{40}$ (A) e $A\beta_{42}$ (B) negli animali C.B6/J- APP_{sw} . (A) Ippocampo ($F = 15,53$, $p < 0,001$) e corteccia cerebrale ($F = 32,60$, $p < 0,001$). (B) Ippocampo ($F = 34,35$, $p < 0,001$) e corteccia cerebrale ($F = 203,10$, $p < 0,001$). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$. I cerchi bianchi rappresentano le femmine e quelli neri i maschi.

IMMUNOISTOCHIMICA

Dove non diversamente esplicitato, sono stati analizzati i neuroni piramidali ippocampali delle zone CA1 e CA3, le cellule granulari del giro dentato (DG) e tutti gli strati delle cortecce cingolata (CC) e parietale (PC).

Accumulo di β -amiloide

L'immunoreattività all'anticorpo 6E10 è significativamente maggiore: i) in CA1, a 6 vs. 3 mesi e a 9 vs. 3, 12 e 16-18 mesi; ii) in CA3, a 6 vs. 3 mesi e a 9 mesi vs. tutte le altre fasce di età; iii) in DG, a 6 mesi vs. tutte le altre fasce di età e a 9, 12 e 16-18 vs. 3 mesi; iv) in CC, a 3 vs. 12 e 16-18 mesi e a 9 vs. 12 mesi; v) in PC, a 6 e 9 vs. 3 mesi (Figura 9A). L'immunoreattività all'anticorpo 4G8 è significativamente minore: i) in CA1 e DG, a 3 vs. 6, 9 e 12 mesi; ii) in CA3, CC, e PC, a 3 mesi vs. tutte le altre fasce di età (Figura 9B).

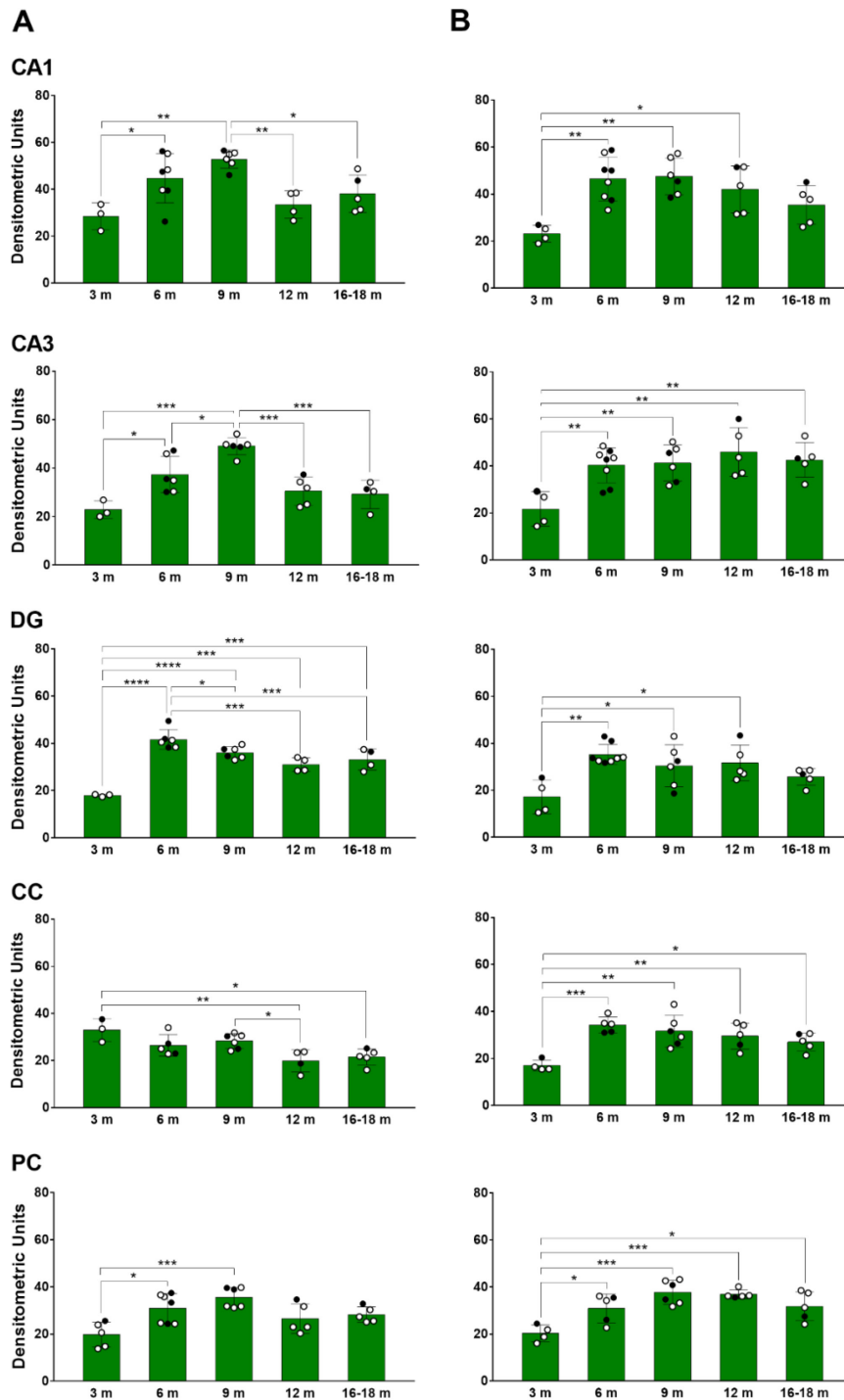


Figura 9. Analisi densitometrica dell'immunoreattività agli anticorpi 6E10 (A) e 4G8 (B) negli animali C.B6/J-*APP*_{swe}. (A) CA1 ($F = 7,26$, $p < 0,001$), CA3 ($F = 14,74$, $p < 0,001$), DG ($F = 26,21$, $p < 0,001$), CC ($F = 6,44$, $p = 0,002$), PC ($F = 6,68$, $p = 0,001$); (B) CA1 ($F = 6,85$, $p < 0,001$), CA3 ($F = 5,92$, $p = 0,002$), DG ($F = 5,76$, $p = 0,003$), CC ($F = 8,19$, $p < 0,001$), PC ($F = 8,94$, $p < 0,001$). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$. I cerchi bianchi rappresentano le femmine e quelli neri i maschi.

Neurodegenerazione

In nessuna area cerebrale o fascia di età è stata riscontrata una differenza significativa confrontando topi *Wild Type* e C.B6/J-*APP_{swe}* (Figura 10).

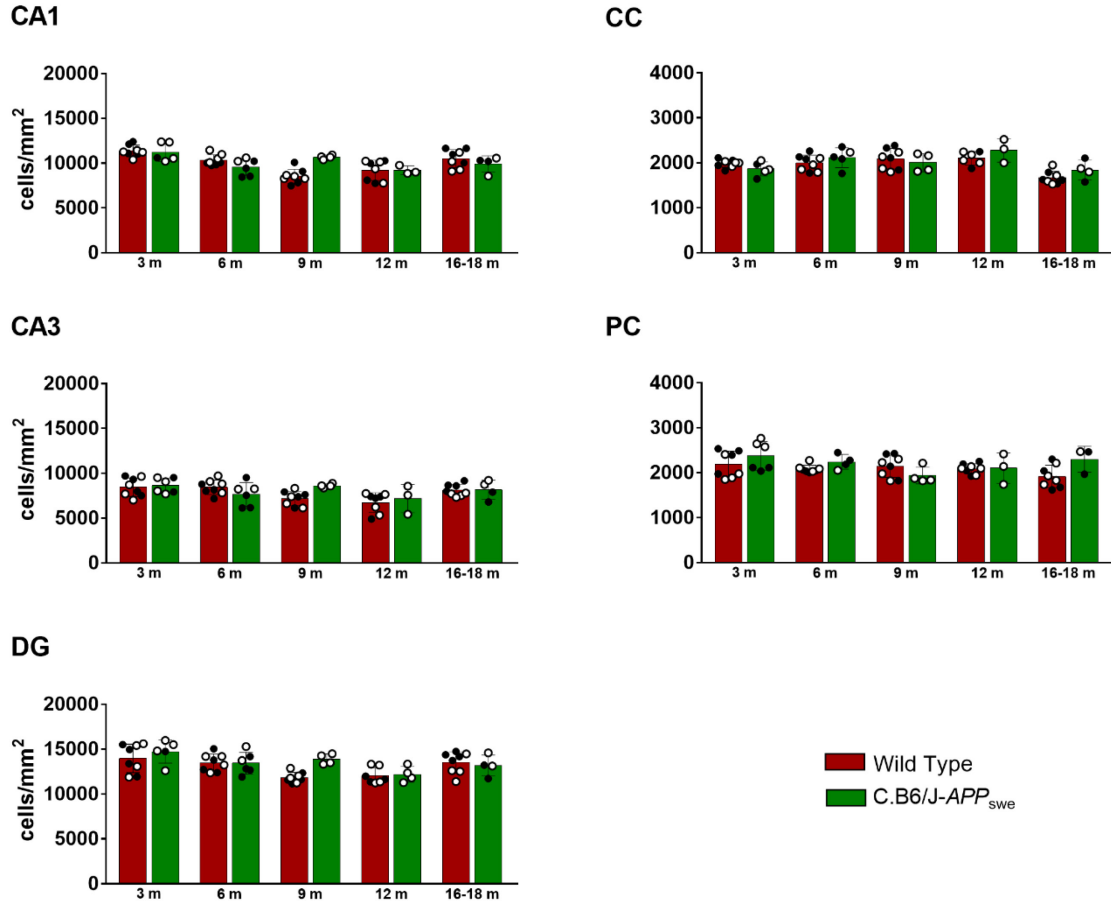


Figura 10. Conta delle cellule NeuN positive in animali *Wild Type* e C.B6/J-*APP_{swe}*. I cerchi bianchi rappresentano le femmine e quelli neri i maschi.

Densità sinaptica

L'immunoreattività è stata valutata nello strato radiato delle cellule piramidali CA1 (CA1) e CA3 (CA3), nello strato molecolare delle cellule granulari del giro dentato (DG), e in tutti gli strati delle cortecce cingolata (CC) e parietale (PC).

In CA1, la densità sinaptica risulta significativamente minore negli animali C.B6/J-*APP_{swe}* di 12 mesi vs. i topi *Wild Type* di 6, 9, 12 e 16-18 mesi e vs. i topi congenici di 3 e 9 mesi. In CA3, negli animali *Wild Type*, il parametro è significativamente maggiore a 12 e 16-18 vs. 6 mesi e a 9 vs. 3 mesi; confrontando i due genotipi, i controlli di 12 mesi hanno un valore

significativamente maggiore rispetto ai topi congenici di 9, 12 e 16-18 mesi. Nessuna differenza significativa si rileva in DG, CC e PC (Figura 11).

