

## **EFFECTO PROTECTOR DEL TRATAMIENTO CON NEUROEPO SOBRE LA GLIA DE LA CORTEZA CEREBRAL EN RATONES TRANSGÉNICOS CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.**

**Autores:** Yamila Rodríguez Cruz<sup>1</sup>, Tanguí Maurice<sup>2</sup>, Johan Maunier<sup>2</sup>, Anaí García Fariñas<sup>3</sup>, Julio César García Rodríguez<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Médicas "Victoria de Girón". Cuba

<sup>2</sup> Universidad de Montpellier II. Francia.

<sup>3</sup> Escuela Nacional de Salud Pública. Cuba

### **RESUMEN**

Basado en el rol de la eritropoyetina como un potente protector celular, que muestra su potencial en la protección de las células nerviosas en modelos animales de isquemia cerebral y en enfermedades neurodegenerativas incluyendo la enfermedad de Alzheimer (EA)<sup>1-6</sup>. Se han desarrollado diferentes tipos de eritropoyetina humana recombinante (EPOhr) que no inducen la eritropoyesis incluyendo la eritropoyetina humana recombinante con bajo contenido de ácido siálico (NeuroEPO)<sup>7-10</sup>. La eritropoyetina (EPO) induce las neurotofina principales del cerebro tales como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) de sus siglas en inglés y el factor de crecimiento nervioso (NGF). La etiología de la EA no está totalmente esclarecida. Definir la contribución de las células del cerebro, neuronas y las glías en esta enfermedad constituye un interés científico. El objetivo de nuestro trabajo fue **evaluar en un modelo transgénico de enfermedad de Alzheimer que el candidato propuesto NeuroEPO por la vía nasal su efecto sobre la población glial y neuronal de la corteza cerebral. En este estudio mostramos la actividad protectora de esta formulación en modelo de ratón transgénico de enfermedad de Alzheimer. En estos modelos de ratones transgénicos Tg 2576, sobrepresan hAPP con una doble mutación Suisa. Se administró NeuroEPO a dosis de 125 y 250 µg /ml por vía nasal, tres veces al día, tres días a la semana durante los 12 y 13 meses de edad. Se realizaron determinaciones del BDNF, NGF y GFAP por técnicas de Elisa. Se observó un incremento de las**

citoquinas BDNF en los animales sanos dependiente de las dosis mientras que los transgénicos no muestran diferencias entre los grupos y el tratamiento con NeuroEPO dosis 125 µg/ml mostró una disminución de las células gliales como muestra de disminución de la inflamación. Estos resultados en su conjunto apuntan a la parcial eficacia del tratamiento con NeuroEPO cuando esta es aplicada en estadio desarrollado de la enfermedad. Los resultados aquí expresados apuntan que la producción y acumulación del péptido  $\beta$  amiloide ( $\beta$ -A) en un estadio avanzado de la EA es efectivo contra el proceso inflamatorio generado por la EA pero no es capaz de actuar sobre la necesaria recuperación de las neurotrofinas (BDNF y NGF) que son garantes de la homeostasis neuronal y que se ven fuertemente afectadas por la acumulación del  $\beta$ -A.

**Palabras claves: BDNF, NGF, GFAP, EPO. NeuroEPO, Neuroprotección.**

## **INTRODUCCIÓN**

La enfermedad de Alzheimer (EA) constituye un problema de salud a nivel mundial y constituye la causa más común de demencia, incurable y terminal en los adultos mayores. En estos momentos no existe una terapéutica específica y validada que permita mitigar el efecto devastador de esta enfermedad. La EA se manifiesta como un deterioro cognitivo y trastornos conductuales. Se caracteriza por una pérdida progresiva de la memoria y de otras capacidades mentales, a medida que lentamente se deterioran las células nerviosas en diversas zonas de la corteza cerebral, así como algunas circundantes, dañando así las capacidades de la persona de controlar, reconocer errores, coordinar y recordar; provocando finalmente la pérdida de toda la memoria y funcionamiento mental. La EA representa una verdadera entidad neurodegenerativa que por lo general, el síntoma inicial es la inhabilidad de adquirir nuevas memorias, pero suele confundirse con actitudes relacionadas con la vejez. Sus causas aún permanecen desconocidas, aunque existen diferentes factores que pretenden explicar el fenómeno <sup>1</sup>.

