



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE MICROGLÍA Y  
ASTROCITOS EN UN MODELO DE RATÓN TRIPLE TRANSGÉNICO  
PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (3XTGAD).**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**IDALID BERENICE BRITO TORRES**

**ASESOR**

**GOHAR GEVORGYAN**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX. 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO**

PRESIDENTE	PROFESOR ENRIQUE ORTEGA SOTO
VOCAL	PROFESOR ALLAN NOÉ DOMÍNGUEZ ROMERO
SECRETARIO	PROFESOR GOHAR GEVORGYAN
1° SUPLENTE	PROFESOR OCTAVIO CASTRO ESCAMILLA
2° SUPLENTE	PROFESOR ALBERTO GARCÍA LOZANO

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE LA DRA. GOHAR GEVORGYAN, EN EL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, Y RECIBIÓ APOYO FINANCIERO POR EL PROGRAMA DE APOYOS A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA (PAPIIT-DGAPA-UNAM) IN203319.

DRA. GOHAR GEVORGYAN

**ASESOR**

BIÓL. EXP. GONZALO ASARIEL ACERO GALINDO

**SUPERVISOR TÉCNICO**

IDALID BERENICE BRITO TORRES

**SUSTENTANTE**

EN RECUERDO CARIÑOSO DE MI PADRE,  
SERAFÍN BRITO.

## **AGRADECIMIENTOS**

A MIS PADRES, CARMEN TORRES Y SERAFÍN BRITO, QUIENES CON AMOR, SACRIFICIO Y ESFUERZO ME DIERON LA OPORTUNIDAD DE CONVERTIRME EN QFB. GRACIAS POR ESTAR SIEMPRE PRESENTE Y POR SER LOS PRINCIPALES PROMOTORES DE MIS SUEÑOS, POR APOYARME CON ENTUSIASMO TANTO EN MIS LOGROS COMO EN MIS FRACASOS. GRACIAS POR CUIDARME Y GUIARME CON SUS CONSEJOS Y VALORES, GRACIAS POR SER UN EJEMPLO DE LO QUE ES SER UNA EXCELENTE PERSONA. LOS QUIERO.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO POR HABERME ACOGIDO DESDE EL BACHILLERATO, POR BRINDARME LA MEJOR ENSEÑANZA DEL PAÍS Y POR PRESTARME SUS DIVERSAS INSTALACIONES PARA CONSOLIDAR MÍ PROYECTO PROFESIONAL. ASÍ COMO POR PROPORCIONARME APOYO FINANCIERO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO DE TESIS, MEDIANTE EL PROGRAMA PAPIIT-DGAPA-UNAM.

A LA DRA. GOHAR GEVORGYAN, QUIEN ME ABRIÓ LAS PUERTAS DE SU LABORATORIO Y ME GUÍO CON CONFIANZA Y PACIENCIA DURANTE TODA LA REALIZACIÓN DE ESTE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.

AL BIÓL. EXP. GONZALO ASARIEL ACERO GALINDO QUE CORRIGIÓ MIS MÚLTIPLES INEXACTITUDES Y QUIEN EN NUMEROSAS OCASIONES INFLUYÓ EN MI FORMACIÓN ACADÉMICA Y PERSONAL CON SUS VALIOSAS ENSEÑANZAS.

A LA QFB. MIRIAM NAVA CATORCE POR SUS PERTINENTES OBSERVACIONES Y SUGERENCIAS.

A MI HERMANA GRIS BRITO POR SU APOYO INCONDICIONAL A LO LARGO DE TODA LA CARRERA.

A MIS AMIGOS, EN ESPECIAL A BRAULIO DANIEL LÓPEZ VÁZQUEZ, ENRIQUE MORGADO MARTÍNEZ, MIGUEL ÁNGEL GONZÁLEZ TÉLLEZ, CÉSAR AUGUSTO PÉREZ SUÁREZ Y SERGIO ANTONIO MACEDO HERRERA, QUIENES ME ACOMPAÑARON Y ME GUIARON EN NUMEROSAS OCASIONES DURANTE LA LICENCIATURA.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA).....	1
1.2 EL PÉPTIDO B-AMILOIDE (BA).....	3
1.2.1 PROTEÍNA PRECURSORA AMILOIDE (APP).....	4
1.2.2 PROCESAMIENTO PROTEOLÍTICO DE LA APP.....	6
1.3 MICROGLÍA.....	8
1.3.1 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN.....	8
1.3.2 PAPEL FISIOLÓGICO DE LA MICROGLÍA.....	9
1.3.3 MARCADORES MOLECULARES DE MICROGLÍA.....	11
1.4 ASTROCITOS.....	12
1.4.1 ORIGEN Y MORFOLOGÍA.....	12
1.4.2 FUNCIONES FISIOLÓGICAS DE LOS ASTROCITOS.....	13
1.4.3 MARCADORES MOLECULARES DE ASTROCITOS.....	16
2. ANTECEDENTES DIRECTOS.....	17
2.1 NEUROINFLAMACIÓN.....	17
2.1.1 RESPUESTA MICROGLIAL A LAS ESPECIES B-AMILOIDES EN LA EA.....	18
2.1.2 RESPUESTA DE ASTROCITOS EN LA EA.....	21
2.2 MODELO DE LA RATÓN TRIPLE TRANSGÉNICO PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (3XTGAD).....	23
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
4. HIPÓTESIS.....	24
5. OBJETIVOS.....	24
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
7. RESULTADOS.....	28
7.1 ACTIVACIÓN MICROGLIAL DEPENDIENTE DE LA EDAD EN RATONES 3XTGAD....	28

7.1.1	HIPOCAMPO (SUBÍCULO): HEMBRAS. ....	28
7.1.2	HIPOCAMPO (SUBÍCULO): MACHOS.....	30
7.1.3	HIPOCAMPO (CA1): HEMBRAS.....	31
7.1.4	HIPOCAMPO (CA1): MACHOS.....	33
7.1.5	CORTEZA: HEMBRAS.....	34
7.1.6	CORTEZA: MACHOS. ....	36
7.1.7	DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE IBA1 ENTRE MACHOS Y HEMBRAS. ....	37
7.2	ACTIVACIÓN DE ASTROCITOS DEPENDIENTE DE LA EDAD EN RATONES 3XTGAD. 39	
7.2.1	HIPOCAMPO (SUBÍCULO): HEMBRAS. ....	39
7.2.2	HIPOCAMPO (SUBÍCULO): MACHOS.....	41
7.2.3	HIPOCAMPO (CA1): HEMBRAS.....	42
7.2.4	HIPOCAMPO (CA1): MACHOS. ....	44
7.2.5	DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE GFAP ENTRE MACHOS Y HEMBRAS .....	45
8.	DISCUSIÓN.....	47
9.	CONCLUSIONES. ....	53
10.	PERSPECTIVAS.....	54
11.	ANEXO I.....	55
11.1	MORFOLOGÍA MICROGLIAL EN RATONES 3XTGAD.....	55
11.2	MORFOLOGÍA DE ASTROCITOS EN RATONES 3XTGAD.....	56
12.	ANEXO II.....	57
13.	REFERENCIAS.....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS DE LA EA.....	3
FIGURA 2. ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA PRECURSORA AMILOIDE (APP). ....	5
FIGURA 3. PROCESAMIENTO PROTEOLÍTICO DE APP. ....	7
FIGURA 4. MICROGLÍA EN EL EMBRIÓN Y EL PERIODO PRENATAL.....	10
FIGURA 5. RESUMEN ESQUEMÁTICO DE LOS DIVERSOS ROLES DESEMPEÑADOS POR LOS ASTROCITOS EN EL FUNCIONAMIENTO DEL SNC. ....	14
FIGURA 6. CAMBIOS PATOLÓGICOS DE LAS CÉLULAS GLIALES. ....	18
FIGURA 7. RECEPTORES MICROGLIALES QUE COORDINAN LAS RESPUESTAS INMUNITARIAS INNATAS EN LA EA. ....	20
FIGURA 8. RESPUESTA MICROGLIAL A LAS ESPECIES BA.....	21
FIGURA 9. ACTIVACIÓN DE ASTROCITOS EN MAMÍFEROS. ....	22
FIGURA 10. ESQUEMA DE DETECCIÓN DE IBA1 Y GFAP. ....	27
FIGURA 11. ACTIVACIÓN MICROGLIAL DEPENDIENTE DE LA EDAD EN LA REGIÓN DE SUBÍCULO DE RATONES HEMBRA.....	29
FIGURA 12. ACTIVACIÓN MICROGLIAL DEPENDIENTE DE LA EDAD EN LA REGIÓN DE SUBÍCULO DE RATONES MACHO. ....	31
FIGURA 13. ACTIVACIÓN MICROGLIAL DEPENDIENTE DE LA EDAD EN LA REGIÓN DE CA1 DE RATONES HEMBRA.....	32
FIGURA 14. ACTIVACIÓN MICROGLIAL DEPENDIENTE DE LA EDAD EN LA REGIÓN DE CA1 DE RATONES MACHO. ....	34
FIGURA 15. ACTIVACIÓN MICROGLIAL DEPENDIENTE DE LA EDAD EN CORTEZA DE RATONES HEMBRA. ....	35
FIGURA 16. ACTIVACIÓN MICROGLIAL DEPENDIENTE DE LA EDAD EN CORTEZA DE RATONES MACHO.....	37



FIGURA 17. DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE IBA1 ENTRE SEXOS.....	38
FIGURA 18. ACTIVACIÓN DE ASTROCITOS DEPENDIENTE DE LA EDAD EN SUBÍCULO DE RATONES HEMBRA. ....	40
FIGURA 19. ACTIVACIÓN DE ASTROCITOS DEPENDIENTE DE LA EDAD EN SUBÍCULO DE RATONES MACHO.....	42
FIGURA 20. ACTIVACIÓN DE ASTROCITOS DEPENDIENTE DE LA EDAD EN CA1 DE RATONES HEMBRA. ....	43
FIGURA 21. ACTIVACIÓN DE ASTROCITOS DEPENDIENTE DE LA EDAD EN CA1 DE RATONES MACHO.....	45
FIGURA 22. DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE GFAP ENTRE SEXOS.....	46
FIGURA 23. ACTIVACIÓN DE MICROGLÍA EN RATONES 3xTGAD. ....	55
FIGURA 24. MORFOLOGÍA DE ASTROCITOS REACTIVOS EN RATONES 3xTGAD. ....	56