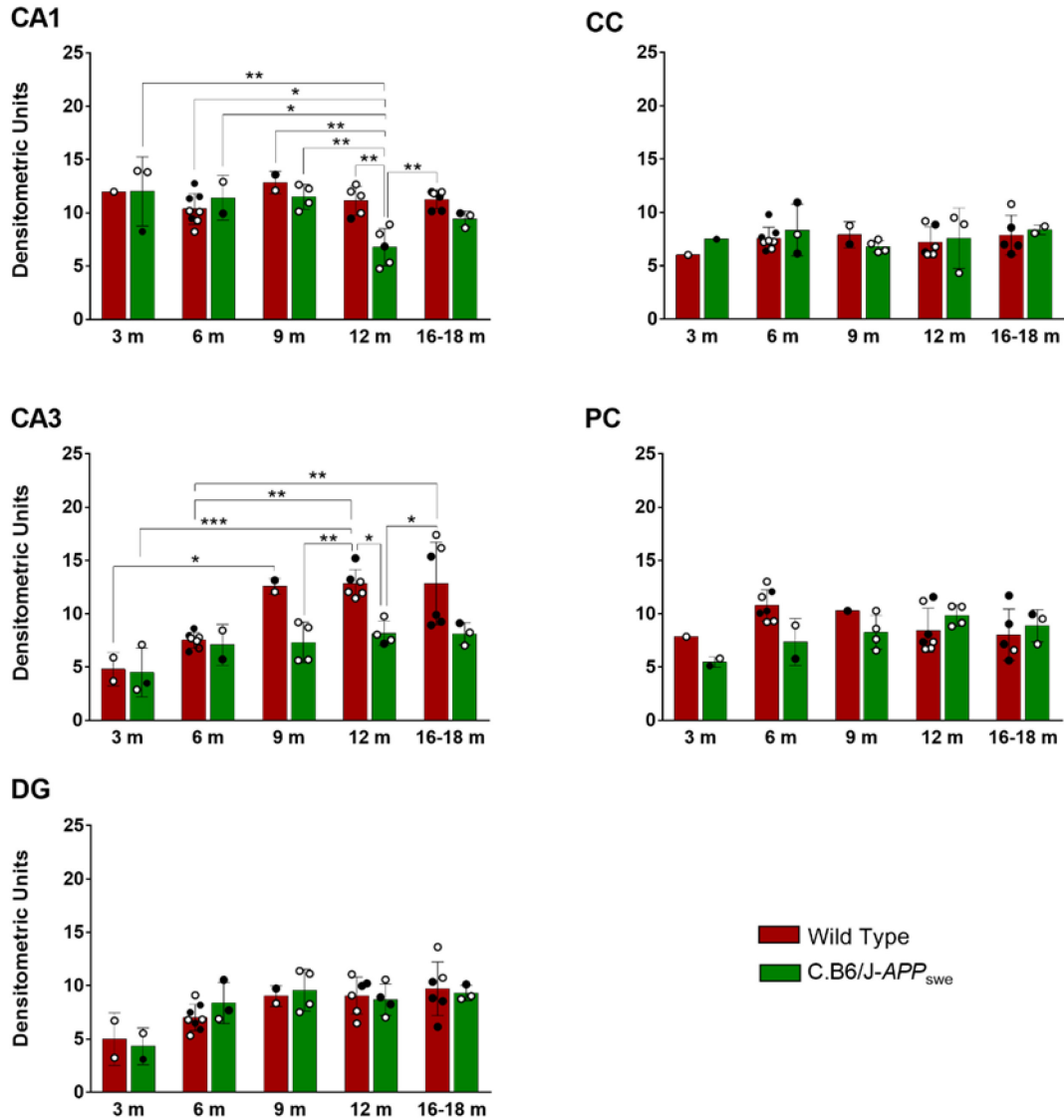


Figura 11. Analisi densitometrica dell'immunoreattività all'anticorpo anti-sinaptofisina in animali *Wild Type* e *CB6/J-APP_{swe}*. Le significatività sono dovute: i) in CA1, all'età ($F_{4,29} = 4,82$, $p = 0,004$), al genotipo ($F_{1,29} = 4,78$, $p = 0,037$) e all'interazione tra genotipo ed età ($F_{4,29} = 3,34$, $p = 0,023$); ii) in CA3, all'età ($F_{4,28} = 8,72$, $p < 0,001$) e al genotipo ($F_{1,28} = 17,70$, $p < 0,001$). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. I cerchi bianchi rappresentano le femmine e quelli neri i maschi.

Neuroinfiammazione

In CA1, la densità astrocitaria è significativamente maggiore, negli animali *Wild Type*, a 6 e 16-18 vs. 3 mesi, a 9 vs. 3 e 6 mesi, e a 12 vs. 3 e 16-18 mesi; confrontando i genotipi, i topi CB6/J-APP_{swe} di 3 mesi mostrano un valore significativamente più alto rispetto ai controlli pari età. In CA3, nessuna differenza significativa è presente. In DG, la densità degli astrociti

è significativamente minore negli animali *Wild Type* di 3 vs. 12 mesi, di 6 vs. 9 e 12 mesi, di 16-18 vs. 9 e 12 mesi, nonché nei controlli di 3, 6 e 16-18 mesi vs. topi CB6/J-*APP_{swe}* di pari età. In CC, gli animali congenici hanno un valore significativamente più alto a 3, 6 e 16-18 mesi rispetto ai controlli pari età; inoltre, il parametro risulta significativamente maggiore a 16-18 vs. 3, 6, 9, e 12 mesi sia negli animali *Wild Type* che in quelli CB6/J-*APP_{swe}*. In PC, la densità astrocitaria è significativamente più alta nei topi congenici rispetto ai controlli pari età a 3, 6, 9 e 12 mesi, nei topi *Wild Type* di 12 vs. 6 e 16-18 mesi, e nei topi CB6/J-*APP_{swe}* di 12 vs. 16-18 mesi (Figura 12A).

In CA1, la densità di cellule della microglia risulta significativamente maggiore nei topi CB6/J-*APP_{swe}* di 6 vs. 12 mesi, di 9 vs. 3, 6, 12 e 16-18 mesi, e di 16-18 vs. 12 mesi. In CA3, il dato è significativamente più alto negli animali congenici di 9 vs. 3, 6, 12 e 16-18 mesi e nei controlli di 9 vs. 3, 6 e 16-18 mesi; confrontando i genotipi, gli animali CB6/J-*APP_{swe}* hanno una densità microgliale significativamente maggiore a 3 e 6 mesi rispetto ai topi *Wild Type* di pari età. In DG, la densità microgliale è significativamente più elevata negli animali congenici di 6 vs. 3 mesi e di 9 vs. 3, 6 e 12 mesi, nei controlli di 6 e 9 vs. 3 mesi e di 12 vs. 16-18 mesi, e nei topi CB6/J-*APP_{swe}* di 9 mesi vs. i topi *Wild Type* di pari età. In CC, nei topi CB6/J-*APP_{swe}* il dato è significativamente minore a 3 vs. 6, 9 e 12 mesi e nei topi *Wild Type* a 3 vs. 6 e 9 mesi; dal confronto tra genotipi, emerge un valore significativamente più alto negli animali congenici di 6, 9, 12 e 16-18 mesi in confronto ai controlli pari età. In PC, il livello di microgliosi è significativamente maggiore negli animali *Wild Type* a 6 vs. 3 mesi e a 12 vs. 16-18 mesi e negli animali CB6/J-*APP_{swe}* a 9 vs. 3 e 16-18 mesi e a 12 vs. 16-18 mesi (Figura 12B).

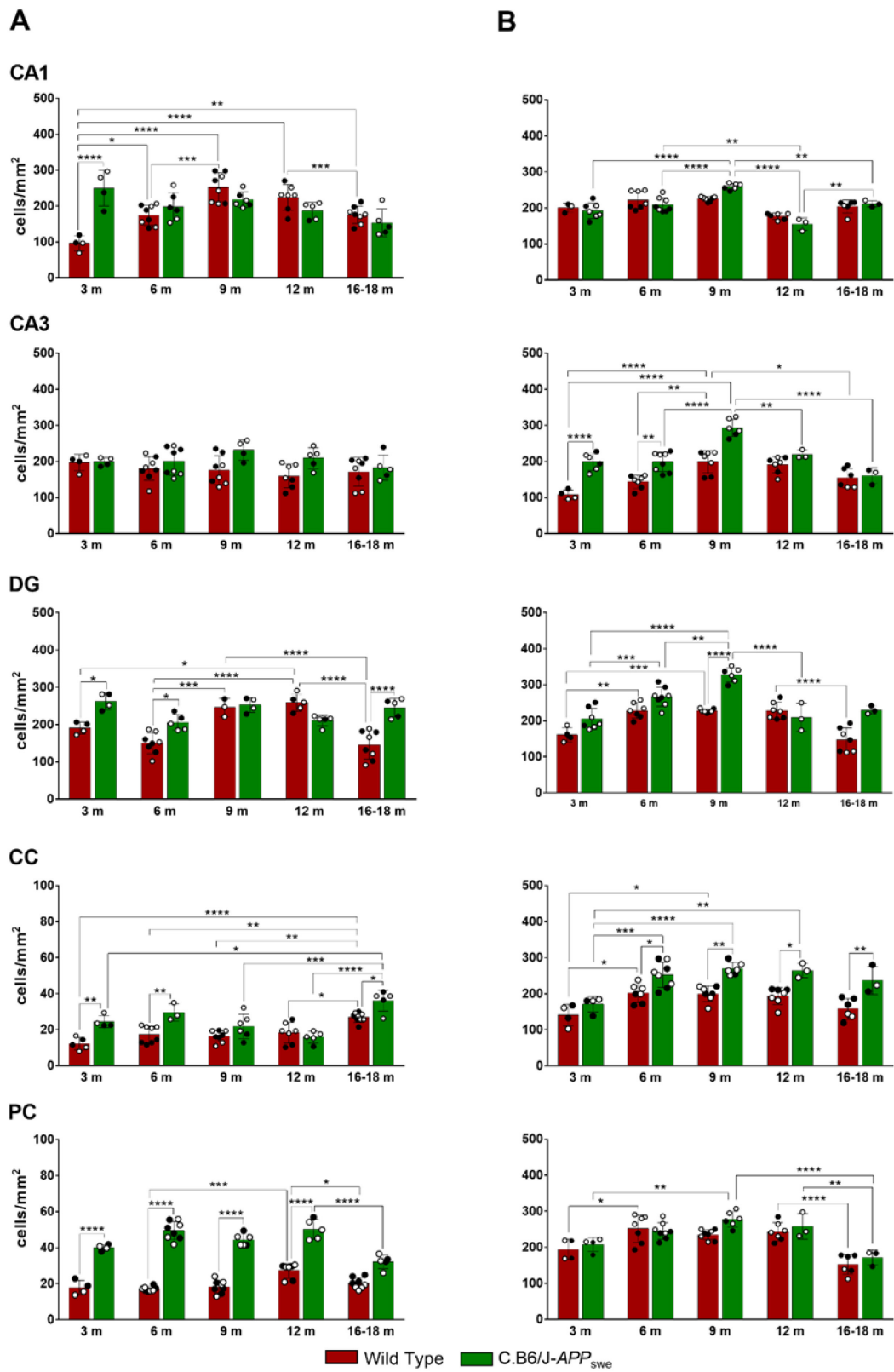


Figura 12. Conta delle cellule GFAP positive (A) e Iba1 positive (B) in animali *Wild Type* e *C.B6/J-APP_{swe}*. (A) Le significatività sono dovute: i) in CA1, all'età ($F_{4,51} = 9,11$, $p < 0,001$); ii) in DG, all'età ($F_{4,41} = 12,60$, $p < 0,001$), al genotipo ($F_{1,41} = 23,78$, $p < 0,001$).

0,001) e all'interazione tra genotipo ed età ($F_{4,41} = 12,88$, $p < 0,001$); iii) in CC, all'età ($F_{4,49} = 20,02$, $p < 0,001$), al genotipo ($F_{1,49} = 35,55$, $p < 0,001$) e all'interazione tra genotipo ed età ($F_{4,49} = 4,97$, $p = 0,003$); iv) in PC, all'età ($F_{4,53} = 18,64$, $p < 0,001$), al genotipo ($F_{1,53} = 557$, $p < 0,001$) e all'interazione tra genotipo ed età ($F_{4,53} = 13,37$, $p < 0,001$). (B) Le significatività sono dovute: i) in CA1, all'età ($F_{4,46} = 27,65$, $p < 0,001$) e all'interazione tra genotipo ed età ($F_{4,46} = 5,07$, $p = 0,002$); ii) in CA3, all'età ($F_{4,47} = 29,84$, $p < 0,001$), al genotipo ($F_{1,47} = 66,16$, $p < 0,001$) e all'interazione tra genotipo ed età ($F_{4,47} = 12,88$, $p < 0,001$); iii) in DG, all'età ($F_{4,49} = 29,84$, $p < 0,001$), al genotipo ($F_{1,49} = 52,67$, $p < 0,001$) e all'interazione tra genotipo ed età ($F_{4,49} = 8,57$, $p < 0,001$); iv) in CC, all'età ($F_{4,45} = 13,63$, $p < 0,001$) e al genotipo ($F_{1,45} = 60,97$, $p < 0,001$); v) in PC, all'età ($F_{4,46} = 1,64$, $p < 0,001$) e al genotipo ($F_{1,46} = 5,04$, $p = 0,030$). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$. I cerchi bianchi rappresentano le femmine e quelli neri i maschi.