En Cuba el envejecimiento de la población nos llevará en los próximos años a que un 25% de nuestro pueblo sea adulto de la tercera o cuarta edad <sup>2</sup>. Por tanto, la aparición de las demencias y entre ellas la enfermedad de Alzheimer tendrán un notable incremento en el cuadro de salud de la población cubana, situación que tendrá un negativo impacto en la calidad de vida de la población así como un incremento en el presupuesto de los gastos de salud, por concepto de su atención especializada por invalidez. Esta situación la presentan también los países industrializados, para los

cuales constituye un reto actual de las neurociencias encontrar terapéuticas seguras y eficaces. Paradójicamente, nuestro país se encuentra en similar situación con el agravante de no disponer de la economía de los industrializados. No obstante, esta realidad nos lleva a buscar soluciones contra el deterioro cognitivo que genera esta enfermedad, para lo cual debemos profundizar en su estudio y en las posibilidades terapéuticas actuales y futuras, para obtener conocimientos más específicos de cómo actuar frente a esta enfermedad mejorando así el manejo y la calidad de vida de estos pacientes.

El empleo de moléculas recombinantes humanas obtenidas a través de la biotecnología con actividad terapéutica es una creciente línea de investigación en neurociencias. Un ejemplo de este tipo de moléculas es la eritropoyetina (EPO), que es una glicoproteína que se produce fundamentalmente en el riñón y está involucrada en la proliferación, diferenciación y maduración de los eritrocitos y otras células hematopoyéticas, aumentando el suministro de oxígeno a los tejidos<sup>3, 4</sup>.

Se conoce que con el transcurso de los años se incrementan los niveles de EPO en el líquido cefalorraquídeo<sup>5</sup>, desarrollándose una correlación positiva con la edad<sup>6</sup>, lo que puede ser interpretado como una respuesta fisiológica de neuroprotección endógena. Diversos estudios plantean que la alteración de la homeostasis de esta proteína puede jugar un deletéreo papel en diferentes enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer<sup>7</sup>.

Basado en el rol de la eritropoyetina como un potente protector celular, que muestra su potencial en la protección de las células nerviosas en modelos animales de isquemia cerebral y en enfermedades neurodegenerativas incluyendo la enfermedad de Alzheimer (EA)<sup>1-6</sup>. Se han desarrollado diferentes tipos de EPOhr que no inducen la eritropoyesis **incluyendo la eritropoyetina humana recombinante con bajo contenido de ácido siálico (NeuroEPO)**<sup>7-10</sup>.

La NeuroEPO es producida por el Centro de Inmunología Molecular y se dispone de propiedad intelectual sobre este novedoso producto, requisito indispensable para, una vez registrada y demostrada su eficacia y seguridad en la clínica, comercializarse como un nuevo producto de la industria biotecnológica de Cuba<sup>10</sup>.

La eritropoyetina (EPO) induce las neurotofina principales del cerebro tales como el factor **neurotrófico** derivado del cerebro (BDNF) de sus siglas en ingles y el factor de crecimiento nervioso (NGF) <sup>11</sup>. **La etiología de la EA no está totalmente esclarecida. Definir la contribución de las células del cerebro, neuronas y las glias en esta enfermedad constituye un interés científico.**

Teniendo en cuenta todos estos elementos, el objetivo de nuestro trabajo fue evaluar en un modelo transgénico de enfermedad de Alzheimer que el candidato propuesto NeuroEPO por la vía nasal sobre la población glial sobre las neuronas de la corteza cerebral en ratones adultos.

### **OBJETIVOS:**

1. Determinar el efecto de la NeuroEPO por vía intranasal sobre los niveles de citoquinas en corteza cerebral de animales transgénicos Tg2576 de la enfermedad de Alzheimer.
2. Identificar el efecto de la NeuroEPO por vía intranasal sobre las células gliales en corteza cerebral de animales transgénicos Tg2576 de la enfermedad de Alzheimer.