## ABREVIATURAS

$\beta$ A	Péptido $\beta$ -amiloide
ADAD	Enfermedad de Alzheimer autosómica dominante
AICD	Dominio intracelular de la proteína precursora amiloide
ALB	Albúmina
AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5metil-isoxa-zolpropiónico
APH-1	Proteína defectiva de faringe anterior-1
APOE	Apolipoproteína E
APP	Proteína precursora amiloide
BACE1	Enzima de escisión de APP del sitio $\beta$ 1
BACE2	Enzima de escisión de APP del sitio $\beta$ 2
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
C-83	Fragmento C-terminal de APP de 83 aminoácidos
C-99	Fragmento C-terminal de APP de 99 aminoácidos
CNTF	Factor neurotrófico ciliar
CuBD	Dominio de unión a cobre
CSPGs	Proteoglicanos de condroitin sulfato
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la línea celular glial recombinante
GPCs	Glipicanos
HBD	Dominio de unión a heparina
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina
IntDen	Densidad Integrada

KPI	Inhibidor de la proteasa de Kunitz
KYN	Quinurenina
LIF	Factor inhibidor de la leucemia
MMP	Metaloproteinasas de matriz
NE	Norepinefrina
NFG	Factor de crecimiento nervioso
NFT	Ovillos neurofibrilares
NLRP3	Receptor tipo NOD con dominio de pirina-3
OPCs	Células progenitoras de oligodendrocitos
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
SAD	Enfermedad de Alzheimer esporádica
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
TLRs	Receptores tipo Toll
TREM2	Receptor activador expresado en las células mieloides 2
THBSs	Trombospondinas
PS	Presenilina
PSEN1	Presenilina 1
PSEN2	Presenilina 2
PEN2	Potenciador de presenilina 2

## **1. INTRODUCCIÓN.**

### **1.1 Enfermedad de Alzheimer (EA).**

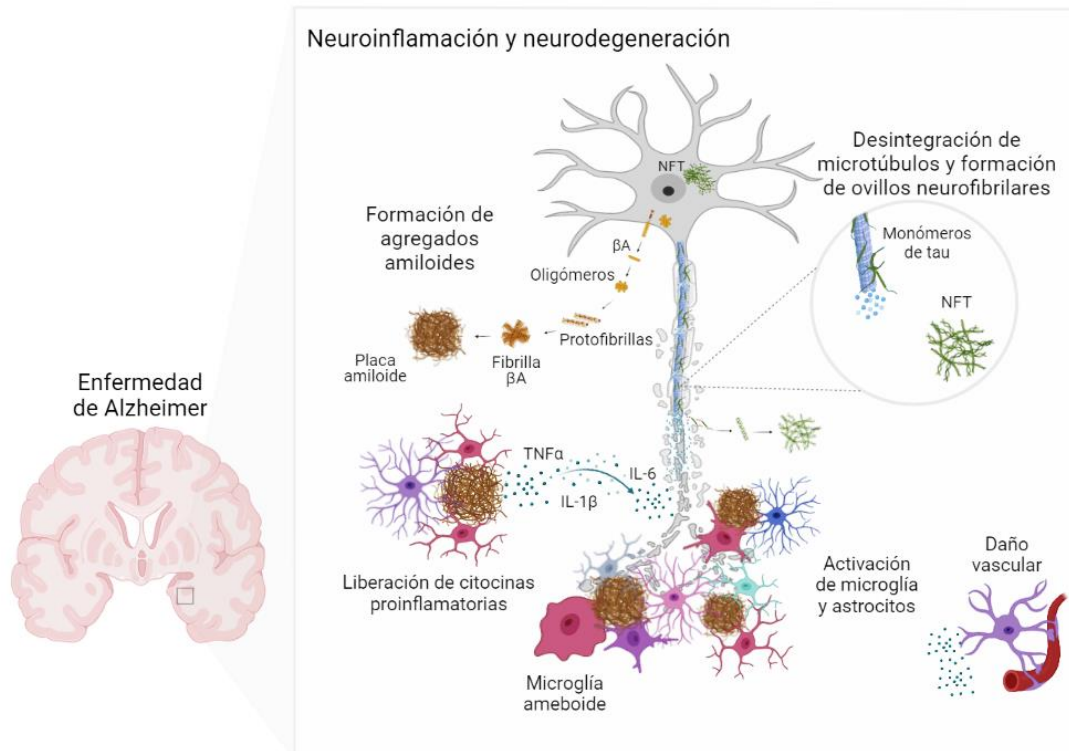
La demencia es un síndrome causado por diversas enfermedades neurodegenerativas, en las que se observa el deterioro de la función cognitiva más allá de lo que podría considerarse una consecuencia del envejecimiento normal y que interfiere significativamente con la capacidad de una persona para mantener actividades de la vida cotidiana (WHO, 2017). Actualmente, la demencia afecta aproximadamente a 50 millones de personas en todo el mundo y se prevé que esta cifra incremente hasta los 78 millones para el año 2030 y a los 139 millones para el año 2050. La enfermedad de Alzheimer es la forma más común de demencia y se sabe que puede contribuir al 60-70 % de todos los casos (WHO, 2022). En México se estima que aproximadamente un millón trecientas mil personas padecen esta enfermedad (Secretaría de Salud de México, 2022).

En la actualidad, existen cuatro medicamentos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration), como tratamiento para la EA. Tres de ellos son inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa (donepezil, rivastigmina y galantamina), mientras que el cuarto medicamento, es un antagonista de los receptores N-metil-D-aspartato (memantina), y pueden ser administrados de forma individual o combinada (donepezil con memantina). Sin embargo, estos medicamentos mejoran por tiempo limitado la sintomatología, pero ninguno de ellos afecta la enfermedad subyacente, ni detienen o demoran el daño celular que eventualmente conduce a un agravamiento de los síntomas. Recientemente, la FDA otorgó la aprobación acelerada para el uso de otros dos tratamientos de una nueva categoría, anticuerpos monoclonales dirigidos al péptido  $\beta$ -amiloide (aducanumab y lecanemab), que podrían actuar como agentes modificadores de la enfermedad (Food and Drug Administration, 2023). No obstante, los beneficios clínicos de estos anticuerpos todavía se encuentran en verificación y no han sido aprobados por otras agencias reguladoras.

La EA puede surgir de manera esporádica (SAD), o seguir un patrón de herencia autosómica-dominante (ADAD). La mayoría de los pacientes con EA presentan la SAD, también conocida como EA de aparición tardía (LOAD), ya que generalmente se detecta a partir de los 65 años. Las causas de esta forma de EA, involucran la interacción de factores ambientales y factores de riesgo genético, como la presencia de la variante  $\epsilon 4$  del gen de la apolipoproteína E (APOE), en el cromosoma 19 (Lane et al, 2018). Por otro lado, la ADAD es una forma de EA de inicio temprano (EOAD), relacionada con mutaciones en el gen APP que codifica para la proteína precursora amiloide (cromosoma 21), el gen PSEN1 para Presenilina I (cromosoma 14), o en el gen PSEN2 para Presenilina II (cromosoma 1). Las mutaciones del gen *PSEN2* representan solo un pequeño porcentaje de los casos de ADAD y se asocian con una edad de inicio tardía, así como con una progresión de la enfermedad más lenta comparada con las mutaciones en *PSEN1* y *APP*. La ADAD representa menos del 1 % de todos los casos de EA, sin embargo, las mutaciones causales tienen las mismas consecuencias bioquímicas conocidas que la SAD, lo que permite identificar y estudiar a individuos décadas antes de que desarrollen los síntomas clínicos (Bateman et al, 2011).

Histológicamente, la EA se caracteriza por dos tipos de lesiones: (1) placas difusas y neuríticas extracelulares que están compuestas predominantemente por el péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta A$ ), y (2) ovillos o marañas neurofibrilares (NFT), que son filamentos agregados de la proteína tau hiperfosforilada (Fig.1; Selkoe, 2001; Oddo S. et al, 2003). Se ha encontrado que los péptidos  $\beta A$  pueden depositarse en cerebro décadas antes de la aparición de los síntomas clínicos y además, la acumulación de  $\beta A$  precede a la formación de ovillos neurofibrilares; por ello, la investigación sobre la EA ha tenido como principal objetivo terapéutico, el péptido  $\beta A$  (Oddo S. et al, 2003; Ennerfelt and Lukens, 2020). Además de las lesiones patológicas clásicas de la EA, el cerebro sufre una respuesta inmune que conduce a cambios morfológicos y bioquímicos en la microglía y astrocitos. Estas células gliales inician una cascada proinflamatoria que resulta en un aumento de los niveles de citocinas como la interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Por otro lado, también se han descrito alteraciones en

la función vascular, como la reducción del flujo sanguíneo cerebral y la disrupción de la barrera hematoencefálica (Belfiore R. et al, 2018; Henstridge, C. M. et al, 2019).



**Figura 1. Características patológicas de la EA.** Los péptidos  $\beta A$  generados en la membrana neuronal son liberados al espacio extracelular y se agregan en forma de placas, seguido por la activación glial y la fosforilación anormal de la proteína tau, que se agrega en forma de ovillos neurofibrilares, los cuales desestabilizan los microtúbulos e interrumpen el transporte axonal. Creado con BioRender (2022).

## 1.2 El péptido $\beta$ -amiloide ( $\beta A$ ).

En 1984 Glenner y Wong realizaron la purificación y secuenciación de una proteína derivada de fibrillas compuestas por láminas  $\beta$ -plegadas, extraídas de depósitos amiloides meningo vasculares en cerebros post-mortem de pacientes con EA (Glenner & Wong, 1984). El péptido  $\beta A$  fue reconocido como la subunidad de la placa amiloide que posteriormente se identificó en la secuencia del gen precursor APP (Selkoe, 2001). A partir de estos descubrimientos se han propuesto múltiples hipótesis para explicar las causas subyacentes de la EA, como la cascada amiloide,

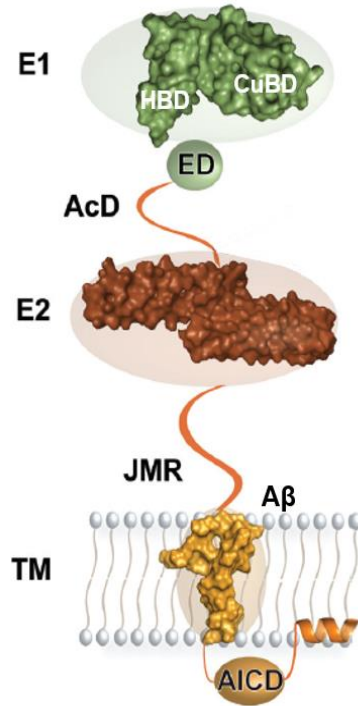
fosforilación de la proteína tau, disfunción mitocondrial, neuroinflamación, daño vascular y problemas metabólicos.