Livello di fosforilazione di tau

In CA1, p-Tau mostra livelli significativamente maggiori nei topi C.B6/J-*APP_{swe}* di 6, 9, 12 e 16-18 mesi *vs.* gli animali *Wild Type* pari età; analoga situazione in DG, con una differenza significativa anche a 3 mesi. In CA3, gli animali congenici hanno un valore significativamente più alto a 6 mesi *vs.* i controlli di 3 mesi e a 9 mesi *vs.* i controlli di 3 e 16-18 mesi. In CC, gli animali C.B6/J-*APP_{swe}* di 16-18 mesi hanno p-Tau significativamente più elevata *vs.* gli animali *Wild Type* di 6 e 16-18 mesi e *vs.* gli animali di pari genotipo di 6 e 9 mesi. Infine, in PC, nei topi congenici c'è un valore significativamente maggiore a 6 *vs.* 3 mesi, a 9 *vs.* 6 e 16-18 mesi e a 12 *vs.* 16-18 mesi e nei topi *Wild Type* a 6, 9, e 12 *vs.* 3 mesi e a 12 *vs.* 16-18 mesi (Figura 13).

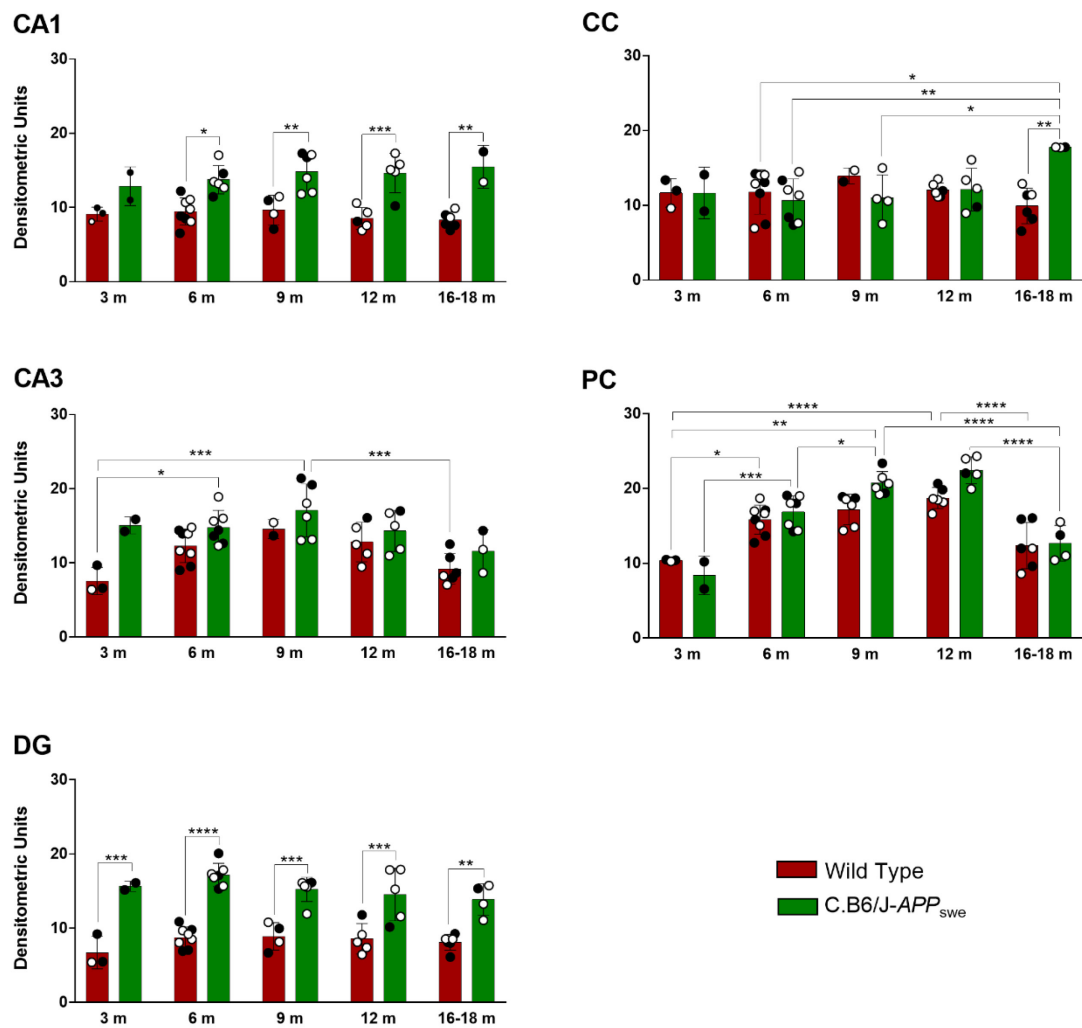


Figura 13. Analisi densitometrica dell'immunoreattività all'anticorpo anti-p-Tau in animali *Wild Type* e *CB6/J-APP_{swe}*. Le significatività sono dovute: i) in CA1, al genotipo ($F_{1,37} = 68,39$, $p < 0,001$); ii) in CA3, all'età ($F_{4,37} = 4,79$, $p = 0,003$) e al genotipo ($F_{1,37} = 15,76$, $p < 0,001$); iii) in DG, al genotipo ($F_{1,40} = 144,2$, $p < 0,001$); iv) in CC, all'interazione tra età e genotipo ($F_{4,36} = 5,35$, $p = 0,002$); v) in PC, all'età ($F_{4,43} = 38,28$, $p < 0,001$) e al genotipo ($F_{1,43} = 4,59$, $p = 0,038$). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$. I cerchi bianchi rappresentano le femmine e quelli neri i maschi.

In Figura 14 sono riportate foto di tessuti cimentati con vari anticorpi.

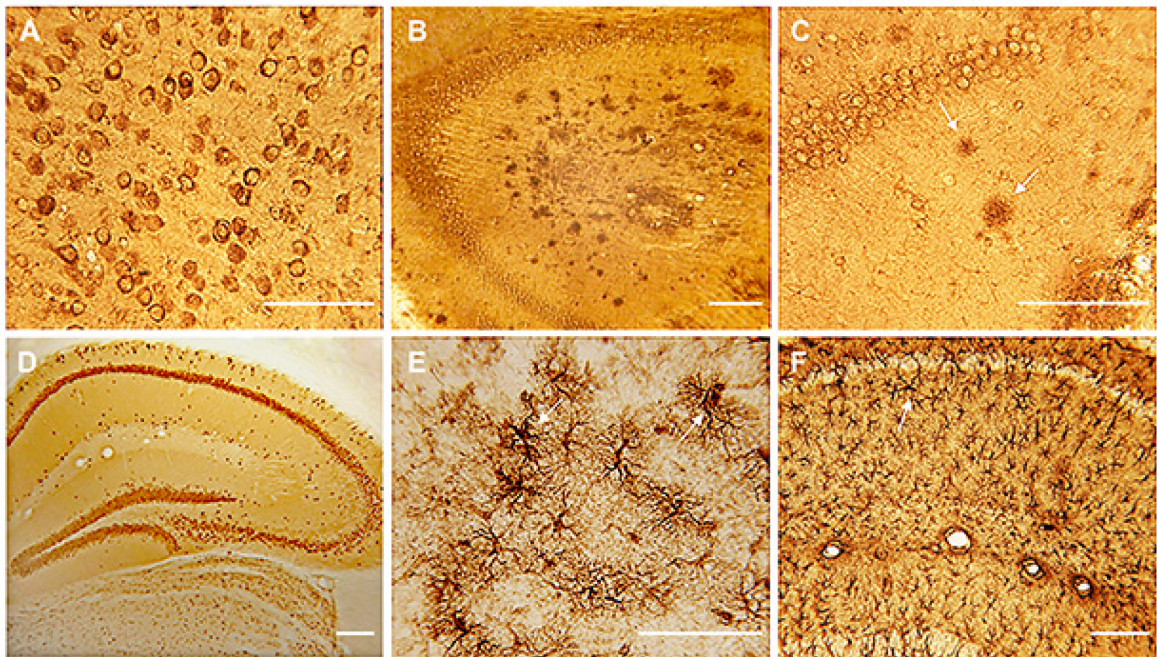


Figura 14. (A) Dettaglio di corteccia parietale di un topo C.B6/J-*APP_{swe}* di 3 mesi cimentata con l'anticorpo 6E10: è evidente l'espressione precoce del transgene all'interno delle cellule. (B-C) Aree cerebrali cimentate con l'anticorpo 4G8: in B, placche amiloidi ippocampali di un topo C.B6/J-*APP_{swe}* di 12 mesi; in C, due placche amiloidi (freccie) ad ingrandimento maggiore di un topo C.B6/J-*APP_{swe}* di 16-18 mesi. (D) Ippocampo cimentato con l'anticorpo anti-NeuN di un animale *Wild Type* di 6 mesi: le cellule nervose sono chiaramente marcate. (E) Astroцитi corticali (freccie) cimentati con l'anticorpo anti-GFAP di un controllo di 6 mesi: sono evidenti i numerosi prolungamenti che si irradiano dal soma. (F) Dettaglio di ippocampo cimentato con l'anticorpo anti-Iba1 di un animale congenico di 9 mesi: la microglia risulta ben identificabile (freccia). Barre = 100 μ m.

TEST COMPORTAMENTALI

In accordo con la letteratura esistente, topi di genere femminile e maschile hanno *pattern* cognitivo-comportamentali differenti (Pike, 2016; Yang et al., 2018); per questo motivo i due sessi sono stati analizzati separatamente.

Open Field test

Nelle femmine, a 3 e 6 mesi non ci sono differenze significative tra animali *Wild Type* e C.B6/J-*APP_{swe}* per quel che riguarda la distanza totale percorsa e la velocità media, mentre a 9 mesi i topi congenici mostrano per entrambi i parametri un valore significativamente minore rispetto ai controlli; per quel che riguarda il numero di attraversamenti delle righe, solo a 6 mesi i topi C.B6/J-*APP_{swe}* hanno un dato significativamente maggiore rispetto agli animali *Wild Type*. Nei maschi, a 6 mesi di età gli animali congenici evidenziano un valore significativamente più alto di distanza totale percorsa e velocità media, mentre a 3 e 9 mesi

non ci sono differenze significative tra i due genotipi; il numero di attraversamenti delle righe è tendenzialmente più alto negli animali congenici rispetto ai *Wild Type* a tutte le età ma la significatività viene raggiunta solo a 3 mesi (Figura 15).

Le *performance* all'OF permettono di escludere potenziali disabilità fisiche causate dal transgene.