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se utilizaron ratones TG 2576 de doce meses de edad, con un peso entre  $25 \pm 2$  g. Los animales fueron obtenidos por la universidad de Montpellier en la firma Taconic. Estos fueron mantenidos en el bioterio de dicha universidad con las condiciones controladas de temperatura, humedad, iluminación, ventilación, ruido y cantidad de animales por unidad de área. El ensayo fue conducido y regido por lo establecido en la Guía de Buenas Prácticas para el Cuidado, Uso, y Reproducción de los Animales para la Experimentación, Principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio no Clínico, de Seguridad Sanitaria y Medio Ambiental, así como los Procedimientos Operacionales de Trabajo establecidos para el desarrollo de todas las actividades según las normas de la Unión Europea 2010/63.

La formulación nasal de NeuroEPO es preparada en el Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos CIDEM patente 20050138. Suministrada por el Centro de

Inmunología Molecular (CIM) La Habana Cuba. Se emplea el polímero bioadhesivo D-hidroxi-propilcelulosa, para aumentar el tiempo de residencia en la cavidad nasal y disminuir su eliminación por el movimiento ciliar. Otros excipientes para la estabilidad de la formulación son: buffer para estabilizar el pH, preservos para evitar la contaminación microbiológica e isotonzante para regular la presión osmótica. En lo adelante las referencias al vehículo incluyen todos los componentes de la formulación excepto la NeuroEPO.

## **Métodos**

Se aplicó la vía intranasal (IN) como está establecido en las Guías para cuidado y uso de los animales de laboratorio. Se aplicó la sujeción del animal, se colocó en decúbito supino y con una pipeta automática se aplicaron las dosis de cada protocolo en cada fosa nasal de forma lenta esperando que cada gota sea adsorbida lentamente por los animales, se tapó la boca para que el animal respirara por la nariz y absorbiera toda la aplicación, el tiempo de aplicación por animal fue de 1 a 2 minutos.

Se utilizaron un total de 49 animales con los que se confeccionaron de forma aleatoria 6 grupos de 7 animales, 3 grupos controles y 3 experimentales. Quedando los animales distribuidos de la siguiente forma:

Grupo control + Vehículo

Grupo control + NeuroEPO (125µg) intranasal

Grupo control + NeuroEPO (250µg) intranasal

Grupo Tg2576 + Vehículo

Grupo Tg2576 + NeuroEPO (125µg) intranasal

Grupo Tg2576 + NeuroEPO (250µg) intranasal

Los tratamientos por vía intranasal fueron aplicados tres veces a la semana a las 8.00am, 12.00m y 4.00pm durante dos meses desde los 12 meses de edad hasta los 14 meses de edad.

## **Determinaciones por Elisa de BDNF, NGF y GFAP**

Se les practicó la eutanasia a los animales después de dos semanas, tiempo en el que se realizaron las pruebas de conducta. Se extrajo el cerebro y se diseccionó en hielo su hipocampo y corteza, se pesaron, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron

a -80 ° C hasta su análisis. Después de la descongelación, la corteza se homogeneizó en PBS tampón, pH 7.4, y se sonicó durante 20s. Después de centrifugó a 16100g durante 15 min a 4 ° C, se utilizaron los sobrenadantes para ensayos ELISA de BDNF, NGF y GFAP de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BDNF: Ref. SEA604Mu; la NGF: Ref. SEA606Mu y la GFAP: Ref. SEA068Mu USCN, Wuhan, República Popular de China). Para cada ensayo, la absorbancia se leyó a 450 nm y concentración de la muestra se calculó utilizando la curva estándar. Todas las muestras se ensayaron por duplicado. Los resultados se expresan como pg de citoquina por mg de tejido húmedo.