La hipótesis de la cascada amiloide propuesta en 1992 por Hardy & Higgins, postula que el péptido  $\beta$ A es la causa principal del proceso neurodegenerativo observado en personas con EA. La formación, agregación y deposición de  $\beta$ A inicia una secuencia de eventos citotóxicos que conducen al daño vascular, disfunción sináptica, pérdida neuronal y demencia (Hardy & Higgins, 1992). En condiciones fisiológicas, el péptido  $\beta$ A se genera a partir de escisiones proteolíticas secuenciales de la Proteína Precursora Amiloide (APP), pero la alteración en su procesamiento puede aumentar la producción y/o acumulación de  $\beta$ A (Selkoe & Hardy, 2016). Los péptidos  $\beta$ A están conformados por 36 a 43 aminoácidos y se ensamblan en diferentes estados como oligómeros, protofibrillas y fibrillas, que finalmente pueden acumularse en forma de placas (Gandy, 2005). La principal especie generada es  $\beta$ A40, que corresponde a casi el 90 % del  $\beta$ A secretado. Otro péptido es  $\beta$ A42, que a pesar de que se genera en menor cantidad, es más propenso a la agregación y es el principal componente de las placas seniles (Bayer et al. 1999; Jacobsen & Iverfeldt, 2009). En una segunda etapa, surge la respuesta glial que puede conducir a la neuroinflamación, en la que se promueve una liberación persistente de citocinas proinflamatorias. Además, existe un estado de estrés oxidativo constante que favorece la hiperfosforilación de la proteína tau y en consecuencia, la formación de NFTs, que posteriormente, se acumularán en los cuerpos neuronales y en el espacio sináptico, interfiriendo en la captación y liberación de neurotransmisores, incluso, pueden llegar a ocasionar apoptosis neuronal (Folch et al., 2018).

### **1.2.1 Proteína Precursora Amiloide (APP).**

El gen APP es miembro de una familia de genes altamente conservados (Wasco et al, 1992), que codifican para proteínas transmembranales de tipo I, donde se incluyen APLP1 y APLP2 en mamíferos, APPL en *Drosophila melanogaster*, APL-1 en *Caenorhabditis elegans* (Zheng & Koo, 2006; Jacobsen & Iverfeldt, 2009), y APPa y APPb en el pez cebra (Guo et al, 2012). Aunque estas proteínas comparten

los dominios E1 y E2 en las secuencias extracelulares, así como el dominio intracelular, el dominio del péptido  $\beta$ A es exclusivo del gen APP humano (Zheng & Koo, 2006).



**Figura 2. Estructura de la Proteína Precursora Amiloide (APP).** La APP consta de un ectodominio al que se le pueden asignar varios subdominios: E1, donde se encuentran los sitios de unión a heparina (HBD), y cobre (CuBD); El dominio de extensión (ED), ubicado entre E1 y el dominio ácido flexible (AcD); y E2 que contiene los sitios de unión para colágeno y laminina, además de un segundo sitio de unión a heparina. La región de yuxtamembrana (JMR), es el sitio donde se localiza el N-terminal del  $\beta$ A, péptido que se extiende hasta la región transmembranal (TM). Finalmente, la APP posee un dominio intracelular en su región C-terminal (AICD). Un tercio del ectodominio de APP no ha sido caracterizado. Modificado de Coburger et al. 2014.

La proteína APP se expresa en sistema nervioso (cerebro, médula espinal, retina), músculo (liso, cardíaco y esquelético), timo, bazo, riñón, pulmón, páncreas, próstata y glándula tiroidea (Liu et al. 2008; Dawkins & Small, 2014). Esta proteína es codificada en un gen localizado en el cromosoma 21, que al expresarse da lugar a 8 isoformas generadas por splicing alternativo, con longitudes que varían de 365 a 770 aminoácidos (Sandbrink et al. 1996; Zheng & Koo, 2006). Las isoformas

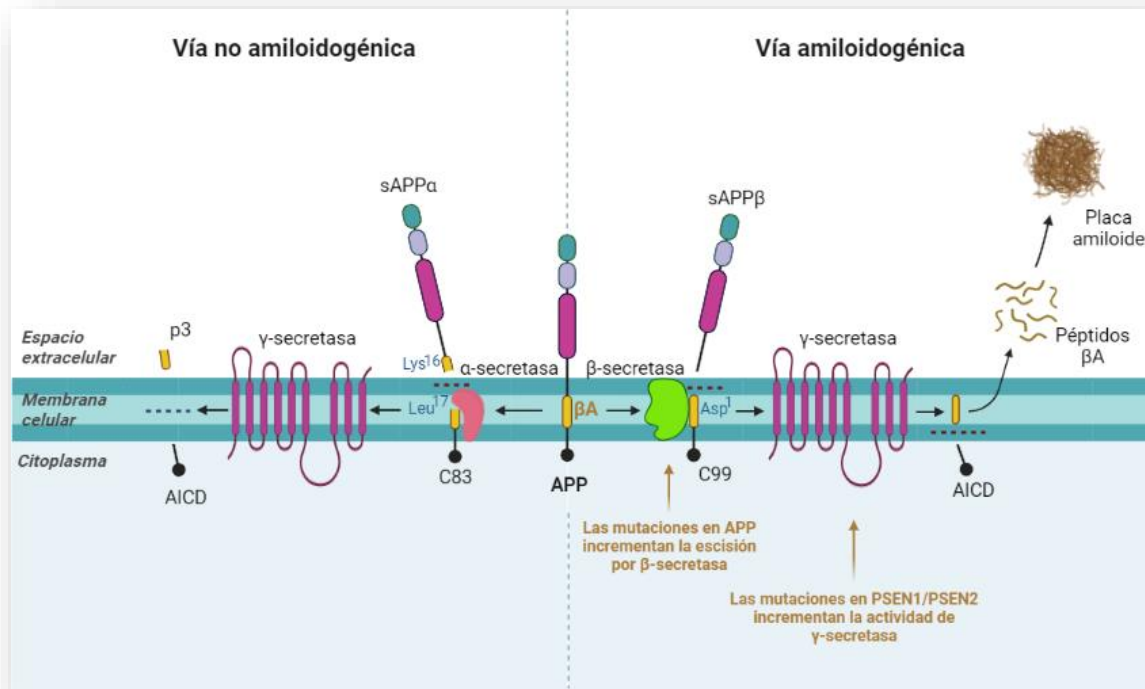


APP751 y APP770 se expresan principalmente en los tejidos periféricos y contienen el dominio del inhibidor de la proteasa de Kunitz (KPI) de 56 aminoácidos, mientras que, la isoforma predominante en neuronas es APP695 y no contiene el dominio KPI (Zhang et al. 2011; Fig. 2). En el SNC, la APP está involucrada en la regulación de la supervivencia neuronal, la adhesión celular, la sinaptogénesis, así como en la protección frente a estímulos externos (Reinhard et al. 2005; Folch et al., 2018). Además, se ha sugerido que APP podría funcionar como un receptor de superficie celular similar a la proteína Notch, debido a la analogía de sus estructuras secundarias y perfiles de procesamiento proteolíticos (Kimberly et al. 2001; Zheng & Koo, 2006; Ables et al. 2011).

### **1.2.2 Procesamiento proteolítico de la APP.**

Durante su síntesis, la APP se trasloca co-traduccionalmente al retículo endoplásmico mediante su péptido señal y se modifica post-traduccionalmente por *N*- y *O*-glicosilación, a través de la vía secretora (Selkoe, 2001). Sólo una pequeña fracción de moléculas de APP se transporta a la membrana plasmática (aproximadamente el 10 %), mientras que el resto de APP en estado estacionario, permanece principalmente en la red trans-Golgi (TGN; Gandy, 2005).

El procesamiento de APP se efectúa por dos vías, según la longitud y función del péptido escindido resultante (Fig. 3). La mayor parte de APP sigue la vía no amiloidogénica, que comienza con la escisión de APP por una metaloproteinasa de zinc o por la aspartil proteasa BACE2, en el sitio de  $\alpha$ -secretasa, entre Lys16 y Leu17 del dominio  $\beta$ A. Como resultado se desprende el fragmento N-terminal de APP (sAPP $\alpha$ ), que permanece en el espacio extracelular. Consecutivamente, el fragmento C-terminal unido a la membrana (C-83), es escindido por la  $\gamma$ -secretasa, un complejo multimérico formado por cuatro proteínas transmembranales (presenilina 1 o 2, nicastrina, PEN2 y APH-1). Esta escisión produce un péptido extracelular soluble p3 (3kDa), mínimamente tóxico y que evita la generación del péptido  $\beta$ A intacto (Anderson et al., 1991; Gertsik et al. 2015).



**Figura 3. Procesamiento proteolítico de APP.** **Vía no amiloidogénica:** esta vía implica la escisión de APP por las enzimas α-secretasa y γ-secretasa en la región membranal, lo que genera un péptido soluble no tóxico (p3). **Vía amiloidogénica:** las enzimas β-secretasa y γ-secretasa escinden APP y liberan el péptido βA, que puede agregarse y formar placas amiloides. Ambos procesos desprenden fragmentos C-terminales intracelulares idénticos (AICD). Creado con BioRender (2022).

En la vía amiloidogénica, la escisión de APP por una β-secretasa (BACE1, localizada predominantemente en la TGN y en los endosomas), genera los fragmentos N-terminal soluble (sAPPβ), y C-terminal unido a membrana (C-99). Al igual que en la vía no amiloidogénica, ocurre una segunda escisión por γ-secretasa, donde se libera el péptido βA (4kDa). Además, se obtiene un polipéptido citoplasmático conocido como el dominio intracelular de APP (AICD), que se transfiere al núcleo y funciona como un regulador transcripcional (Scott & Gandy, 2006; Thinakaran & Koo, 2008; Zhao et al., 2020). El AICD contiene a YENPTY, un dominio conservado evolutivamente que dirige la APP para su internalización y transporte en vesículas recubiertas por clatrina (Chen et al., 1990). Las capas de clatrina están involucradas en la ruta endocítica que conecta la superficie celular

con el endosoma y la ruta que conecta la TGN con el endosoma (Traub, 2005). Por otro lado, hay evidencia de que la enzima  $\beta$ -secretasa madura se encuentra predominantemente en el endosoma, con niveles relativamente más bajos, distribuidos entre la superficie celular y la TGN (Huse et al., 2000). Lo que sugiere que la vía amiloidogénica no solo ocurre en la membrana plasmática, sino que una vez que APP alcanza la superficie celular, se puede internalizar rápidamente en los endosomas y ser procesada en estos organelos (Thinakaran and Koo, 2008; Bu, 2009).

### **1.3 Microglía.**

#### **1.3.1 Origen y distribución.**

La microglía es un conjunto de células inmunes innatas residentes en la retina y el parénquima del SNC, que muestran similitudes en la expresión de receptores de superficie celular con los macrófagos (Leng & Edison, 2021). Son la primera línea de defensa frente a invasores, esculpen los circuitos neuronales, participan en diversos procesos del desarrollo neurológico y son las células responsables de iniciar la respuesta inmunitaria ante la patología de la EA, dando lugar a un complejo conjunto de fenotipos. Anteriormente, se creía que la población microglial surgía a partir de células madre hematopoyéticas derivadas de la médula ósea (Ginhoux et al. 2010). Actualmente, se sabe que la microglía se origina en el día embrionario (E) 7.5, a partir de progenitores eritro-mieloides del saco vitelino (Ginhoux & Williams, 2016), que migran al neuroepitelio antes del cierre de la barrera hematoencefálica, en el día E 10.5 (Saijo & Glass, 2011). Una vez en el SNC, los progenitores llevan a cabo una rápida multiplicación y creación de un conjunto de células residuales con la capacidad para renovarse de manera independiente (Ransohoff & Cardona, 2010).