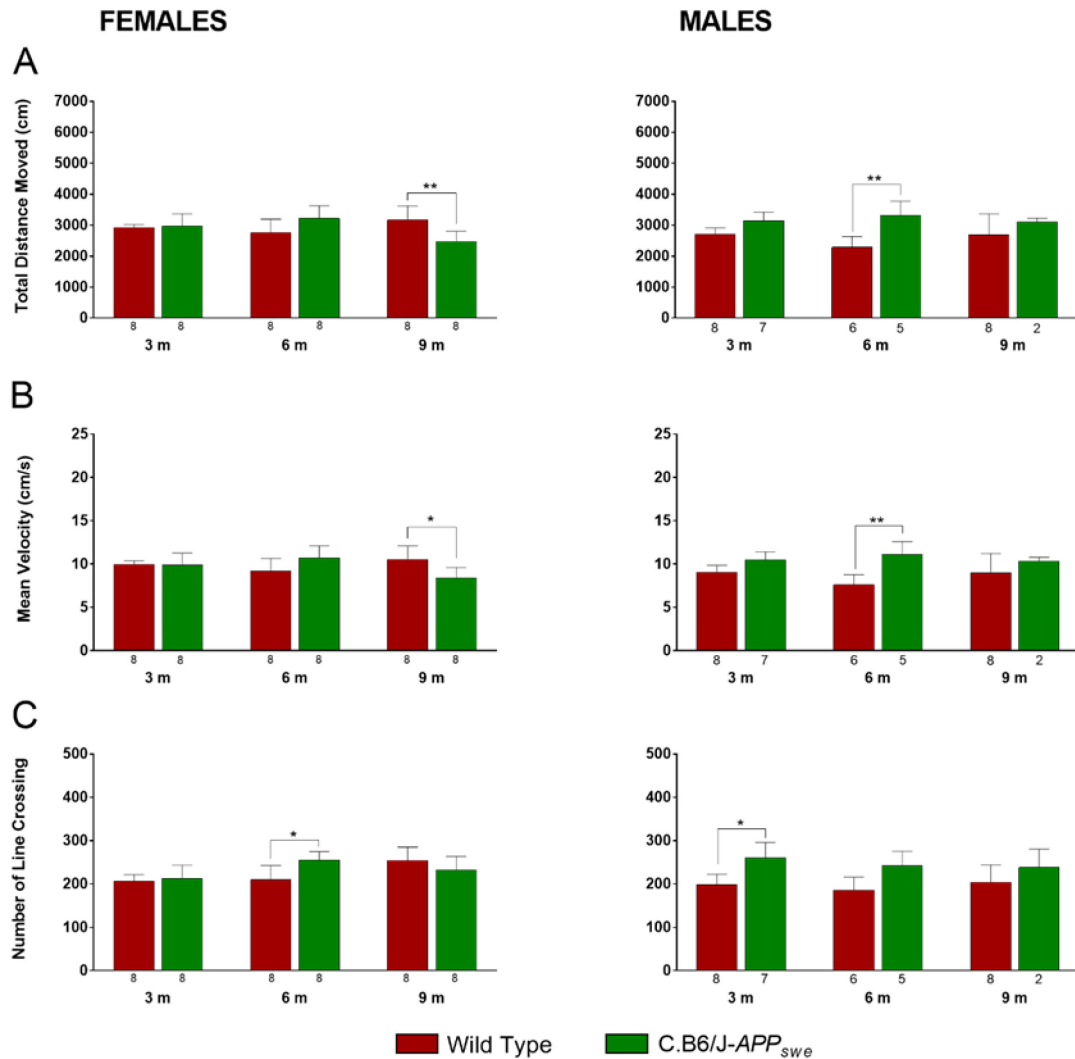


Figura 15. Performance nell'Open Field test di topi femmine e maschi, *Wild Type* e *C.B6/J-APP_{Swe}*. Le significatività sono dovute: i) per la distanza totale percorsa (A), all'interazione tra genotipo ed età ($F_{2,42} = 9,868$, $p < 0,001$) nelle femmine e al genotipo ($F_{1,30} = 15,70$, $p < 0,001$) nei maschi; ii) per la velocità media (B), all'interazione tra genotipo ed età ($F_{2,42} = 8,516$, $p < 0,001$) nelle femmine e al genotipo ($F_{1,30} = 15,06$, $p < 0,001$) nei maschi; iii) per il numero di attraversamenti delle linee (C), all'età ($F_{2,42} = 5,904$, $p = 0,005$) e all'interazione tra genotipo ed età ($F_{2,42} = 6,166$, $p = 0,004$) nelle femmine e al genotipo ($F_{1,30} = 16,27$, $p < 0,001$) nei maschi. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$. La numerosità di ogni gruppo è riportata sotto le colonne.

Novel Object Recognition test

Nelle femmine, gli animali *Wild Type* evidenziano un tempo percentuale di esplorazione del nuovo oggetto significativamente più alto a 6 mesi rispetto a 3 mesi, mentre con l'età i topi C.B6/J-*APP_{swe}* non mostrano cambiamenti significativi; confrontando i due genotipi, nei topi congenici di 9 mesi c'è un valore significativamente maggiore rispetto ai controlli di 3 mesi. Per quanto riguarda i maschi, la piccola dimensione campionaria di alcuni gruppi non ha permesso alcuna analisi statistica; tuttavia, un'osservazione qualitativa sembra evidenziare l'assenza di differenze tra topi *Wild Type* e C.B6/J-*APP_{swe}* (Figura 16).

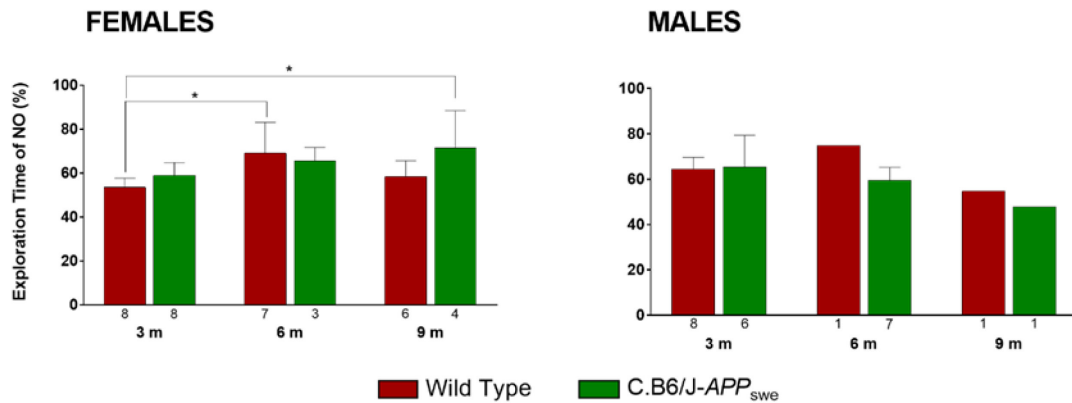


Figura 16. Performance nel Novel object recognition test dei topi femmine e maschi, *Wild Type* e C.B6/J-*APP_{swe}*. Le significatività sono dovute all'età ($F_{2,30} = 4,617$, $p = 0,018$). *, $p < 0,05$. La numerosità di ogni gruppo è riportata sotto le colonne.

Elevated Plaze Maze test

Nelle femmine, il tempo percentuale speso nei bracci aperti è significativamente più alto nei topi *Wild Type* di 9 mesi rispetto a quelli di 3 mesi e significativamente più basso negli animali C.B6/J-*APP_{swe}* di 9 mesi rispetto ai controlli pari età. Nei maschi, si riscontra un tempo percentuale speso nei bracci aperti significativamente più basso nei topi *Wild Type* di 3, 6, e 9 mesi rispetto ai topi C.B6/J-*APP_{swe}* di pari età e nei topi congenici a 3 e 9 vs. 6 mesi (Figura 17).

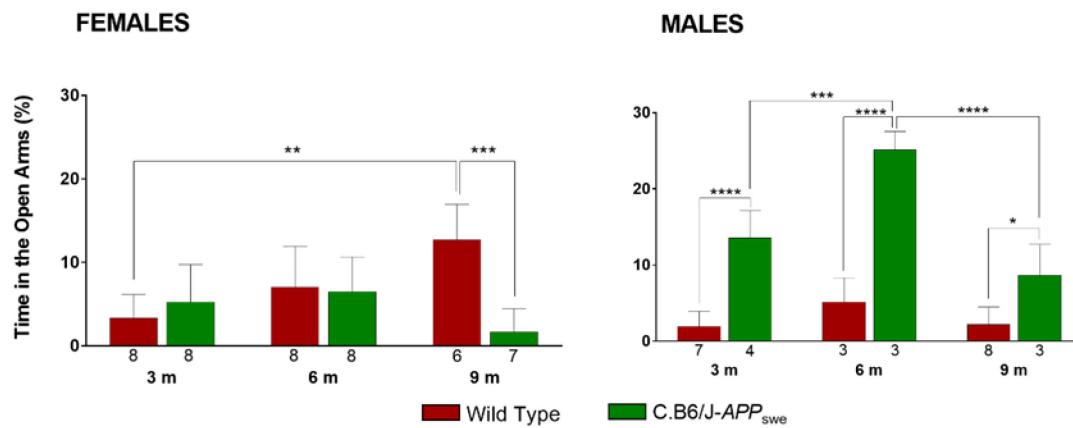


Figura 17. Performance nell'Elevated Plaze Maze test di topi femmine e maschi, Wild Type e C.B6/J-APP_{swe}. Le significatività sono dovute al genotipo ($F_{1,39} = 7,167$, $p = 0,011$) e all'interazione tra genotipo ed età ($F_{2,39} = 10,37$, $p < 0,001$) nelle femmine; all'età ($F_{1,22} = 23,28$, $p < 0,001$), al genotipo ($F_{1,22} = 23,28$, $p < 0,001$) e all'interazione tra genotipo ed età ($F_{2,22} = 10,78$, $p < 0,001$) nei maschi. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$. La numerosità di ogni gruppo è riportata sotto le colonne.

Morris Water Maze test

Durante il periodo di *training*, tutti gli animali evidenziano apprendimento, con una riduzione significativa della latenza dal giorno 1 al giorno 5 (Tabella 3).

Tabella 3. Prospetto dell'apprendimento nel *Morris Water Maze test* durante la fase di *training*

GENERE	GENOTIPO	ETA'	GIORNO 1 vs. GIORNO 5	FATTORI INTERAGENTI
Femmine	Wild Type	3 mesi	$p < 0,001$	Timing ($F_{4,145} = 7,76$, $p < 0,001$) ed età ($F_{4,145} = 3,14$, $p = 0,016$)
		6 mesi	$p < 0,001$	
		9 mesi	$p < 0,027$	
	C.B6/J-APP _{swe}	3 mesi	$p < 0,001$	Timing ($F_{4,105} = 18,19$, $p < 0,001$) ed età ($F_{3,105} = 5,15$, $p = 0,002$)
		6 mesi	$p = 0,004$	
		9 mesi	$p < 0,001$	
Maschi	Wild Type	3 mesi	$p < 0,001$	Timing ($F_{4,75} = 15,54$, $p < 0,001$) ed età ($F_{3,75} = 34,30$, $p < 0,001$)
		6 mesi	$p = 0,015$	
		9 mesi	$p < 0,001$	
	C.B6/J-APP _{swe}	3 mesi	$p < 0,001$	Timing ($F_{4,75} = 12,01$, $p < 0,001$)
		6 mesi	$p < 0,001$	
		9 mesi	$p = 0,318$	

Al *test*, la percentuale di animali NI e' significativamente minore nelle femmine C.B6/J-APP_{swe} rispetto alle femmine Wild Type a 3 e 6 mesi, e nei maschi congenici rispetto ai maschi di controllo a 3, 6, e 9 mesi (Figura 18A).

Radial Arm Water Maze test

Nelle femmine, il numero medio di errori commessi durante l'ultimo blocco di rilascio e' significativamente maggiore nei topi *Wild Type* di 3 mesi rispetto a quelli di 6 e 9 mesi, mentre nessuna variazione significativa dovuta all'età si riscontra negli animali C.B6/J-*APP_{swe}*, che, pero', hanno un valore significativamente maggiore rispetto ai controlli pari età a 6 e 9 mesi. Nei maschi, il numero medio di errori commessi durante l'ultimo blocco di rilascio e' significativamente piu' alto nei topi C.B6/J-*APP_{swe}* di 3 mesi nei confronti di tutti gli altri gruppi (Figura 18B).