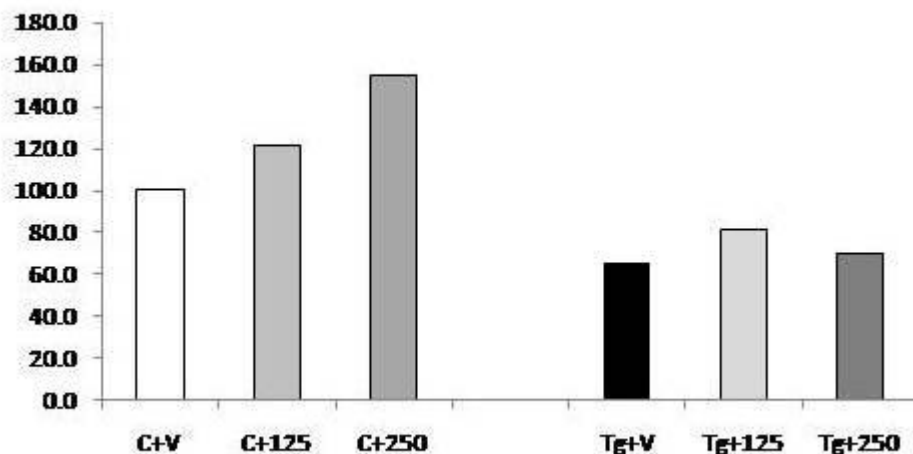
### **Análisis estadísticos**

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa Microsoft SPSS. En todos se aceptó un nivel de significación de 0.05. Los datos se analizaron usando un análisis unidireccional de varianza (ANOVA, valor de F), seguido de la prueba de Dunnett.

### **RESULTADOS**

En la evaluación del efecto de la NeuroEPO por vía intranasal sobre los niveles de citoquinas en corteza cerebral de los animales transgénicos Tg2576 de la enfermedad de Alzheimer se muestran en la figura 1 que los niveles en % del BDNF con un incremento dosis dependiente en los animales sanos cuando se usó la dosis 250µg/ml  $p < 0.000$  no así en los animales transgénicos donde los niveles fueron solo de un rango entre 60-80% del animal sano tratado con vehículo.

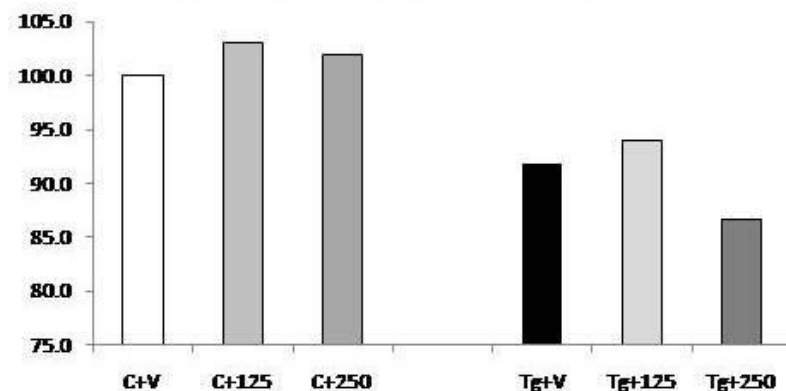
### BDNF ng/ml expresado en %



**Figura 1 se muestran los niveles en % del BDNF en homogenato de corteza cerebral de ratones controles y Tg2576 tratados por vía nasal con vehículo y NeuroEPO a dosis de 125 µg/ml y 250 µg /ml. La dosis de NeuroEPO 250µg/µl \*\*p<0.000 con respecto a los animales Tg2576.**

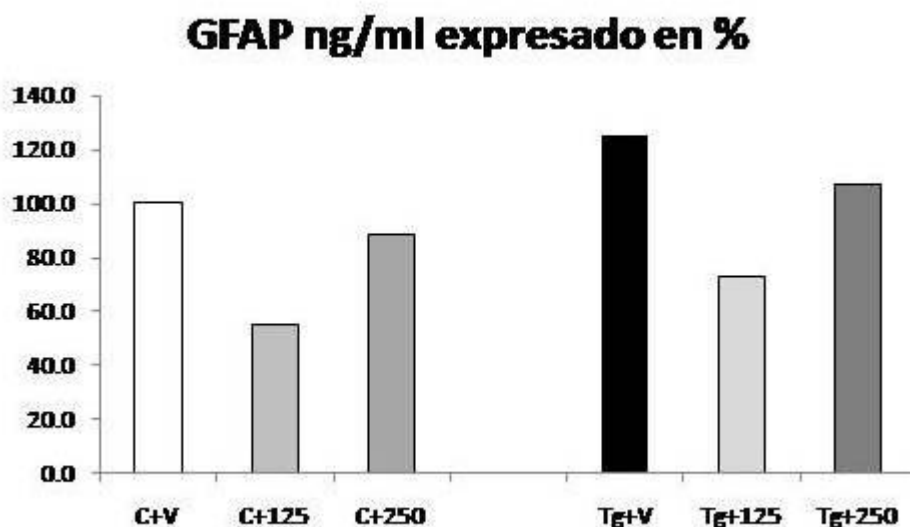
Los niveles en % del NGF en homogenato de corteza cerebral de ratones controles y Tg2576 tratados por vía nasal con vehículo y NeuroEPO a dosis de 125 µg/ml y 250 µg /ml se muestran en la figura 2. En los animales sanos no se detecto incremento dependiente de dosis, sin embargo en los animales transgénicos los niveles disminuyeron con la dosis de NeuroEpo 250 µg/ml no existiendo diferencias significativas entre los grupos.