La microglía constituye del 5 % al 12 % de la población celular del SNC de roedores, dependiendo de la región (Lawson et al., 1990), mientras que en humanos, la microglía tiene una variabilidad regional que es similar a la de los roedores pero esta va del 0.5 % y el 16.6 % (Mittelbronn et al. 2001). Estas células inmunitarias se

distribuyen en todas las divisiones principales del cerebro de manera no uniforme. En roedores, se ha encontrado que las regiones con la mayor cantidad de microglía son: hipocampo, telencéfalo olfativo, ganglios basales y sustancia nigra (Lawson, 1990; Gomez-Nicola & Perry, 2015).

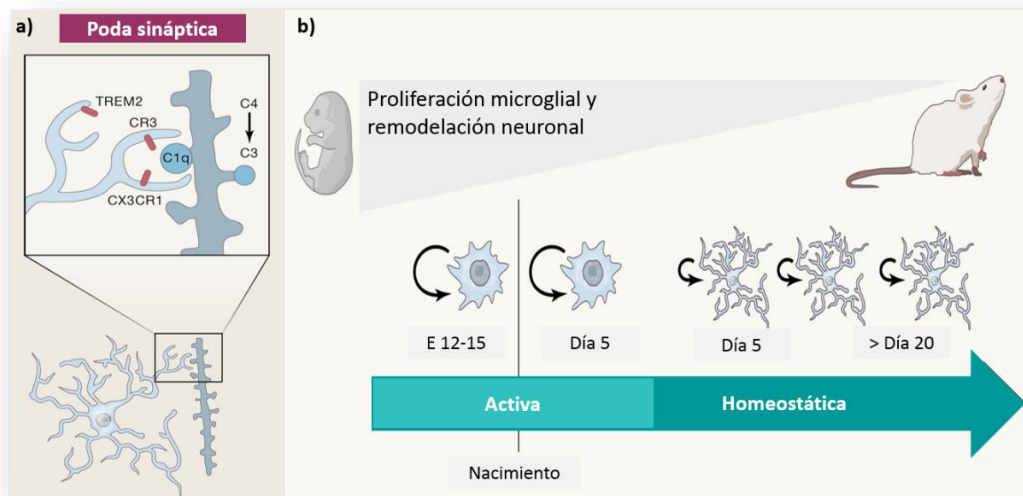
### **1.3.2 Papel fisiológico de la microglía.**

Las microglías son células constituidas por procesos altamente móviles, con los que vigilan su entorno hasta 10 veces más allá del cuerpo celular. Esto les permite detectar alteraciones y elaborar un diverso espectro de respuestas para restaurar la homeostasis tisular (Kettenmann et al., 2013).

#### **1.3.2.1 Neurodesarrollo.**

Durante el periodo prenatal temprano (Fig. 4), y en ausencia de otras células gliales, la microglía interviene de manera crítica en el establecimiento del número y patrón espacial de neuronas, mielinización, formación y refinamiento neuronal (Healy et al., 2016; Frost & Schafer, 2016; Prinz et al., 2019). En el embrión y la ventana postnatal temprana, la microglía guía el desarrollo neuronal a través de distintos procesos como la producción del factor de necrosis tumoral (TNF), la liberación del factor de crecimiento nervioso (NGF), y la fagocitosis (Frade & Barde, 1998; Matejuk & Ransohoff, 2020). En particular, la poda sináptica dependiente de microglía juega un papel fundamental en la configuración de la conectividad de los circuitos neuronales en el desarrollo y cerebro adulto (Jung & Chung, 2018). En este proceso, la microglía elimina de manera selectiva las sinapsis no funcionales, mediante la vía clásica del complemento y la fagocitosis, que normalmente funcionan para eliminar patógenos y células apoptóticas (Hansen et al., 2018). A su vez, la poda sináptica se encuentra regulada por la integrina CD47 neuronal, que activa SIRP $\alpha$  para detener la fagocitosis (Lehrman et al., 2018). De forma alternativa a la poda sináptica dependiente del complemento, existen otros mecanismos para la eliminación de espinas dendríticas, como la vía de señalización de fractalcina (Cx3cl1-Cx3cr1), que actúa a través de la liberación de Cx3cl1 soluble para promover el reclutamiento microglial. Asimismo, esta vía se encuentra implicada en

otros procesos fisiológicos como el suministro de factores tróficos durante la formación del circuito neuronal (Paolicelli et al., 2011; Ueno et al., 2013), y su interrupción por deficiencia del receptor Cx3cr1 microglial, puede conducir a la reducción de la neurogénesis en el hipocampo, memorias asociativa y espacial (asociadas con altos niveles IL-1 $\beta$ ), así como a déficits en el aprendizaje motor (relacionados con el incremento de TNF- $\alpha$  en el cerebelo; Rogers et al., 2011; Katsumoto et al., 2014). Por el contrario, las señales del entorno cerebral también pueden influir en la microglía a través de cambios en la transcripción de genes, morfología y número de células (Lavin et al., 2014; Hammond et al. 2019). Por ejemplo, las neuronas liberan el factor estimulante de colonias-1 (CSF1) e IL-34, ligandos del receptor CSF-1R, que junto con el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), son necesarios para la diferenciación y proliferación de microglía (Saijo & Glass, 2011; Katsumoto et al., 2014; Butovsky et al., 2014). Asimismo, durante el desarrollo, la microglía muestra una morfología ameboide asociada al exceso de poda sináptica (Lawson, 1990; Monier et al., 2006).



**Figura 4. Microglía en el embrión y el periodo prenatal.** a) Desde la etapa embrionaria, la microglía se encarga de la poda sináptica mediante proteínas del complemento, fractalcina y TREM2. b) Durante el desarrollo, la microglía adopta un fenotipo activado y alta proliferación. Modificado de Prinz et al., 2019.

### **1.3.2.2 Cerebro adulto.**

La homeostasis de la actividad neuronal también se encuentra regulada por la microglía. Se ha visto que en respuesta a la elevación local de la actividad neuronal, se activan los hemicanales de pannexina-1 en los somas y desencadenan la secreción de ATP, un estimulador clave para la quimiotaxis microglial, por lo que, los procesos microgliales en reposo son atraídos hacia la fuente de ATP y tras el contacto neurona-microglía se reduce la actividad neuronal (Li et al., 2012). La microglía también interviene en la modulación de la actividad sináptica excitatoria e inhibitoria a través de la liberación de moléculas de señalización como TNF- $\alpha$  o el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). TNF- $\alpha$  puede actuar mediante un aumento en la expresión de receptores AMPA (Stellwagen et al., 2005). Por su parte, el BDNF microglial, desencadena la autofosforilación de TrkB neuronal para modular la transmisión sináptica glutamatérgica y la plasticidad (Parkhurst et al., 2013). Además, la microglía puede desprender vesículas extracelulares que interactúan con la membrana plasmática neuronal y mejoran la transmisión sináptica excitadora, a través de la inducción del metabolismo de los esfingolípidos, que se han relacionado con la liberación de neurotransmisores (Antonucci et al., 2012).

### **1.3.3 Marcadores moleculares de microglía.**

La identificación microglial es posible gracias a la detección de moléculas intracelulares o asociadas a su superficie celular. Estos marcadores pueden ser detectables independientemente del fenotipo celular, como la molécula adaptadora de unión a calcio ionizado 1 (IBA1), los clústers de diferenciación CD68, CD11b, CD14, CD45, CD80, CD115, el receptor de fractalcina (Cx3cr1), y F4/80, este último no se encuentra en humanos (Kettenmann et al., 2011; Jurga et al., 2020). No obstante, estos marcadores microgliales también se han detectado en macrófagos. Por otro lado, algunos de estos marcadores aumentan su expresión durante la activación microglial, tal es el caso de IBA1, CD68, CD11b y el complejo mayor de histocompatibilidad II (MHCII). Particularmente, la proteína IBA1 es un marcador ampliamente utilizado en los análisis inmunohistoquímicos, debido a su especificidad y a su sobreexpresión durante la activación microglial (Imai et al.,

1996; Hopperton et al., 2018). Además, en un análisis de RNA-seq, se identificó un subconjunto de microglías asociadas a enfermedad (DAM), que presentan mayor expresión de genes para los marcadores Trem2, Tyrobp, Clec7a, Lilrb4, CD74, Csf1, Ccl6, entre otros, así como una disminución de Tmem119, P2ry12 y Cx3cr1 (Keren-Shaul et al., 2017).

## **1.4 Astroцитos.**

### **1.4.1 Origen y morfología.**

Los astroцитos son células parenquimatosas que cubren de manera ubicua el SNC y constituyen el grupo de células gliales más abundantes (Ventura & Harris, 1999; Sofroniew, 2020). Se estima que los astroцитos corresponden a un porcentaje del 20 al 40% del número total de células en cerebros de mamíferos, dependiendo de la región cerebral (Herculano-Houzel, 2014; Khakh & Sofroniew, 2015). Los astroцитos derivan de células neuroepiteliales de origen ectodérmico que recubren los ventrículos cerebrales durante el desarrollo embrionario temprano, que luego se convierten en células gliales radiales y finalmente, se diferencian en neuronas, astroцитos y más tarde en oligodendrocitos (Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009; Tabata, 2015). Los astroцитos se caracterizan por una arborización intrincada con especializaciones anatómicas que controlan las interacciones locales con otros elementos del SNC (Hickman, 2018). Cada astrocito ocupa un territorio cerebral distinto y están acoplados físicamente entre sí con un alto nivel de conectividad intercelular, a través de conexinas que forman canales de uniones gap (Santello et al., 2019).