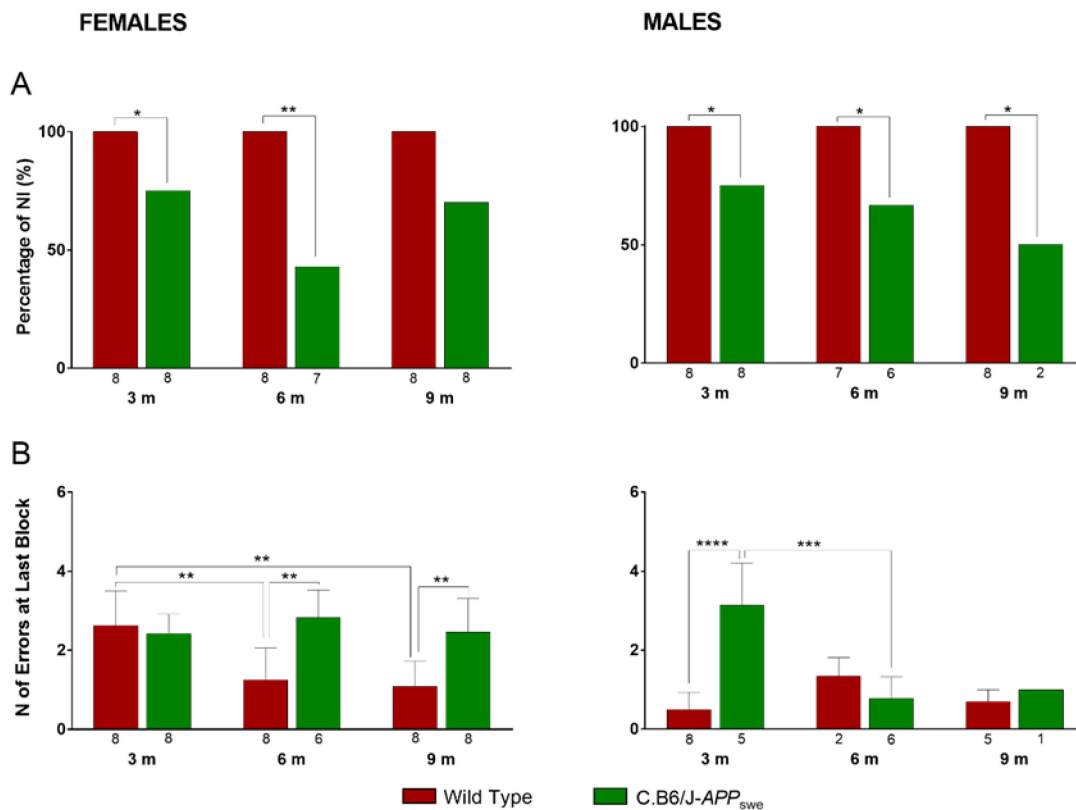


Figura 18. Performance al Morris Water Maze test (A) e al Radial Arm Water Maze test (B) di topi femmine e maschi, *Wild Type* e C.B6/J-*APP_{swe}*. Le significatività sono dovute all'età ($F_{1,22} = 8,88$, $p = 0,007$), al genotipo ($F_{1,40} = 17,30$, $p < 0,001$) e all'interazione tra genotipo ed età ($F_{1,40} = 6,67$, $p = 0,003$) nelle femmine e al genotipo ($F_{1,21} = 6,75$, $p = 0,018$), all'età ($F_{2,21} = 4,96$, $p = 0,018$) e all'interazione tra genotipo ed età ($F_{2,21} = 15,01$, $p < 0,001$) nei maschi. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$. La numerosità di ogni gruppo è riportata sotto le colonne.

Nella Figura 19 sono riportati esempi di *performance* ai test cognitivo-comportamentali registrati con il software EthoVision XT10.

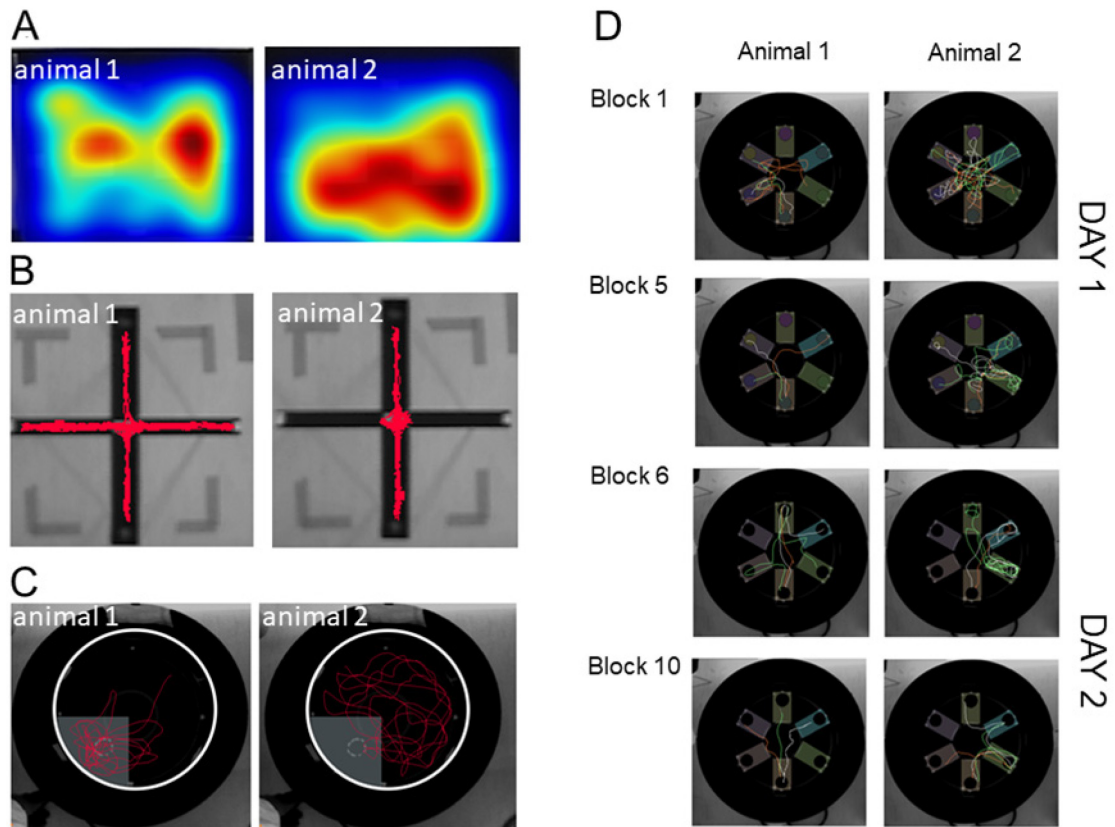


Figura 19. (A) Heatmap - le zone rosse indicano le aree in cui l'animale ha trascorso più tempo - delle performance al *Novel Object Recognition test*: l'animale 1 (*non-impaired*) ha speso la maggior parte del tempo attorno al nuovo oggetto (posizionato a destra) rispetto all'oggetto già conosciuto (posizionato a sinistra), mentre l'animale 2 (*impaired*) ha esplorato in maniera casuale l'arena con un interesse bilanciato per entrambi gli oggetti. **(B) Tracking automatico (linea rossa)** delle performance all'*Elevated Plus Maze test*: l'animale 1 ha un basso livello di ansia, come dimostrato dall'esplorazione equilibrata dei bracci aperti e chiusi, mentre l'animale 2 ha un alto livello di ansia come si evince dal fatto che è rimasto all'interno dei bracci chiusi per l'intero periodo di registrazione. **(C). Tracking automatico (linea rossa)** delle performance al *Morris Water Maze test*: l'animale 1 ha prestazioni integre (ha trascorso il tempo assegnato primariamente alla ricerca della piattaforma), al contrario l'animale 2 ha una prestazione compromessa (ha nuotato in modo casuale durante tutto il tempo di registrazione). Il cerchio bianco delimita l'arena, l'area grigia è il quadrante *target* con la posizione precedente della piattaforma visibile grazie alla linea tratteggiata. **(D) Traiettorie natatorie (i 3 rilasci sono segnalati con colori diversi) durante il primo (1 e 6) e l'ultimo (5 e 10) blocco del giorno 1 e del giorno 2**: l'animale 1 ha una *working memory* preservata e l'animale 2 ha una *working memory* compromessa; dal blocco 1 al blocco 10, entrambi i topi hanno mostrato un miglioramento delle prestazioni con una riduzione progressiva di ingressi nei bracci sbagliati a dimostrazione dell'apprendimento del *task*.

Discussione

In questo studio abbiamo creato un topo congenico con *background* genetico Balb-c dal topo Tg2576 con lo scopo di perfezionarne le caratteristiche e renderlo più utile per l'analisi di alcuni aspetti della MA. L'obiettivo primario è quello di allungare la sopravvivenza dell'animale C.B6/J-*APP_{swe}* e ridurre la stabulazione in isolamento grazie ad una attenuazione dell'aggressività. I dati sono preliminari e andranno rivalutati al raggiungimento dell'esatto numero campionario.

CURVE DI SOPRAVVIVENZA E CRESCITA

L'aspettativa di vita (la durata media di vita prevista per un individuo alla nascita) è influenzata dal genotipo, dal genere - un fattore ampiamente sottovalutato quando si caratterizzano i modelli murini di MA - nonché dall'ambiente. In letteratura i dati relativi alla *median lifespan* del ceppo Tg2576 sono piuttosto variabili: si va dalle 11 alle 50 settimane nelle femmine e dalle 10 alle 27 settimane nei maschi, con gli animali *Wild Type* che mostrano costantemente maggiore longevità (Rae and Brown, 2015). L'analisi della curva di sopravvivenza ha confermato una sopravvivenza minore del topo C.B6/J-*APP_{swe}* rispetto agli animali di controllo e dei maschi di entrambi i genotipi rispetto alle femmine. Le femmine C.B6/J-*APP_{swe}* hanno una sopravvivenza mediana di 83 settimane – il 66% in più rispetto al dato più alto riscontrato in letteratura per le femmine Tg2576 – mentre i maschi, al momento della stesura della tesi, di 42 settimane – il 56 % in più rispetto al dato più alto riscontrato in letteratura per i maschi Tg2576 (Freude et al., 2009). Inoltre, nei topi Tg2576 è presente una sindrome da morte improvvisa a meno di 9 settimane (<https://www.taconic.com/transgenic-mouse-model/appswe-model-1349>), età a cui il modello C.B6/J-*APP_{swe}* non evidenzia alcun decesso: il fenomeno, infatti, esclusivamente rilevabile nei maschi, risulta posticipato alla 24a settimana.

Rispetto agli animali *Wild Type*, i topi C.B6/J-*APP_{swe}* hanno un peso minore, caratteristica che condividono con il modello Tg2576, forse in conseguenza dei ridotti livelli ematici di leptina (Ishii et al., 2014), ma tutti gli altri tratti fenotipici (postura, aspetto del manto, tono muscolare, acuità visiva, *performace* locomotorie, incidenza di *barbering*, fenomeni di aggressività intra-gabbia etc..) sono risultati sovrapponibili.

WESTERN BLOT

L'APP umana (evidenziata dall'immunoreattiva' all'anticorpo 6E10) è risultata precocemente espressa (3 mesi) sia nell'ippocampo sia nella corteccia cerebrale e si è mantenuta costante nel tempo, con la sola flessione ippocampale a 12 mesi. Per la proteina immunoreattiva all'anticorpo 22C11, nell'ippocampo gli animali C.B6/J-*APP_{swe}* hanno evidenziato un valore significativamente maggiore rispetto ai topi *Wild Type* a tutte le età, fatta eccezione per i 12 mesi, in conseguenza, in parte dell'aumentato segnale murino e, in parte, del ridotto segnale umano; nella corteccia cerebrale, la diversità tra genotipi è risultata evidente a tutte le età anche se a 9 e 12 mesi non sono state raggiunte le significatività, principalmente per la diminuzione del segnale umano. L'apparente riduzione della sintesi di APP umana al progredire dell'età degli animali potrebbe trovare una spiegazione nell'aumento del processamento amiloidogenico della proteina e, quindi, nella formazione di frammenti di peso molecolare inferiore e non rilevabili al *Western Blot*. L'ipotesi andrà validata con il dosaggio tramite *test* ELISA dei peptidi A β ₄₀ e A β ₄₂.

TEST ELISA

I frammenti amiloidogenici A β ₄₀ e A β ₄₂ sono stati rilevati già a 3 mesi sia nell'ippocampo sia nella corteccia cerebrale, con la componente solubile, ovvero quella che ancora non forma fibrille, significativamente maggiore in tutte le fasce di età - l'eccezione a 6 mesi per il frammento A β ₄₂ insolubile ippocampale potrebbe essere riconducibile alla scarsa numerosità del gruppo. I dati, seppur ancor poco numerosi, dimostrano che il processo amiloidogenico dell'APP umana ha un inizio precoce, mantiene un andamento costante – almeno fino ai 9 mesi – e porta ad una produzione più abbondante del peptide A β ₄₂, più tossico, rispetto al peptide A β ₄₀. La maggiore produzione del peptide A β ₄₂ è un risultato inatteso: nel modello Tg2576, infatti, è il livello di A β ₄₀ ad essere più elevato, pur con il mantenimento costante nel tempo del rapporto A β ₄₂/A β ₄₀ (Kawarabayashi et al., 2001). Il modello C.B6/J-*APP_{swe}* risulta invece paragonabile ai modelli murini con mutazione doppia APP_{swe}/PSN-1 (Borchelt et al., 1996; Duff et al., 1996). Anche se questa caratteristica è difforme dalla MA umana, essa potrebbe favorire lo sviluppo più marcato e/o in tempi inferiori dei meccanismi istopatologici riconducibili alla amilopatia e, quindi, facilitare la loro comprensione/prevenzione/cura.