### NGF pg/ml expresado en %



**Figura 2 se muestran los niveles en % del NGF en homogenato de corteza cerebral de ratones controles y Tg2576 tratados por vía nasal con vehículo y NeuroEPO a dosis de 125 µg/ml y 250 µg /ml. No se detectó diferencia en los grupos sanos ni en los en los animales Tg2576.**

En la Figura 3 se muestran los niveles en % del GFAP en homogenato de corteza cerebral de ratones controles y Tg2576 tratados por vía nasal con vehículo y NeuroEPO a dosis de 125 µg/ml y 250 µg /ml. Se observa comportamiento similar de los animales controles y transgénicos dependientes de la dosis con una disminución en los animales tratados con la dosis de NeuroEPO 125 µg/ml.



**Figura 3 se muestran los niveles en % del GFAP en homogenato de corteza cerebral de ratones controles y Tg2576 tratados por vía nasal con vehículo y NeuroEPO a dosis de 125 µg/ml y 250 µg /ml. Se observa que la dosis de NeuroEPO 125 µg/ml muestra diferencias con los animales tg 2576 tratados con vehículo \*  $p < 0.01$  Dunnett.**

## DISCUSIÓN



Se cree que la capacidad neuroprotectora de la EPO para involucrar principalmente la homeostasis celular extrínseca es por la modulación de la activación microglial y el control de la liberación de citoquinas <sup>11</sup>. Se ha demostrado que la EPO ejercen una acción anti-inflamatoria a través de vías que implican la exposición de fosfatidilserina la activación microglial, la actividad de Akt, y la regulación de las caspasas, o más directamente por la inhibición de varias citoquinas pro-inflamatorias, tales como IL-6, TNF-alfa y MCP-1 <sup>12,13,14</sup>.

La neuroinflamación inducida fue evaluada por la medición directa de los aumentos de citocinas en el tejido de la corteza. Se han reportado anteriormente las propiedades antioxidantes de la EPO para tener en cuenta al menos en parte por su efecto citoprotector en varios modelos. En cultivo de neuronas del hipocampo de rata sometidas a hipoxia o la exposición de glutamato, la administración de EPO dio lugar a una protección significativa <sup>12,15</sup>.

También se ha reportado que la EPO promueve una protección eficaz contra patologías inflamatorias. En trabajos previos, hemos observado un bloqueo muy potente de la Neuro-EPO del TNF-alfa y IL- **1 $\beta$**  provocados por la toxicidad del A $\beta$ 25-35 <sup>17</sup>. Se cree que la capacidad neuroprotectora de la EPO para involucrar principalmente la homeostasis celular extrínseca través de la modulación de la activación microglial y el control de la liberación de citoquinas <sup>12</sup>. Las microglia activadas liberan grandes cantidades de estas citoquinas pro-inflamatorias y neurotóxicas, incluyendo TNF-alfa y IL- **1 $\beta$** , sino también los radicales libres, como el óxido nítrico o iones superóxido, y los metabolitos de ácidos grasos, lo que podría contribuir de manera directa y amplían la muerte celular por apoptosis <sup>18</sup>. Se ha demostrado que la EPO ejercen una acción anti-inflamatoria a través de vías que implican la exposición de fosfatidilserina la activación microglial, la actividad de Akt, y la regulación de las caspasas, o más directamente por la inhibición de varias citoquinas pro-inflamatorias, tales como IL-6, TNF-alfa y MCP-1 <sup>12,13,14, 17</sup>.