La población astrocítica está formada por células complejas y funcionalmente diversas, que fueron descritas por primera vez en el siglo XIX (Kimelberg, 2004; Khakh & Sofroniew, 2015). Desde entonces se han encontrado diversos subtipos de astroцитos con diferencias considerables en el tamaño, morfología, densidad, tasa de proliferación y expresión de receptores dentro de regiones específicas del SNC de mamíferos sanos (Emsley & Macklis, 2006; Oberheim et al., 2009). Sin embargo, la subdivisión realizada por Kolliker y Andriezen proporciona un panorama

general para el estudio de los astrocitos. En esta clasificación se considera la estructura y ubicación de dos subtipos principales: astrocitos protoplásmicos y astrocitos fibrosos (Kettenmann & Verkhratsky, 2008). El primer subtipo es el más abundante en cerebros de humanos, primates inferiores y roedores. Estos astrocitos se encuentran ampliamente distribuidos en la materia gris y cada célula consiste en un soma que emite un conjunto de prolongaciones de las que surgen ramificaciones más finas en una distribución globoide uniforme (Sofroniew & Vinters, 2010). Los astrocitos protoplásmicos se asocian estrechamente con las sinapsis y con los vasos sanguíneos a través de sus procesos vasculares (pies terminales). En humanos, son 2.6 veces más grandes (Oberheim et al., 2009), y diez veces más ramificados que en roedores. Por el contrario, los astrocitos fibrosos se localizan en la materia blanca y se diferencian por tener prolongaciones mucho más largas (muy similares a fibras). Los astrocitos fibrosos presentan un menor grado de ramificación en comparación con los astrocitos protoplásmicos, y especialmente, se asocian con los nódulos de Ranvier y las vías axonales, donde apoyan la mielinización (Sofroniew & Vinters, 2010; Allen & Eroglu 2017). Adicionalmente, se han descrito astrocitos interlaminares y de proyección varicosa, que destacan en la comunicación de larga distancia, a través de las capas corticales en primates de orden superior (Oberheim et al., 2009; Vasile et al., 2017).

#### **1.4.2 Funciones fisiológicas de los astrocitos.**

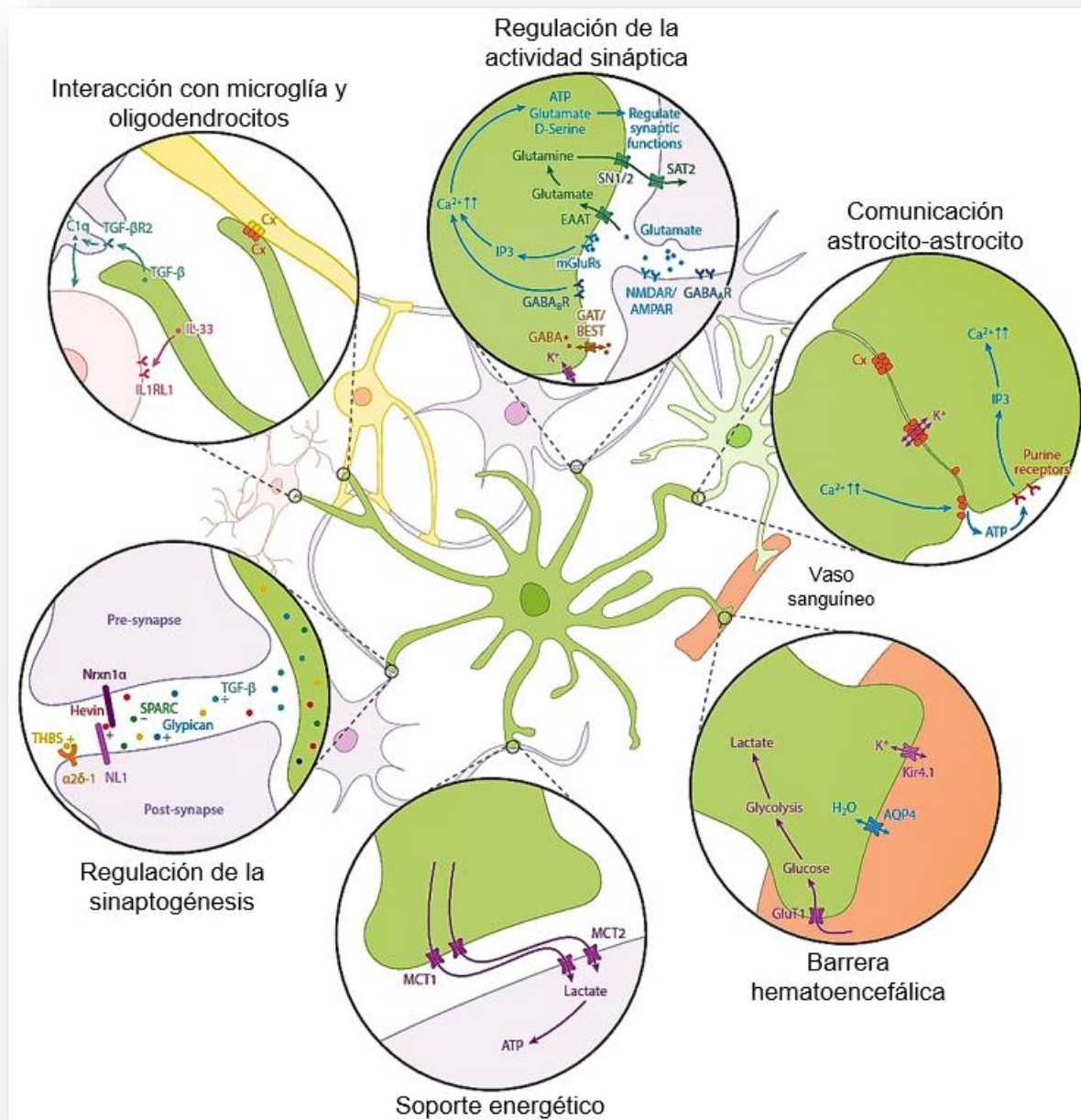
Los astrocitos son reconocidos como elementos clave en el soporte estructural y metabólico neuronal, así como por su contribución en la homeostasis cerebral (Fig. 5).

##### **1.4.2.1 Glía limitante.**

La BHE es una membrana altamente selectiva, formada por células endoteliales conectadas a través de uniones estrechas y rodeadas por una membrana basal con pericitos intercalados (Quintana, 2017). La glía limitante es una segunda barrera, constituida por los pies terminales astrocíticos, que se encarga del mantenimiento y la permeabilidad de la BHE (Sofroniew & Vinters, 2010). Por ejemplo, los astrocitos secretan moléculas difusibles como el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) y el factor de crecimiento



transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), que regulan la formación de las uniones estrechas (Abbott et al., 2006; Chaboub & Deneen, 2013).



**Figura 5. Resumen esquemático de los diversos roles desempeñados por los astrocitos en el funcionamiento del SNC.** BEST, bestrofina; Cx, conexina; EAAT, transportador de aminoácidos excitatorios; GluT1, transportador de glucosa 1; MCT 1/2, transportador de monocarboxilatos 1/2; mGluRs, receptores metabotrópicos de glutamato; NMDAR, receptores de N-metil-D-aspartato; Nrxn1 $\alpha$ , Neurexina1 $\alpha$ ; THBS, Trombospondinas. Modificado de Khakh & Deneen, 2019.

#### **1.4.2.2 Sinaptogénesis y neurotransmisión.**

Los astrocitos interactúan con las neuronas en estructuras conocidas como “sinapsis tripartitas” (de manera transitoria en el cerebro en desarrollo), en las que responden a la actividad neuronal a través de la liberación de gliotransmisores, como ATP, glutamato, GABA y D-serina, los cuales se unen a sus respectivos receptores neuronales para modular la transmisión sináptica y mantener la homeostasis neuronal (Araque et al., 1999; Halassa et al., 2007; Harada et al., 2016). Los astrocitos también controlan los altos niveles de glutamato extracelular a través de la recaptación del glutamato liberado sinápticamente (Shigeri et al., 2004). Asimismo, los astrocitos liberan enzimas implicadas en el metabolismo del glutamato, como la glutamina sintetasa, que cataliza la conversión de glutamato a glutamina (Bak et al., 2006), y la enzima glutaminasa activada por fosfato que cataliza la reacción de glutamina a glutamato (Uwechue et al., 2012; Kvamme & Torgner, 2000). Por otro lado, los astrocitos influyen en la actividad sináptica al mantener los niveles adecuados de pH, iones, agua y neurotransmisores, gracias a proteínas transportadoras como la acuaporina 4 (AQP4), o los transportadores para la captación de  $K^+$  (Guillamón-Vivancos et al., 2015).

Los astrocitos secretan proteínas, lípidos y pequeñas moléculas que se unen a los receptores neuronales para regular la sinaptogénesis (Baldwin & Eroglu, 2017). Por ejemplo, durante el desarrollo y después de una lesión en el SNC, los astrocitos aumentan el número de sinapsis mediante la liberación de trombospondinas (THBS), una familia de proteínas homólogas de matriz extracelular, que se unen a la subunidad del canal de calcio  $\alpha 2\delta$ -1 en las neuronas. Estas THBS tienen la capacidad para inducir la formación de sinapsis estructuralmente normales, que son presinápticamente activas y postsinápticamente silenciosas debido a la falta de receptores AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5metil-isoxa-zolpropiónico), pero que actúan con otras señales derivadas de los astrocitos para producir sinapsis funcionales (Christopherson et al., 2005; Eroglu et al., 2009; Guillamón-Vivancos et al., 2015). Otro de los factores sinaptogénicos secretados por los astrocitos, es la proteína Hevin (conocida como SPARC-like1 / SPARCL1), que induce la formación

de sinapsis talamocorticales al promover la interacción entre las moléculas de adhesión neurexina-1 $\alpha$  (NRX1 $\alpha$ ) y neuroligina-1B (NL1B). Además, la liberación astrocítica del factor de crecimiento transformante beta-1 (TGF- $\beta$ 1) promueve la formación de sinapsis tanto excitadoras como inhibitorias, a diferencia de las THBS y Hevin que solamente inducen la sinaptogénesis excitadora (Baldwin & Eroglu, 2017).

#### **1.4.2.1 Energía y Metabolismo.**

Los procesos metabólicos neuronales dependen de la actividad de los astrocitos; sus características morfológicas y fenotípicas les permiten absorber la glucosa de los vasos sanguíneos y suministrarla de manera apropiada a las neuronas (Falkowska et al., 2015). En el cerebro adulto, la glucosa es almacenada en forma de glucógeno casi exclusivamente en los astrocitos y predomina en áreas de alta densidad sináptica (Phelps, 1972; Bélanger et al., 2011). Durante la hipoglucemia y en periodos de intensa actividad neuronal, el glucógeno se descompone en lactato y se transfiere a los somas o axones neuronales adyacentes donde se usa aeróbicamente como fuente de energía (Brown & Ransom, 2007).