IMMUNOISTOCHIMICA

L'APP umana e i frammenti A β (immunoreattività all'anticorpo 6E10) sono riscontrabili già a 3 mesi in tutte le aree analizzate, in linea con i dati ottenuti con tecniche di *Western Blot* ed ELISA. In CA1, CA3 e PC il valore cresce progressivamente fino a 9 mesi, mentre nella CC fino a 9 mesi resta costante; in entrambi i casi, comunque, c'è un calo a 12 e 16-18 mesi. Il DG esibisce una tendenza leggermente diversa, con il picco raggiunto a 6 mesi e il *drop* anticipato a 9 mesi. Considerando sia le molecole umane sia quelle murine (immunoreattività all'anticorpo 4G8), si conferma, chiaramente, la presenza precoce a 3 mesi del segnale, che cresce fino a 6 mesi per stabilizzarsi nelle fasce di età successive. Le differenze riscontrate usando i due anticorpi potrebbero essere dovute alla maggiore capacità dell'anticorpo 4G8 di marcare gli aggregati di A β : è plausibile infatti che la formazione delle placche amiloidi riduca progressivamente il segnale diffuso "catturato" dall'anticorpo 6E10 ma non quello rilevato dall'anticorpo 4G8.

Nessun fenomeno neurodegenerativo è stato trovato in relazione all'età o alle aree cerebrali analizzate.

Per quel che concerne la densità sinaptica, in CA1 si ha una significativa diminuzione nei topi C.B6/J-*APP_{swe}* di 12 mesi, non confermata a 16-18 mesi forse per la ridotta *sample size* di questo gruppo. In CA3, nei topi *Wild Type* il parametro aumenta progressivamente dai 3 ai 16-18 mesi, mentre nei topi congenici resta stabile con l'età e questo fa sì che, a partire da 9 mesi, gli animali C.B6/J-*APP_{swe}* abbiano una densità sinaptica inferiore, anche se non sempre la significatività viene raggiunta in conseguenza del numero ridotto di animali testati e della variabilità dei dati in alcuni gruppi. Nessuna differenza significativa è stata trovata in DG, CC e PC, anche se in quest'ultima area, nelle fasi iniziali (3, 6, e 9 mesi), i topi congenici tendono ad avere un livello più basso – anche in questo caso le ridotte dimensioni campionarie potrebbero aver influenzato il raggiungimento della significatività.

Passando ai fenomeni neuroinfiammatori, in CA1, dove la densità degli astrociti tende a cambiare in modo età-dipendente – negli animali *Wild Type* con un andamento a campana il cui picco si posiziona a 9 mesi, e nei topi C.B6/J-*APP_{swe}* con un andamento a *steady state* dai 3 ai 16-18 mesi –, è stata rilevata negli animali congenici una significativa astrogliosi solo a 3 mesi. In DG e CC, invece, una presenza significativamente maggiore di astrociti è stata riscontrata nelle fasi precoci (3 e 6 mesi) così come in quelle tardive (16-18 mesi); e mentre nessuna differenza significativa è stata trovata in CA3, in PC una marcata astrogliosi

è stata evidenziata in tutte le fasce di età, con la significatività che non viene raggiunta solo a 16-18 mesi. A livello di microgliosi, negli animali C.B6/J-*APP_{swe}* è stato trovato un marcato aumento in CA3 nelle fasi precoci (3, 6, e 9 mesi), in tutte le fasce di età in DG – fatta eccezione per i 12 mesi, probabilmente per la ridotta *sample size*– e a partire da 6 per arrivare a 16-18 mesi in CC. In CA1 e PC, al contrario, non ci sono differenze tra genotipi che, anzi, mostrano andamenti età-dipendenti simili (per esempio, riduzione a 12 mesi in CA1 e a 16-18 mesi in PC). Quindi, astrogliosi e microgliosi sono diffusamente presenti nel modello C.B6/J-*APP_{swe}* con *pattern* però non sovrapponibili e spesso complementari: in CA1 c'è una precoce astrogliosi ma non c'è microgliosi; in CA3 c'è una microgliosi marcata fino a 9 mesi ma nessuna astrogliosi, mentre in PC la situazione è perfettamente speculare, con astrogliosi evidente in tutte le fasce di età ma nessuna microgliosi; in DG e CC, infine, astrogliosi precoce e tardiva, ma microgliosi che riguarda anche le fasce d'età intermedie. Il fenomeno sarà approfondito, quando la dimensione campionaria sarà definitiva, mediante marcatura multipla di cellule gliali e frammenti di A β /ptau per trovare una possibile relazione tra una specifica gliosi e β patia o taupatia.

I livelli di p-Tau sono risultati significativamente più elevati negli animali C.B6/J-*APP_{swe}* rispetto ai controlli a tutte le età in CA1 e DG –fa eccezione solo il confronto a 3 mesi in CA1 dove non è stata raggiunta la significatività probabilmente a causa della ridotta *sample size*. In CA3, tanto nei topi congenici quanto nei controlli c'è stato un progressivo aumento del valore fino ai 9 mesi, seguito da un calo a 12 e 16-18 mesi, con i topi congenici che hanno mostrato livelli superiori a tutte le età senza però raggiungere la significatività. Un fenomeno simile, anche se non identico, si è riscontrato in PC, con un aumento a 6 mesi, un *plateau* fino a 12 mesi e un *drop* a 16-18 mesi – in questo caso, però, i livelli tra i due genotipi sono risultati simili a tutte le età. In CC, si è trovato un marcato aumento di p-Tau nei topi C.B6/J-*APP_{swe}* a 16-18 mesi, dopo che il valore si era mantenuto costante e simile nei due genotipi dai 3 ai 12 mesi. Quindi, in ippocampo c'è una evidente iperfosforilazione della proteina tau negli animali congenici a tutte le età, in CC solo a 16-18 mesi, mentre nessuna alterazione sembra esserci in PC. Il calo genotipo-indipendente di p-Tau alle età più avanzate rilevato in CA3 e PC necessiterà di approfondimento a dimensioni campionarie ultimate. Va specificato che un alto livello di p-Tau non è di per sé un fenomeno patologico, ma potrebbe suggerire la formazione di grovigli neurofibrillari. Tecniche specifiche, come la colorazione con argento di Gallyas, verranno applicate per verificare l'ipotesi.

Nel modello Tg2576, i) si osserva una comparsa precoce dell'APP umana, che dopo un aumento iniziale, si mantiene stabile nel tempo (Hsiao et al. 1996), ii) gli agglomerati formati da frammenti insolubili di A β compaiono tra 6 e 10 mesi, accompagnati da rare placche amiloidi (Kawarabayashi et al. 2001), iii) c'è un aumento della densità della microglia a partire da 10 mesi nelle aree cerebrali in cui si sviluppano le placche amiloidi, inclusi ippocampo e corteccia occipitale, nonché un'intensa reazione astrogliale (Frautschy et al., 1998), iv) non sono presenti grovigli neurofibrillari, pur a fronte di iperfosforilazione di tau, né neurodegenerazione (<https://www.alzforum.org/research-models/tg2576>), e v) si ha perdita delle spine dendritiche a 4/5 mesi in CA1 (Lanz et al, 2003). Quindi, i risultati fino ad ora raccolti mostrano un sostanziale mantenimento nel modello C.B6/J-APP_{swe} dei principali tratti istopatologici del topo Tg2576, seppur con delle variazioni temporali, ragionevolmente riconducibili alla diversa curva di sopravvivenza.

COMPORTAMENTO

Nell'OR, le femmine *Wild Type* mostrano un miglioramento della memoria di riconoscimento dai 3 ai 6 mesi e poi valori stabili fino a 9 mesi, suggerendo che tale memoria non sia ancora del tutto sviluppata ad età precoci ma si consolidi successivamente; le femmine C.B6/J-APP_{swe}, al contrario, non mostrano differenze significative dovute all'età, così come i maschi *Wild Type* e congenici. Nessuna differenza è stata riscontrata confrontando i genotipi – l'unica significatività trovata è plausibilmente dovuta alla ridotta *sample size* di alcuni gruppi. Nelle femmine *Wild Type* c'è una progressiva riduzione dell'ansia con l'età, mentre nelle femmine congeniche il parametro resta stabile fino a 6 mesi, con un aumento significativo a 9 mesi, che spiega anche la minor attività esplorativa evidenziata all'OF. Nei maschi congenici l'ansia risulta marcatamente minore rispetto ai maschi *Wild Type* a tutte le età con un minimo toccato a 6 mesi. Per quanto riguarda la memoria spaziale a lungo termine si sono riscontrati *deficit* nei topi congenici, sia femmine che maschi, già a 3 mesi, con la percentuale di animali NI al *test* marcatamente maggiore nei topi *Wild Type* a tutte le età. Nel RAMW, invece, femmine e maschi hanno evidenziato *performance* diverse. Nelle femmine C.B6/J-APP_{swe} è stata riscontrata un'alterazione della *working* e *reference memory* a partire da 6 mesi e mantenuta fino a 9 mesi, mentre nei maschi C.B6/J-APP_{swe} c'è stato un *deficit* significativo a 3 mesi completamente recuperato a 6 e 9 mesi. Un comportamento analogo a quello dei maschi congenici è stato trovato nelle femmine *Wild Type*, ma non nei maschi *Wild Type*, che hanno prestazioni costanti da 3 a 9

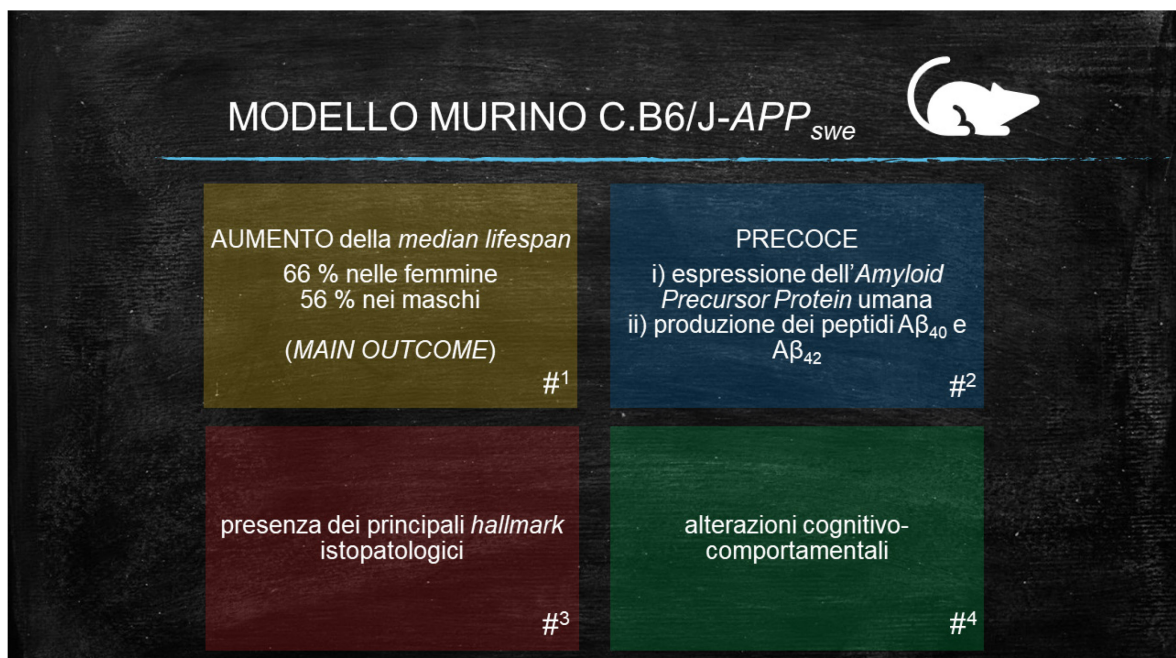
mesi. Le *performance* dei maschi congenici e delle femmine di controllo sembrano indicare una mancata maturazione della *working* e *reference memory* a 3 mesi ed un successivo consolidamento funzionale, in linea con quanto trovato in modelli murini non geneticamente modificati (Szentes et al., 2019).