Las evidencias preclínicas y clínicas determinadas por la deletérea acción del péptido  **$\beta$ -amiloide ( $\beta$ -A)** lo ha relacionado fuertemente en la etiología hipotética de la enfermedad de Alzheimer. Este efecto devastador sobre células gliales y neuronas de **los pequeños y solubles péptidos  $\beta$ -A** sobre la formación y función de la sinapsis. Reciente trabajo de Lison y col, 2014 <sup>19</sup> en modelo de ratón transgénico de la EA (5xFAD) demuestran que más que la pérdida neuronal en los estadios iniciales lo que

ocurre es una desconexión sináptica de los microcircuitos neuronales en las columnas corticales de la corteza cerebral siendo esta la principal causa de la pérdida de memoria.

En nuestro trabajo ha quedado demostrado la capacidad de la NeuroEPO de incrementar los niveles dosis dependiente, de las neurotrofinas BDNF y NGF en los animales controles. Sin embargo en los animales transgénicos no se evidenció esta **respuesta. Lo cual puede ser interpretado que la acumulación del  $\beta$ -A** en el tejido cerebral lo cual ha sido recientemente reportado por Fritschi y col, 2014 20. Esta **acumulación de  $\beta$ -A** interfirió en los mecanismos de regulación de los niveles de ambas neurotrofinas, sugiriendo una pérdida de la homeostasis interna del sistema neuronal y de su capacidad de respuesta ante injurias. Así como una disminución de la capacidad de la Neuroprotección endógena **producida por la acumulación del  $\beta$ -A.**

Sin embargo el efecto de la NeuroEPO en los animales controles y transgénicos sobre las poblaciones gliales fue cualitativamente similar. Disminuyendo los niveles de la GFAP, pudiendo interpretarse como una significativa disminución del proceso **inflamatorio generado por la acumulación del  $\beta$ -A** en los animales transgénicos tratados con la NeuroEPO intranasal.

Los resultados aquí expresados apuntan que la producción y acumulación del péptido  **$\beta$ -A** en un estadio avanzado de la EA. El tratamiento con NeuroEPO es efectivo contra el proceso inflamatorio generado por la EA, pero no es capaz de actuar sobre la necesaria recuperación de las neurotrofinas (BDNF y NGF) que son garantes de la homeostasis neuronal y que se ven **fuertemente afectadas por la acumulación del  $\beta$ -A.**

Evaluar en este modelo el efecto en estadios tempranos de la enfermedad digamos a los 3, 6 y 9 meses de vida del animal donde son relativamente inferiores los niveles de acumulación en lugar de los 12 meses parece ser una alternativa lógica para lograr el **momento optimo de proteger a las neuronas de la acumulación del  $\beta$ -A.**

En la biología comparativa, de tener éxito en la protección de las células gliales y neuronales con un esquema de tratamiento con NeuroEPO, estaríamos en un proceso de potenciación de la neuroprotección endógena la cual constituye uno de los mecanismos potencialmente más seguros contra las Neuroenfermedades.