#### **1.4.3 Marcadores moleculares de astrocitos.**

Los astrocitos se caracterizan por una alta expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), una proteína de filamentos intermedios de tipo III, que en conjunto con vimentina, nestina y ocasionalmente sinemina, forman el citoesqueleto astrogial (Pekny & Pekna, 2004). La GFAP se encuentra predominantemente pero no exclusivamente en los astrocitos (Messing & Brenner, 2020). Su expresión aumenta con la edad (Nichols et al. 1993), y cuando los astrocitos asumen un fenotipo reactivo en isquemia, enfermedades neurodegenerativas y otros tipos de lesiones en el SNC (Hol & Pekny, 2015). Esta proteína es considerada un marcador sensible y confiable para la mayoría de los astrocitos, principalmente de aquellos que responden a lesiones del SNC (Sofroniew & Vinters, 2010). Existen otros marcadores como las proteínas citosólicas S100B, ALDH1L1, AldoC, y glutamina sintetasa, que permiten la visualización de los somas y algunos de los procesos

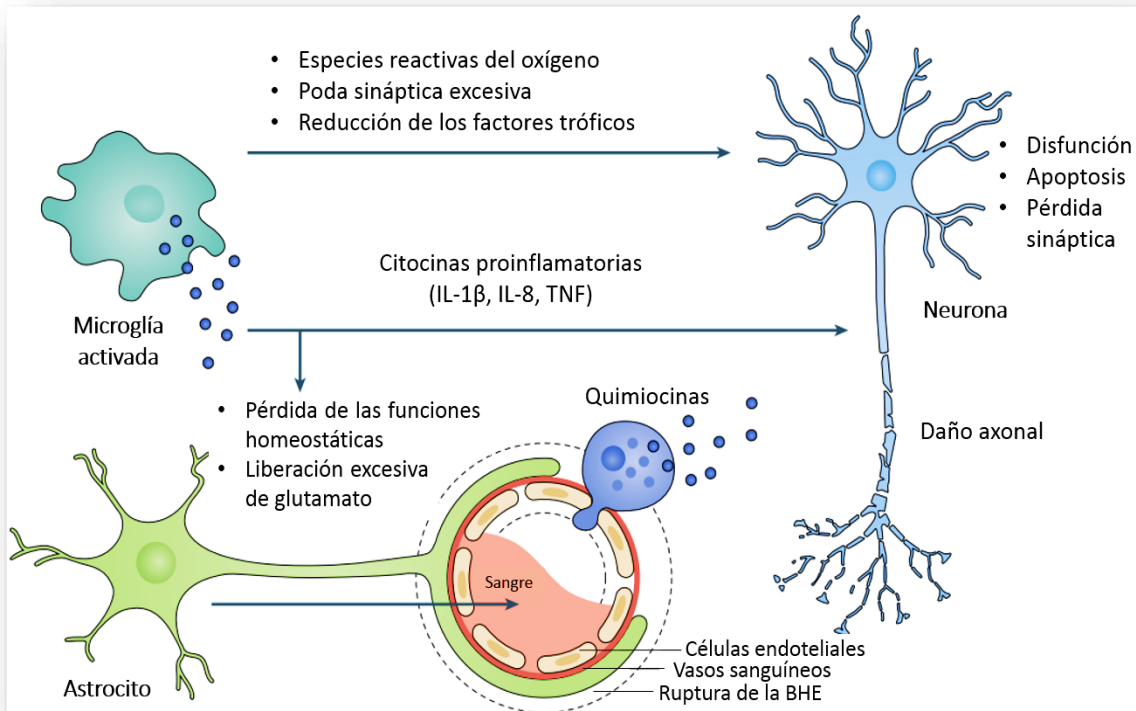
proximales, así como los transportadores de aminoácidos excitadores EAAT-1 y EAAT-2, pero que no son óptimos para evaluar la morfología compleja de los astrocitos por su tendencia a generar tinciones difusas (Sosunov et al., 2014; Escartin et al., 2021). Otros marcadores identificados son las conexinas Cx43 y Cx30 (que forman las uniones gap), la acuaporina 4, que revela preferentemente los pies terminales astrocíticos y, el factor de transcripción SOX9 que muestra el núcleo pero no los perfiles astrogliales completos (Verkhatsky & Nedergaard, 2018).

## **2. ANTECEDENTES DIRECTOS.**

### **2.1 Neuroinflamación.**

La neuroinflamación es una respuesta fisiológica protectora necesaria para regular los procesos asociados a diversas formas de daño en el sistema nervioso central y periférico, debido a infecciones, toxinas ambientales, traumatismos, accidentes cerebrovasculares, tumores, desórdenes metabólicos y enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, la perturbación de cualquiera de los componentes de la respuesta inflamatoria puede comprometer el microambiente celular y volverlo nocivo (González-Reyes et al., 2017; Sofroniew, 2020). En el SNC, el proceso neuroinflamatorio incluye la activación microglial y astrocítica (Fig. 6), aumento en la producción de mediadores inflamatorios, incremento en la permeabilidad vascular e infiltración de células inmunes periféricas, especialmente cuando la barrera hematoencefálica presenta daños bioquímicos o mecánicos (Ji et al., 2014). La liberación de citocinas proinflamatorias puede provocar disfunción sináptica, muerte neuronal e inhibición de la neurogénesis. Por otro lado, la activación del sistema del complemento promueve la función fagocítica de la microglía, lo que podría resultar en un exceso de poda sináptica. Aunque también se producen citocinas antiinflamatorias como parte de un mecanismo para contrarrestar la neuroinflamación, en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas como la EA, la inflamación tiende a ser un proceso crónico que

no se resuelve por sí solo y se considera un impulsor de la enfermedad (Leng & Edison, 2021).



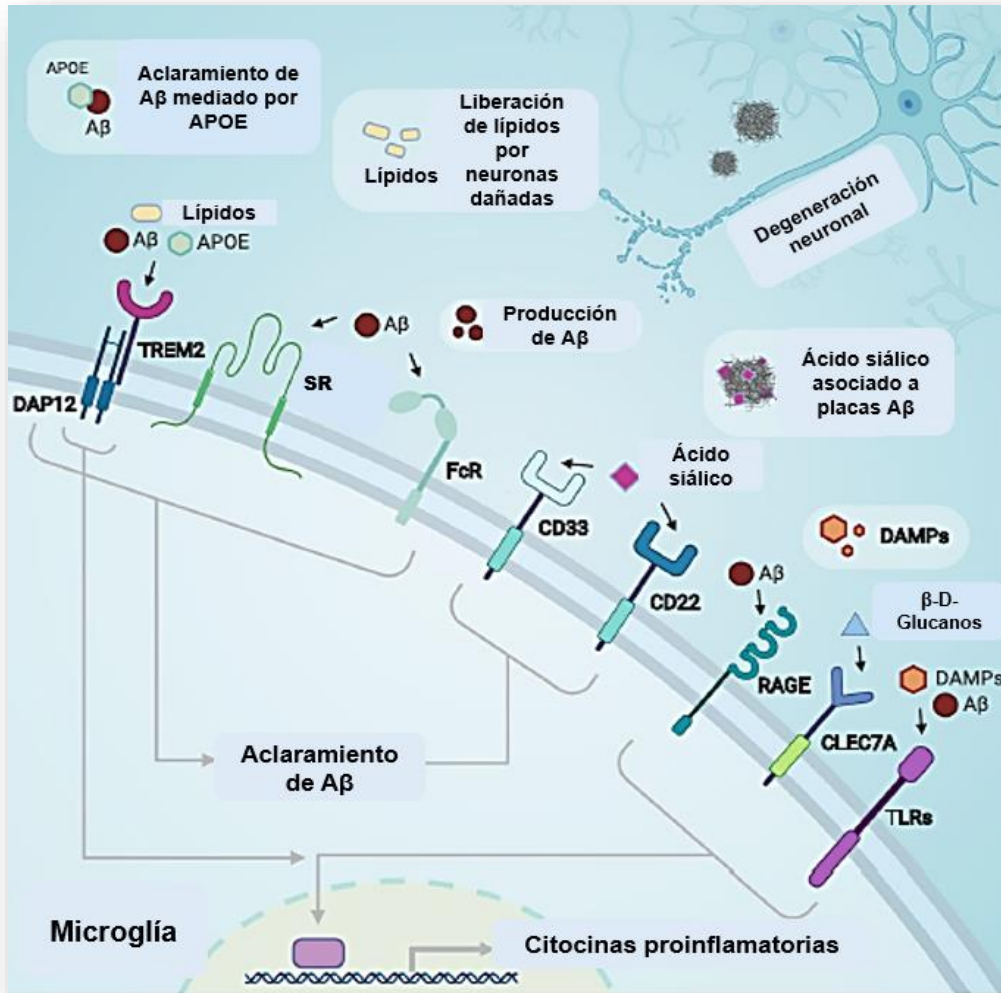
**Figura 6. Cambios patológicos de las células gliales.** Las células activadas pierden sus funciones homeostáticas, reducen la secreción de factores tróficos y producen mayores cantidades de citoquinas y quimiocinas pro-inflamatorias, lo que puede conducir al daño neuronal. Modificado de Leng & Edison, 2021.

### 2.1.1 Respuesta microglial a las especies $\beta$ -amiloides en la EA.

A pesar de su rápida respuesta protectora contra las alteraciones en la homeostasis cerebral, la microglía también se ha relacionado con diversas enfermedades neurodegenerativas (Davis et al., 2017). En el SNC maduro sano, la microglía existe en un estado de “reposo” que, en respuesta a estímulos inflamatorios persistentes que implican un peligro potencial, puede cambiar a un estado de “activación”. En este proceso, la microglía experimenta múltiples etapas que incluyen cambios en su morfología, expresión molecular y comportamiento funcional (Town et al., 2005; Kettenmann et al., 2011; Saijo & Glass, 2011). Fenotípicamente, la complejidad de