In accordo con la letteratura, nei topi Tg2576: i) non è riportato alcun *deficit* della *recognition memory* se non in tarda età (Webster et al 2014), ii) sono presenti *deficit* della memoria spaziale a lungo termine e della *working* e *reference memory* ad età che variano a seconda degli studi considerati (Hsiao et al., 1996; Arendash et al., 2001a; King and Arendash, 2002; Arendash et al 2004), e iii) si mostra una riduzione dell'ansia a partire dai 7 mesi (Lalonde et al 2012).

Il modello C.B6/J-*APP_{swe}* conferma il mantenimento della memoria di riconoscimento fino a nove mesi (Ashe et al., 2013) e i *deficit* della memoria spaziale a lungo termine. Un dato interessante e, per quanto a noi noto, nuovo, è il *pattern* sesso-specifico sia della *working* e *reference memory* che dell'ansia – a sostegno dell'imprescindibilità di valutare tanto le femmine quanto i maschi quando si studiano modelli di MA.

CONCLUSIONI

Nello schema sottostante, le caratteristiche del modello C.B6/J-*APP_{swe}* che sono state fino ad ora evidenziate.



#¹, caratteristiche fenotipiche che escludono alterazioni fisiche e limitano la natura “sofferente” del modello al solo dominio cognitivo-comportamentale; #², il processo amiloidogenico dell'*Amyloid*

Precursor Protein (APP) porta ad una maggior produzione del frammento $A\beta_{42}$ rispetto a quello $A\beta_{40}$; #³, precoce espressione di APP e frammenti amiloidogenici, formazione di abbondanti placche amiloidi — soprattutto in ippocampo, perdita sinaptica ippocampale, neuroinfiammazione, iperfosforilazione di tau; #⁴, mantenimento della memoria di riconoscimento fino a 9 mesi, *deficit* della memoria spaziale a lungo termine, modificazioni sesso-specifiche della *working* e *reference memory* spaziale e dello stato ansioso.

Bibliografia

1. Alamed J, Wilcock DM, Diamond DM, Gordon MN, Morgan D. Two-day radial-arm water maze learning and memory task; robust resolution of amyloid-related memory deficits in transgenic mice. *Nature Protocols* 2006. 1: 1671–79. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.275>.
2. Alescio-Lautier B, Michel BF, Herrera C, Elahmadi A, Chambon C, Touzet C, Paban V. Visual and visuospatial short-term memory in mild cognitive impairment and Alzheimer disease: Role of attention. *Neuropsychologia* 2007. 45: 1948–60. <https://doi.org/10.1016/j.neuropsychologia.2006.04.033>.
3. Alexander G, Hanna A, Serna V, Younkin L, Younkin S, Janus C. Increased aggression in males in transgenic Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research* 2016, 1: 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.07.016>.
4. Allen TA, Fortin NJ. The evolution of episodic memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013. 110: 10379–86. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301199110>.
5. Arendash GW, Gordon MN, Diamond DM, Austin LA, Hatcher JM, Jantzen P, Dicarlo G, Wilcock D, Morgan D. Behavioral assessment of Alzheimer's transgenic mice following long-term Abeta vaccination: task specificity and correlations between Abeta deposition and spatial memory. *DNA Cell Biology* 2001. 20: 737–44. <https://doi.org/10.1089/10445490152717604>.
6. Arendash GW, Lewis J, Leighty RE, McGowan E, Cracchiolo JR, Hutton M, Garcia MF. Multi-metric behavioral comparison of APPsw and P301L models for Alzheimer's disease: linkage of poorer cognitive performance to tau pathology in forebrain. *Brain Research* 2004 1012: 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.brains.2004.02.081>.
7. Arnold SE, Hyman BT, Flory J, Damasio AR, Van Hoesen GW. The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of patients with Alzheimer's disease. *Cerebral Cortex* 1991. 1: 103–16. <https://doi.org/10.1093/cercor/1.1.103>.
8. Ashe KH, Zahs KR. Probing the biology of Alzheimer's disease in mice. *Neuron* 2010. 66: 631–645. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.04.031>.

9. Atri A. The Alzheimer's disease clinical spectrum: diagnosis and management. *The Medical Clinics of North America* 2019. 103: 263–93. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.10.009>.
10. Baddeley A. Working memory. *Science* 1992. 255: 556–59. <https://doi.org/10.1126/science.1736359>.
11. Baddeley A. Working memory, thought, and action. Oxford University Press, 2007.
12. Baghallab I, Reyes-Ruiz JM, Abulnaja K, Huwait E, Glabe C. Epitomic characterization of the specificity of the anti-amyloid A β monoclonal antibodies 6E10 and 4G8. *Journal of Alzheimer's Disease* 2018. 66: 1235–44. <https://doi.org/10.3233/JAD-180582>.
13. Borchelt DR, Thinakaran G, Eckman CB, Lee MK, Davenport F, Ratovitsky T, Prada CM, Kim G, Seekins S, Yanger D, Slunt HH, Wang R, Seeger M, Levey AI, Gandy SE, Copeland NG, Jenkins NA, Price DL, Younkin SG, Sisodia SS. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 1996. 17: 1005–13. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80230-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80230-5).
14. Briggs R, Kennelly SP, O'Neill D. Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clinical Medicine* 2016. 16: 247–53. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.16-3-247>.
15. Bruen PD, McGeown WJ, Shanks MF, Venneri A. Neuroanatomical correlates of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease. *Brain* 2008. 131: 2455–63. <https://doi.org/10.1093/brain/awn151>
16. Byrne P, Becker S, Burgess N. Remembering the past and imagining the future. *Psychological Review* 2007. 114: 340–75. <https://doi.org/10.1037/0033-295X.114.2.340>.
17. Cao C, Lin X, Wahi MM, Jackson EA, Potter H. Successful adjuvant-free vaccination of BALB/c mice with mutated amyloid β peptides. *BMC Neuroscience* 2008. 9: 25. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-9-25>.
18. Chung JA, Cummings JL. Neurobehavioral and neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: characteristics and treatment. *Neurologic Clinics* 2000. 18: 829–46. [https://doi.org/10.1016/s0733-8619\(05\)70228-0](https://doi.org/10.1016/s0733-8619(05)70228-0).
19. Colin M, Dujardin S, Schraen-Maschke S, Meno-Tetang G, Duyckaerts C, Courade JP, Buée L. From the prion-like propagation hypothesis to therapeutic strategies of anti-tau immunotherapy. *Acta Neuropathologica* 2020. 139: 3–25. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02087-9>.
20. Davis DS. Ethical issues in Alzheimer's disease research involving human subjects. *Journal of Medical Ethics* 2017. 43: 852–56. <https://doi.org/10.1136/medethics-2016-103392>.

21. Del Prete D, Checler F, Chami M. Ryanodine receptors: physiological function and deregulation in Alzheimer disease. *Molecular Neurodegeneration* 2014. 9: 21. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-21>.
22. Do Carmo S, Cuello AC. Modeling Alzheimer's disease in transgenic rats. *Molecular Neurodegeneration* 2013. 8: 37. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-37>.
23. Drummond E, Wisniewski T. Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathologica* 2017. 133: 155–75. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1662-x>.
24. Dubois B, Picard G, Sarazin M. Early detection of Alzheimer's disease: new diagnostic criteria. *Dialogues in Clinical Neuroscience* 2009. 11: 135–39.
25. Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y, Yager D, Morgan D, Gordon MN, Holcomb L, Refolo L, Zenk B, Hardy J, Younkin S. Increased amyloid-beta42(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 1996. 383: 710–13. <https://doi.org/10.1038/383710a0>.
26. Eldridge L, Knowlton B, Furmanski C, Bookheimer S, Engel S. Remembering episodes: a selective role for the hippocampus during retrieval. *Nature Neuroscience* 2000. 3: 1149–52. <https://doi.org/10.1038/80671>.
27. Fagan AM, Perrin RJ. Upcoming candidate cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease. *Biomarkers in Medicine* 2012. 6: 455–76. <https://doi.org/10.2217/bmm.12.42>.
28. Frautschy SA, Yang F, Irrizarry M, Hyman B, Saido TC, Hsiao K, Cole GM. Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *The American Journal of Pathology* 1998. 152: 307–17.
29. Freude S, Hettich MM, Schumann C, Stöhr O, Koch L, Köhler C, Udelhoven M, Leeser U, Muller M, Kubota N, Kadowaki T, Krone W, Schroder H, Brüning JC, Schubert M. Neuronal IGF-1 resistance reduces Abeta accumulation and protects against premature death in a model of Alzheimer's disease. *FASEB Journal* 2009. 23: 3315–24. <https://doi.org/10.1096/fj.09-132043>.
30. Gao Y, Tan L, Yu JT, Tan L. Tau in Alzheimer's disease: mechanisms and therapeutic strategies. *Current Alzheimer Research* 2018. 15: 283–300. <https://doi.org/10.2174/1567205014666170417111859>.
31. Goss JR, Finch CE, Morgan DG. Age-related changes in Glial Fibrillary Acidic Protein mRNA in the mouse brain. *Neurobiology of Aging* 1991. 12: 165–70. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(91\)90056-P](https://doi.org/10.1016/0197-4580(91)90056-P).

32. Gouras GK, Olsson TT, Hansson O. β -amyloid peptides and amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics* 2015. 12: 3–11. <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0313-y>.
33. Gusel'nikova, VV, Korzhevskiy DE. NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker. *Acta Naturae* 2015. 7: 42–47.
34. He Y, Sun S, Chen R, Guo Y, He X, Huang L, Chen Z, Shi K, Zhu W. Effects of epitopes combination and adjuvants on immune responses to anti-Alzheimer disease DNA vaccines in mice. *Alzheimer Disease & Associated Disorders* 2005. 19: 171–177. <https://doi.org/10.1097/01.wad.0000189031.58450.5a>.
35. Hernandez-Rapp J, Smith PY, Filali M, Goupil C, Planel E, Magill ST, Goodman RH, Hébert SS. Memory formation and retention are affected in adult MiR-132/212 knockout mice. *Behavioural Brain Research* 2015. 287: 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.03.032>.
36. Hoogerhout P, Kamphuis W, Brugghe HF, Sluijs JA, Timmermans HAM, Westdijk J, Zomer G, Boog CJP, Hol EM, van den Dobbelsteen GPJM. A cyclic undecamer peptide mimics a turn in folded Alzheimer amyloid β and elicits antibodies against oligomeric and fibrillar amyloid and plaques. *Plos One* 2011. 6: e19110. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019110>.
37. Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, YOUNKIN S, Yang F, Cole G. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 1996. 274: 99–102
38. Ishii M, Wang G, Racchumi G, Dyke JP, Iadecola C. Transgenic mice overexpressing amyloid precursor protein exhibit early metabolic deficits and a pathologically low leptin state associated with hypothalamic dysfunction in arcuate neuropeptide Y neurons. *The Journal of Neuroscience* 2014. 34: 9096–9106. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0872-14.2014>.
39. Isik AT. Late onset Alzheimer's disease in older people. *Clinical Interventions in Aging* 2010. 5: 307–11. <https://doi.org/10.2147/CIA.S11718>.
40. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Molecular Brain Research* 1998. 57: 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(98\)00040-0](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(98)00040-0).
41. Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, Wölfling H, Chieng BC, MacDonald JC, Napier IA, Eckert A, Staufenbiel M, Hardeman E, Go J. Dendritic function