## **Bibliografía.**

1. Mattson MP. Pathways Towards and Away from **Alzheimer's Disease**. *Nature*. 2004; 430(7000):631-9.
2. **Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy.** *Physiol Rev*. 2001; 81(2):741-66.
3. Walsh DM, Selkoe DJ. **A $\beta$  Oligomers a decade of discovery.** *J Neurochem*. 2007; 101(5):1172-84.
4. Lue LF, Kuo YM, Roher AE, Brachova L, Shen Y, Sue L, et al. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in **Alzheimer's disease**. *Am J Pathol*.1999; 155(3):853-62.
5. McLean CA, Cherny RA, Fraser FW, Fuller SJ, Smith MJ, Konrad Vbeyreuther et al. Soluble pool of **A $\beta$  amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease.** *Ann Neurol*.1999; 46(6):860-6.
6. Cheng IH, Scearce-Levie K, Legleiter J, Palop JJ, Gerstein H, Bien-Ly N, et al. **Accelerating Amyloid- $\beta$  Fibrillization Reduces Oligomer Levels and Functional Deficits in Alzheimer Disease Mouse Models.** *J Biol Chem*.2007; 282(33):23818-28.
7. Cesar Garcia-Rodriguez J, Rodriguez-Cruz Y. The Therapeutic Potential of NeuroEPO Administered Nasally on Acute Cerebrovascular Disease. *Curr Psychopharmacol*.2012; 1(3):228-32.
8. Garcia-Rodriguez JC, Sosa-Teste I. The nasal route as a potential pathway for delivery of erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke in humans. *ScientificWorldJournal*. 2009; 9: 970-81.
9. Rodríguez Cruz Y, Yuneidys Mengana T, Muñoz Cernuda A, Subirós Martines N, González-Quevedo A, Sosa Testé I, et al. Treatment with Nasal Neuro-EPO Improves the Neurological, Cognitive, and Histological State in a Gerbil Model of Focal Ischemia. *Sci World J*. 2010; 10:2288-300.
10. Sosa Testé I, García Rodríguez JC, García Salman JD, et al. (2006) Intra- nasal administration of recombinant human erythropoietin exerts neuroprotective effects on post-ischemic brain injury in mongolian gerbils. *Pharmacol Online* 1: 100–112.

11. Maiese K, Li F, Chong ZZ. Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? *Trends Pharmacol Sci.* 2004; 25(11):577-83.
12. Chong ZZ, Lin S-H, Kang J-Q, Maiese K. Erythropoietin prevents early and late neuronal demise through modulation of Akt1 and induction of caspase 1, 3, and 8. *J Neurosci Res.* 2003; 71(5): 659-69.
13. Chong ZZ, Kang J-Q, Maiese K. Apaf-1, Bcl-xL, cytochrome c, and caspase-9 form the critical elements for cerebral vascular protection by erythropoietin. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* 2003; 23(3): 320-30.
14. Chong ZZ, Maiese K. Erythropoietin involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway, 14-3-3 protein and FOXO3a nuclear trafficking to preserve endothelial cell integrity. *Br J Pharmacol.* 1 de abril de 2007; 150(7):839-50.
15. Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience.* enero de 1997; 76(1):105-16.
16. Kawakami M, Sekiguchi M, Sato K, Kozaki S, Takahashi M. Erythropoietin Receptor-mediated Inhibition of Exocytotic Glutamate Release Confers Neuroprotection during Chemical Ischemia. *J Biol Chem.* 19 de octubre de 2001; 276(42):39469-75.
17. Maurice T, Mustafa M-H, Desrumaux C, Keller E, Naert G, García MC, Rodríguez Y, Garcia JC. Intranasal formulation of erythropoietin (EPO) showed potent protective activity against amyloid toxicity in the A beta25-35 non-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Psychopharmacology.* 2013;0.0:1-14
18. Naert G, Rivest S. The role of microglial cell subsets in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* marzo de 2011; 8(2): 151-5.
19. Lison H, Happel MF, Schneider F, Baldauf K, Kerbstat S, Seelbinder B, Schneeberg J, Zappe M, Goldschmidt J, Budinger E, Schröder UH, Ohl FW, Schilling S, Demuth HU, Scheich H, Reymann KG, Rönicke R. Disrupted cross-laminar cortical processing in  $\beta$  amyloid pathology precedes cell death. *Neurobiol Dis* 2014 Mar; 63:62-73. doi: 10.1016/j.nbd.2013.11.014.

20. Fritschi SK, Langer F, Kaeser SA, Maia LF, Portelius E, Pinotsi D, Kaminski CF , Winkler DT, Maetzler W, Keyvani K, Spitzer P, Wiltfang J, Kaminski Schierle GS, Zetterberg H, Staufenbiel M, Jucker M. Highly potent soluble amyloid- $\beta$  **seeds** in human Alzheimer brain but not cerebrospinal fluid. *Brain*. 2014 Sep 10. pii: awu255.