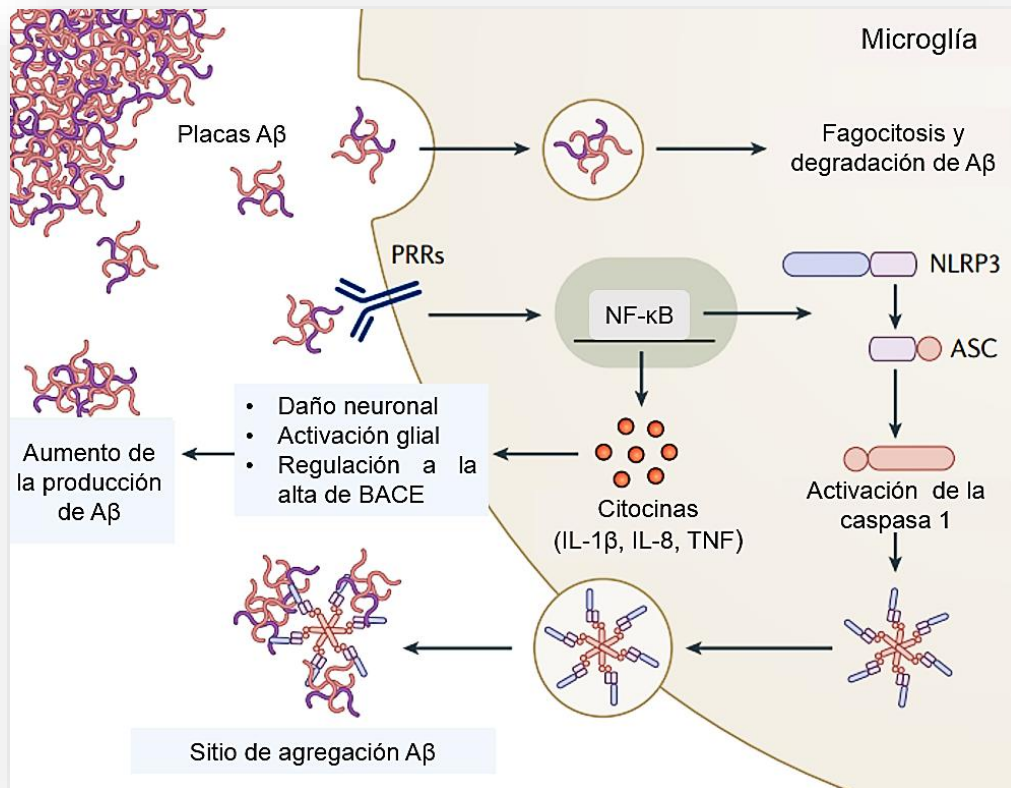
los procesos de la célula se reducen y el soma aumenta de tamaño, adoptando una morfología “ameboide”. Además de activar su función fagocítica, esta microglía reactiva adquiere la capacidad para migrar a los sitios de lesión mediante gradientes quimiotácticos y aumenta su densidad local por proliferación. Estas respuestas van acompañadas por alteraciones en la regulación transcripcional de citocinas y quimiocinas, principalmente interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), CCL2, CCR3 y CCR5, así como por la liberación de factores neurotóxicos como las especies reactivas del oxígeno (ROS) y óxido nítrico (NO; Van Eldik et al., 2007; Kettenmann et al., 2011; Doens & Fernández, 2014; Heneka et al., 2015; Ledo et al., 2020).

La eliminación de las diversas especies de  $\beta$ A, implica la activación de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), que pueden desencadenar vías moleculares involucradas en la producción de moléculas inflamatorias (Fig. 7). Uno de los PRRs más estudiado en la EA es el receptor TREM2, que en conjunto con la proteína adaptadora DAP12, se encargan de limitar la acumulación de  $\beta$ A y otras formas dañinas en la EA, promover la compactación de las placas y modular la producción de citocinas (Bachiller et al., 2018; Ennerfelt & Lukens, 2020). No obstante, se ha encontrado que las variantes raras Arg47 e His62 del gen TREM2, muestran una reducción en la capacidad de la microglía para responder a varios factores de estrés metabólico. Ambas variantes son consideradas factores de riesgo para la EA (Schwabe et al., 2020). Los receptores tipo Toll (TLRs) de superficie celular, TLR2 y TLR4 promueven el aclaramiento fagocítico de las formas oligoméricas y fibrilares del  $\beta$ A (Falsig et al., 2008). El receptor RAGE puede activar la vía de señalización de NF $\kappa$ B e inducir a una mayor producción de citocinas proinflamatorias (Solito & Sastre, 2012; Ennerfelt & Lukens, 2020). En cuanto a los receptores scavenger de clase A (SR-A1), se ha encontrado que median la captación de  $\beta$ A fibrilar y su deficiencia puede conducir a una disminución del 50% de la actividad fagocítica del  $\beta$ A (Cornejo et al., 2018; Chiarini et al., 2020). Asimismo, el receptor scavenger SR-B2 (CD36), forma un complejo con TLR4 y TLR6 que también favorece la producción de citocinas, quimiocinas y ROS (Hickman et al., 2018).



**Figura 7. Receptores microgliales que coordinan las respuestas inmunitarias innatas en la EA.** TREM2 reconoce el  $\beta$ A, los lípidos liberados por las neuronas dañadas y APOE en la EA. La fagocitosis del  $\beta$ A por microglía es mediada por los receptores TREM2, TLRs, SR y FcR. Por el contrario, CD33 y CD22 se unen al ácido siálico asociado a las placas  $\beta$ A e inhiben la señalización de eventos necesarios para el aclaramiento de  $\beta$ A. Además, RAGE, Clec7a y TLR modulan la producción de citocinas en la respuesta al  $\beta$ A y DAMPs asociados a la EA. Ennerfelt & Lukens, 2020

Aunque el  $\beta$ A podría contribuir a la activación microglial, se ha sugerido que la microglía puede promover la siembra de placas amiloides mediante la activación del inflammasoma NLRP3, donde la proteína adaptadora ASC (apoptosis-associated speck-like protein) puede liberar partículas de la microglía que actúan como sitios de unión para  $\beta$ A, lo que podría aumentar rápidamente la formación de oligómeros y agregados amiloides (Fig. 8; Venegas et al., 2017; Leng & Edison, 2021).



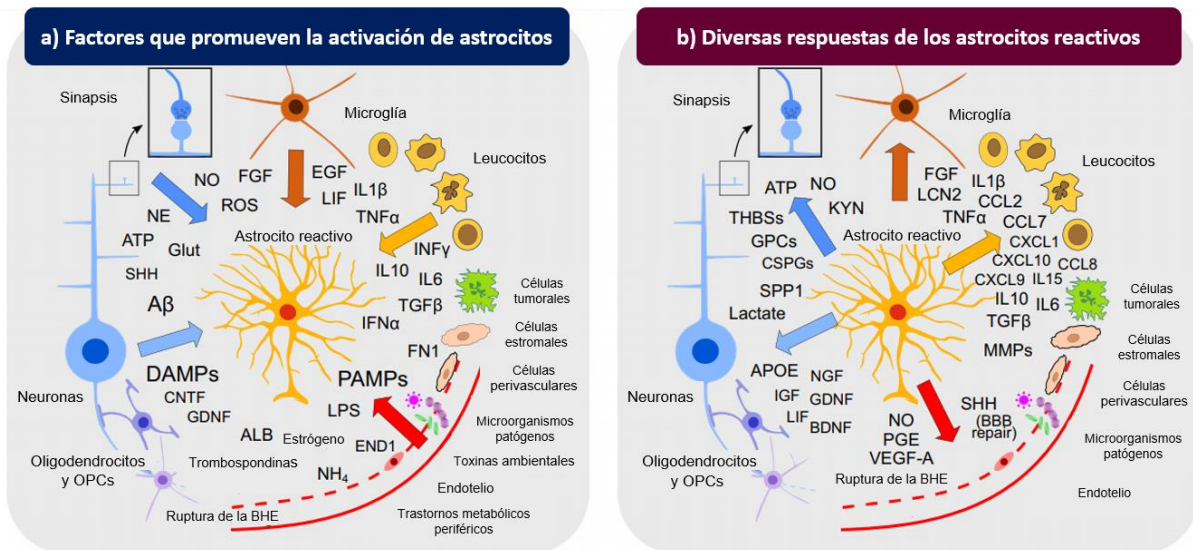
**Figura 8. Respuesta microglial a las especies βA.** Las especies del βA pueden ser reconocidas por una variedad de PRRs microgliales, que activan vías fagocíticas o inflamatorias. La activación de la vía del factor nuclear κB (NFκB) conduce a la expresión de citocinas proinflamatorias y al ensamblaje del inflamasoma NLRP3. Este complejo proteico puede liberar la proteína ASC (apoptosis-associated speck-like protein) que contiene un dominio de reclutamiento de caspasa C-terminal, el cual podría servir como un sitio de unión para la agregación del βA. Mientras que, la liberación de citocinas proinflamatorias puede promover una mayor activación glial, daño neuronal y regulación a la alza de β-secretasa. Modificado de Leng & Edison, 2021.

### 2.1.2 Respuesta de astrocitos en la EA.

La activación de astrocitos o astrogliosis reactiva (Fig. 9), es una respuesta evolutivamente antigua necesaria para el mantenimiento de la homeostasis cerebral y la preservación de las funciones neurológicas ante una amplia gama de agresiones en el SNC, incluídos los traumatismos agudos, infecciones, accidentes cerebrovasculares, desórdenes metabólicos, tumores y enfermedades neurodegenerativas (Sofroniew, 2020). No obstante, los astrocitos reactivos



pueden sufrir una serie de cambios en la expresión génica, hipertrofia celular y en casos más graves, la formación de cicatrices. Estas alteraciones tienen el potencial de inducir la pérdida de funciones esenciales y la ganancia de funciones anormales, lo que puede repercutir tanto de manera benéfica como perjudicial en las células neuronales y no neuronales circundantes.



**Figura 9. Activación de astrocitos en mamíferos.** a) La reactividad de los astrocitos es inducida por una amplia variedad de señales moleculares derivadas de neuronas, células estromales, células tumorales, otras glías, microorganismos patógenos, toxinas ambientales y moléculas secretadas por células periféricas. b) Las respuestas desencadenadas por astrocitos reactivos pueden influir en células neuronales y no neuronales circundantes. Modificado de Sofroniew, 2020.

En la EA, los astrocitos participan en la eliminación de  $\beta$ A a través de múltiples mecanismos que incluyen, la producción de neprilisina (NEP) y las enzimas convertidoras de endotelina 1 y 2 (ECE 1 y ECE2), capaces de fragmentar  $\beta$ A a partir de diferentes sitios de escisión; la secreción de metaloproteinasas de matriz, MMP-2 y MMP-9, implicadas en la degradación extracelular de las formas monoméricas y fibrilares del  $\beta$ A (Eckman et al., 2003); así como el transporte de  $\beta$ A unido a las proteínas ApoE y  $\alpha$ 2-macroglobulina ( $\alpha$ 2-M), a través de la BHE. Además, los astrocitos también pueden internalizar las formas oligoméricas de  $\beta$ A mediante fagocitosis y endocitosis mediada por receptores (Deane et al., 2009; Morris et al., 2014; Ries & Sastre, 2016).

A pesar de que los astrocitos juegan un papel importante en la reducción de la carga de  $\beta$ A, cuando las placas amiloides acumuladas alcanzan cierto umbral se pueden ver afectadas las funciones de los astrocitos y desencadenar diversos eventos que contribuyen a la patología de la EA (Kraft et al., 2013; Batarseh et al., 2016). Los efectos perjudiciales incluyen principalmente: (1) Alteraciones en la absorción y el metabolismo del  $\beta$ A (Rowland et al., 2018), (2) Exacerbación de la inflamación a través del aumento en la producción de citocinas y quimiocinas, (3) Producción de niveles neurotóxicos de ROS, (4) Reducción del aclaramiento de glutamato, (5) Alteraciones en la homeostasis del calcio, (6) Producción de VEGF, que puede afectar la función de la BHE y (7) Plasticidad sináptica alterada (Sofroniew & Vinters, 2010; Li et al., 2020). Adicionalmente, en modelos para otros trastornos como la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), se ha encontrado que los astrocitos reactivos experimentan alteraciones en el transporte de lactato y en la expresión de GLT-1 (Ferraiuolo et al., 2011). En isquemia y lesiones de la médula espinal, los astrocitos pueden regular positivamente acuaporina 4 (AQP4) y favorecer el edema citotóxico (Huang et al., 2019). Finalmente, los astrocitos reactivos también se han relacionado con la inducción y el mantenimiento del dolor crónico (Li T. et al., 2019).