- of tau mediates amyloid- β toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* 2010. 142: 387–97. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.036>.
42. Jack C R, Petersen RC, Xu YC, O'Brien PC, Smith GE, Ivnik RJ, Boeve BF, Waring SC, Tangalos EG, Kokmen E. Prediction of AD with MRI-based hippocampal volume in mild cognitive impairment. *Neurology* 1999. 52: 1397–1403. <https://doi.org/10.1212/wnl.52.7.1397>.
 43. Janus C. Search strategies used by APP transgenic mice during navigation in the Morris water maze. *Learning & Memory* 2004. 11: 337–46. <https://doi.org/10.1101/lm.70104>.
 44. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspet AJ. Principi di Neuroscienze. V edizione. Casa Editrice Ambrosiana.
 45. Kawarabayashi T, Younkin LH, Saido TC, Shoji M, Ashe KH, Younkin SG. Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid β protein in the Tg2576 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience* 2001. 21: 372–81. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-02-00372.2001>.
 46. King DL, Arendash GW. Behavioral characterization of the Tg2576 transgenic model of Alzheimer's disease through 19months. *Physiological Behaviour* 2002. 75: 627–642. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(02\)00639-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(02)00639-X).
 47. Kirby E, Bandelow S, Hogervorst E. Visual impairment in Alzheimer's disease: a critical review. *Journal of Alzheimer's Disease* 2010. 21: 15–34. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-080785>.
 48. Klein WL. A β toxicity in Alzheimer's disease: globular oligomers (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochemistry International* 2002. 41: 345–52. [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(02\)00050](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(02)00050)
 49. Kobylecki C, Haense C, Harris J, Stopford C, Segobin S, Jones M, Richardson A, Gerhard A, Anton-Rodriguez J, Thompson JC, Herholz K, Snowden JS. Functional neuroanatomical associations of working memory in early-onset Alzheimer's disease. *International Journal of Geriatric Psychiatry* 2017. 33: 176–84 <https://doi.org/10.1002/gps.4703>.
 50. Kuroda E, Sugiura T, Zeki K, Yoshida Y, Yamashita U. Sensitivity difference to the suppressive effect of prostaglandin E2 among mouse strains: a possible mechanism to polarize Th2 type response in BALB/c mice. *Journal of Immunology* 2000. 164: 2386–95. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.5.2386>.

51. Kurylo DD, Corkin S, Rizzo III JF, Growdon JH. Greater relative impairment of object recognition than of visuospatial abilities in Alzheimer's disease. *Neuropsychology* 1996. 10: 74–81. <https://doi.org/10.1037/0894-4105.10.1.74>.
52. Lalonde R, Fukuchi K, Strazielle C. APP transgenic mice for modelling behavioral and psychological symptoms of dementia (BPSD). *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 2012. 36: 1357-1375. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.02.011>.
53. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology* 2018. 25: 59–70. <https://doi.org/10.1111/ene.13439>.
54. Lanz TA, Carter DB, Merchant KM. Dendritic spine loss in the hippocampus of young PDAPP and Tg2576 mice and its prevention by the ApoE2 genotype. *Neurobiology of Disease* 2003. 13: 246–53. [https://doi.org/10.1016/S0969-9961\(03\)00079-2](https://doi.org/10.1016/S0969-9961(03)00079-2).
55. Lawrence AD, Sahakian BJ. Alzheimer disease, attention, and the cholinergic system. *Alzheimer Disease and Associated Disorders* 1995. 9: 43–49.
56. Leger M, Quiedeville A, Bouet V, Haelewyn B, Boulouard M, Schumann-Bard P, Freret T. Object Recognition test in mice. *Nature Protocols* 2013. 8: 2531–37. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.155>.
57. Lemere CA. Developing novel immunogens for a safe and effective Alzheimer's disease vaccine. *Progress in Brain Research* 2009. 175: 83–93. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(09\)17506-4](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(09)17506-4).
58. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 1951. 193: 265–75.
59. Lussier FZ, Pascoal TA, Chamoun M, Therriault Jo, Tissot C, Savard M, Kang MS, Mathotaarachchi S, Benedet AL, Parsons M, Qureshi MNI, Thomas EM, Shin M, Dion LA, Massarweh G, Soucy JP, Tsai IH, Viyali P, Ismail Z, Rosa-Neto P., Gauthier S. Mild behavioral impairment is associated with β -amyloid but not tau or neurodegeneration in cognitively intact elderly individuals. *Alzheimer's & Dementia* 2020. 16: 192–99. <https://doi.org/10.1002/alz.12007>.
60. McLaughlin T, Feldman H, Fillit S, Sano M, Schmitt F, Aisen P, Leibman C, Mucha L, Ryan JM, Sullivan SD, Spackman DE, Neuman PJ, Cohen J, Stern Y. Dependence as a unifying construct in defining Alzheimer's disease severity. *Alzheimer's & Dementia: the Journal of the Alzheimer's Association* 2010. 6: 482–93 <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2009.09.004>.

61. Mega MS, Cummings JL, Fiorello T, Gornbein J. The spectrum of behavioral changes in Alzheimer's disease. *Neurology* 1996. 46: 130–35. <https://doi.org/10.1212/WNL.46.1.130>.
62. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Developments* 1992. 116: 201–11.
63. Muller R, Kubie JL, Ranck JB. Spatial firing patterns of hippocampal complex-spike cells in a fixed environment. *The Journal of Neuroscience* 1987. 7: 1935–50. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.07-07-01935.1987>.
64. Mumtaz F, Khan MI, Zubair M, Dehpour AR. Neurobiology and consequences of social Isolation stress in animal model-a comprehensive review. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2018. 105: 1205–22. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.086>.
65. Nestor PJ, Fryer TD, Ikeda M, Hodges JR. Retrosplenial Cortex (BA 29/30) Hypometabolism in mild cognitive impairment (prodromal Alzheimer's disease). *European Journal of Neuroscience* 2003. 18: 2663–67. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02999.x>.
66. Niu H, Álvarez-Álvarez I, Guillén-Grima F, Aguinaga-Ontoso I. Prevalence and incidence of Alzheimer's disease in Europe: a meta-analysis. *Neurología (English Edition)* 2017. 32: 523–32. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2016.02.009>.
67. Pengas G, Hodges JR, Watson P, Nestor PJ. Focal posterior cingulate atrophy in incipient Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 2010. 31: 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.03.014>.
68. Pengas, G, Williams GB, Acosta-Cabronero J, Ash TWJ, Hong YT, Izquierdo-Garcia D, Fryer TD, Hodges JR, Nestor PJ. The relationship of topographical memory performance to regional neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience* 2012. 4: 17. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2012.00017>.
69. Pike CJ. Sex and the development of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience Research* 2017. 95: 671–80. <https://doi.org/10.1002/jnr.23827>.
70. Pugh PL, Richardson JC, Bate ST, Upton N, Sunter D. Non-cognitive behaviours in an APP/PS1 transgenic model of Alzheimer's disease. *Behavioral Brain Research* 2007. 178: 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.11.044>.
71. Qu BX, Lambracht-Washington D, Fu M, Eagar TN, Stüve O, Rosenberg RN. Analysis of three plasmid systems for use in DNA A β 42 immunization as therapy for Alzheimer's Disease. *Vaccine* 2010. 28: 5280–87. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.05.054>.

72. Rae E, Brown R. The problem of genotype and sex difference in life expectancy in transgenic AD mice. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 2015. 57: 238–51. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.05.054>
73. Rotenberg A, Mayford M, Hawkins RD, Kandel ER, Muller RU. Mice Expressing activated CaMKII lack low frequency LTP and do not form stable place cells in the CA1 region of the hippocampus. *Cell* 1996. 87: 1351–61. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2015.09.002>.
74. Roy DS, Arons A, Mitchell TI, Pignatelli M, Ryan TJ, Tonegawa S. Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer’s disease. *Nature* 2016. 531: 508–12. <https://doi.org/10.1038/nature17172>.
75. Schenk D. Amyloid-beta immunotherapy for Alzheimer’s disease: the end of the beginning. *Nature Reviews Neuroscience* 2002. 3: 824–28. <https://doi.org/10.1038/nrn938>.
76. Selkoe DJ. Alzheimer’s disease is a synaptic failure. *Science* 2002. 298: 789–91. <https://doi.org/10.1126/science.1074069>.
77. Spíndola L, Brucki SMD. Prospective memory in Alzheimer’s disease and mild cognitive impairment. *Dementia & Neuropsychologia* 2011. 5: 64–68. <https://doi.org/10.1590/S1980-57642011DN05020002>.
78. Szentes N, Tékus V, Mohos V, Borbély E, Helyes Z. Exploratory and locomotor activity, learning and memory functions in somatostatin receptor subtype 4 gene-deficient mice in relation to aging and sex. *GeroScience* 2019. 41: 631–41. <https://doi.org/10.1007/s11357-019-00059-1>.
79. Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, Yndart A, Nair M. Alzheimer’s disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *International Journal of Nanomedicine* 2019. 14: 5541–54. <https://doi.org/10.2147/IJN.S200490>.
80. Tromp D, Dufour A, Lithfous S, Pebayle T, Després O. Episodic memory in normal aging and Alzheimer disease: insights from imaging and behavioral studies. *Ageing Research Reviews* 2015. 24: 232–62. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.08.006>.
81. Tsai PH. Clinical management of episodic memory changes in dementia. *Current Treatment Options in Neurology* 2018. 20: 6. <https://doi.org/10.1007/s11940-018-0491-8>.
82. Vann SD, Aggleton JP, Maguire EA. What does the retrosplenial cortex do? *Nature Reviews Neuroscience* 2009. 10: 792–802. <https://doi.org/10.1038/nrn2733>.
83. Victoroff J, Lin FV, Coburn KL, Shillcutt SD, Voon V, Ducharme S. Noncognitive behavioral changes associated with Alzheimer’s disease: implications of neuroimaging

- findings. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 2018. 30: 14–21. <https://doi.org/10.1176/appi.neuropsych.16080155>.
84. Vlček K, Laczó J. Neural correlates of spatial navigation changes in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 2014. 8: 89. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00089>.
 85. Vloeberghs E, Van Dam D, Coen K, Staufenbiel M, De Deyn PP. Aggressive male APP23 mice modeling behavioral alterations in dementia. *Behavioral Neuroscience* 2006. 120: 1380–83. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.120.6.1380>.
 86. Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature Protocols* 2006. 1: 848–58. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.116>.
 87. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols* 2007. 2: 322–28. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44>.
 88. Webster JS, Bachstetter AD, Nelson PT, Schmitt FA, Van Eldik LJ. Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Frontiers in Genetics* 2014. 5: 88. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00088>.
 89. Weissberger GH, Melrose RJ, Fanale CM, Veliz JV, Sultzer DL. Cortical metabolic and cognitive correlates of disorientation in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease* 2017. 60: 707–19. <https://doi.org/10.3233/JAD-170420>.
 90. Yang JY, Wang ZJ, Cai HY, Yuan L, Hu MM, Wu MN, Qi JS. Sex differences in neuropathology and cognitive behavior in APP/PS1/Tau triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience Bulletin* 2018. 34: 736–46. <https://doi.org/10.1007/s12264-018-0268-9>.
 91. Yew B, Alladi S, Mekala S, Hornberger M. Lost and forgotten? Orientation versus memory in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Journal of Alzheimer's Disease* 2013. 33: 473–81. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-120769>.
 92. Zhao QF, Tan L, Wang HF, Jiang T, Tan MS, Tan L, Xu W, Li JQ, Wang J, Lai TJ, Yu JT. The prevalence of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis. *Journal of Affective Disorders* 2016. 190: 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.09.069>.

RINGRAZIAMENTI

Al Professor Fiorenzo Conti, per l'alto valore scientifico della sua didattica.

Alla Dott.ssa Marta Balietti, per la costante disponibilità a fornire indicazioni fondamentali sia a livello contenutistico che formale per la mia ricerca.

A tutti quelli che nel Dipartimento di Fisiologia e all'INRCA mi hanno accompagnato e fatto apprendere il valore di una corretta e ben organizzata ricerca scientifica.

Alla mia famiglia per la costante vicinanza e il paziente supporto con cui mi ha sostenuto in tutto il mio percorso universitario.

A tutti gli amici che hanno condiviso con me le difficoltà e i successi durante questo lungo percorso di studi.