## **2.2 Modelo de la ratón triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer (3xTgAD).**

Los modelos animales se han convertido en una herramienta esencial para comprender los mecanismos subyacentes de la patogénesis de la EA, su objetivo es reproducir algunos de los síntomas y lesiones que ocurren durante la enfermedad con la mayor precisión posible (Esquerda-Canals et al., 2017). Actualmente, los modelos animales que se utilizan en los estudios preclínicos son: i) Modelos transgénicos de EA, que sobreexpresan proteínas APP, PS y/o Tau con mutaciones relacionadas con la enfermedad familiar o temprana; y ii) Modelos no transgénicos, que implican animales a quienes les inyectan  $\beta$ A o Tau en el cerebro y los modelos de envejecimiento (Puzzo et al., 2015).

El modelo de ratón triple transgénico 3xTgAD, fue creado mediante la microinyección de dos transgenes independientes que codifican APP<sub>swe</sub> y tau<sub>P301L</sub>

humanas, en embriones unicelulares recolectados de ratones Knockin PS1<sub>M146V</sub> homocigóticos mutantes, que posteriormente se reimplantaron en madres adoptivas, dando lugar a ratones con el mismo fondo genético. Estos ratones recapitulan aspectos específicos de la EA: la inflamación dependiente de la edad, el desarrollo de depósitos extracelulares de  $\beta$ A, antes de la formación de NFTs y deterioro cognitivo (Oddo S. et al, 2003; Belfiore R. et al, 2018).

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Actualmente, no se ha logrado dilucidar por completo el papel que juega la activación glial en la EA. A pesar de que el modelo 3xTgAD recapitula la patología neuroinflamatoria y ha sido ampliamente utilizado, ha generado controversia por el hallazgo de sublíneas que sugieren edades de inicio y progresión distintas. Por ello, en este trabajo vamos a caracterizar la progresión de la neuroinflamación a partir de los cambios morfológicos de microglía y astrocitos, así como los cambios en la expresión de los marcadores IBA1 y GFAP, antes y después de la aparición de las placas amiloides. Con el objetivo de establecer datos más precisos acerca de la activación glial en este modelo murino y que, podrían tener un impacto significativo en el diseño de nuevos estudios en nuestro laboratorio.

### **4. HIPÓTESIS.**

La respuesta inflamatoria de la microglía y astrocitos se incrementará en función de la edad y el aumento de los depósitos amiloides en el modelo 3xTgAD. Esto conducirá a una mayor cantidad de células con cambios morfológicos y que presentarán niveles más altos en la expresión de las proteínas IBA1 y GFAP.

### **5. OBJETIVOS.**

- Estudiar la activación microglial en tejido cerebral de ratones 3xTgAD hembras y machos, en función de la edad y la región cerebral, a través de la expresión de la proteína IBA1.

- Estudiar la activación de los astrocitos en tejido cerebral de ratones 3xTgAD hembras y machos, en función de la edad y la región cerebral, mediante la expresión de la proteína GFAP.
- Determinar si existen diferencias en la respuesta microglial, con respecto al sexo en ratones 3xTgAD.
- Determinar si existen diferencias en la respuesta de astrocitos relacionadas con el sexo en ratones 3xTgAD.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **1| Animales.**

En este trabajo se utilizaron ratones 3xTgAD, generados en un fondo híbrido de C57BL6/129SvJ (Oddo S. et al, 2003), y controles B6129SF2/J adquiridos de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Los ratones se alojaron en jaulas con un máximo de 6 animales, en condiciones de luz/oscuridad de 12 h y con acceso a alimentos y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### **2| Inmunofluorescencia.**

Los hemisferios cerebrales fueron obtenidos después de la perfusión ventricular con PBS frío en los ratones profundamente anestesiados con Sevofluorano (Abbot), en seguida se fijaron en una solución de paraformaldehído (PFA) al 4 % en PBS (pH 7.4) a 4 °C por 24 h. A continuación, se deshidrataron durante tres días consecutivos en soluciones de 10, 20 y 30 % de sacarosa a 4°C respectivamente. Una vez deshidratados, los cerebros se colocaron en Tissue-tek (Sakura Finetek, USA) y se cortaron en congelación para obtener secciones de 30µm de espesor utilizando un criostato (Kedee, KD2850). Los cortes que se usaron correspondieron a la posición desde -1.6mm a -2.3 de bregma. Para iniciar la tinción, cada corte se lavó dos veces con Tris-buffer salino (TBS; Tris-base 50mM/NaCl150mM), durante 5 min a temperatura ambiente y recibió un pretratamiento para la recuperación de epítomos,

en el que los tejidos se incubaron por 30 minutos a 70 °C con buffer de citrato de sodio 10 mM (pH 6.0)/Tween 20 0.05 %. Posteriormente, cada corte se lavó dos veces con TBS durante 5 min a temperatura ambiente, seguido de la permeabilización por 15 minutos con TBS-tritón (Tritón X-100 0.01 %), y por último, el bloqueo de sitios inespecíficos durante 30 minutos con TBS-tritón-BSA (Tritón X-100 0.01 % / Albúmina Sérica Bovina 2 %). Los tejidos se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario correspondiente a la población celular de interés (Tabla 1) usando como diluyente de anticuerpos TBS-Tritón-Suero Normal de Cabra 5 %. Al siguiente día, los tejidos se sometieron de nuevo a lavados consecutivos con TBS, TBS-tritón y TBS-tritón-BSA durante 5 minutos cada uno. Finalmente, se incubaron los tejidos durante 1h con los anticuerpos secundarios correspondientes (Tabla 2) usando el mismo diluyente que en los anticuerpos primarios. Después de la incubación se retiraron los anticuerpos secundarios y se realizaron lavados consecutivos con TBS, TBS-tritón y TBS-tritón-BSA durante 5 minutos cada uno. Los tejidos se colocaron en un portaobjetos con medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector Labs, Burlingame).

**Tabla 1. Anticuerpos primarios.**

	<b>Anticuerpo</b>	<b>Dilución</b>	<b>Origen biológico</b>	<b>Fabricante</b>
<b>Microglía</b>	Anti-IBA1	1:1000	Conejo	Wako Pure Chemical Industries, Japan
<b>Astroцитos</b>	Anti-GFAP	1:500	Ratón	Invitrogen, USA

**Tabla 2. Anticuerpos secundarios.**

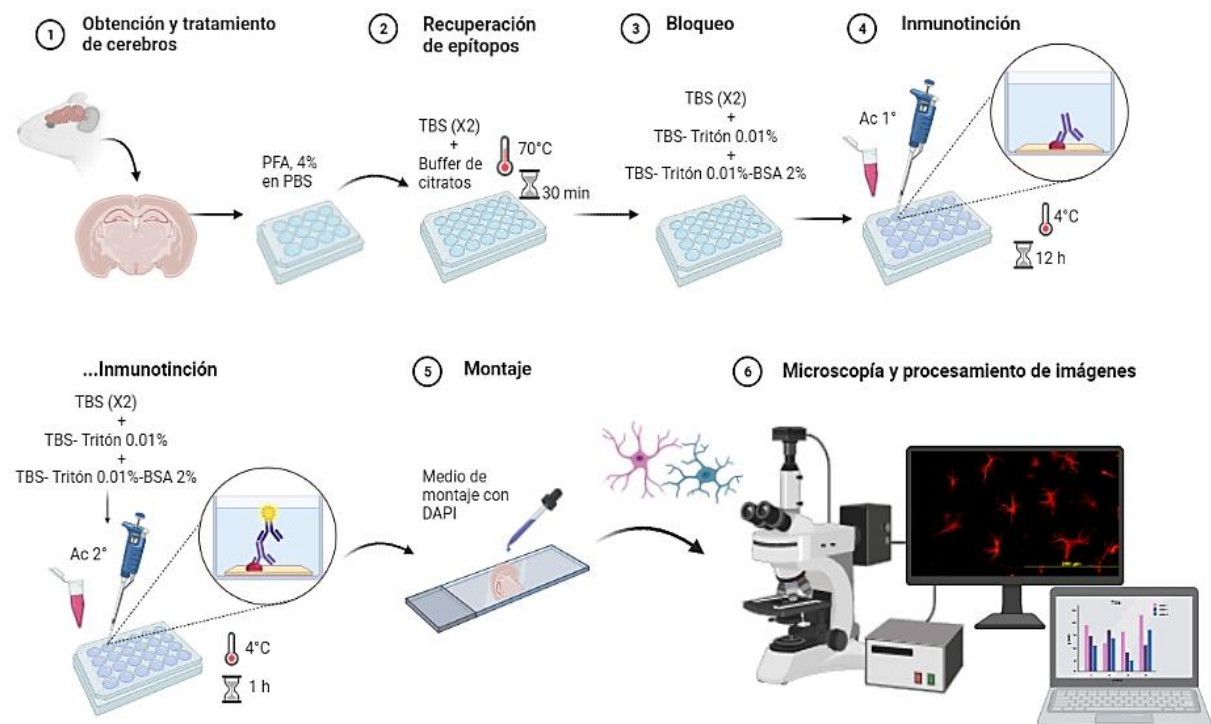
	<b>Anticuerpo</b>	<b>Dilución</b>	<b>Origen biológico</b>	<b>Fabricante</b>
<b>Microglía</b>	Anti-IgG (H+L) de conejo acoplado a Alexa fluor 594	1:1500	Cabra	Invitrogen, USA
<b>Astroцитos</b>	Anti-IgG (H+L) de ratón acoplado a Alexa fluor 594	1:1000	Cabra	Invitrogen, USA

### 3| Intensidad de fluorescencia.

Las imágenes se obtuvieron con un microscopio de epifluorescencia Olympus Ix51 (Nikon Instruments Inc., USA) equipado con una cámara DP71 (Olympus), y se cuantificaron con el programa de procesamiento de imagen digital, ImageJ (Broken Symmetry Software). Para evaluar la activación de microglía y astrocitos, se determinó la densidad integrada (IntDen) de fluorescencia, que proporciona el valor del área de todas las regiones fluorescentes y la intensidad promedio de fluorescencia de cada Región de Interés (ROI).

### 4| Análisis Estadístico.

Los datos obtenidos se analizaron mediante ANOVA de una y dos vías, con las pruebas post hoc de Tukey y Šidák, cuando fue apropiado (Software GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.). Las diferencias se consideran significativas a partir de  $p < 0.05$ . Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  la desviación estándar (SD).



**Figura 10. Esquema de detección de IBA1 y GFAP.** Se muestra el proceso para la identificación de microglía y astrocitos en ratones 3xTgAD y B6129SF2/J. Los tejidos fijados con PFA al 4 % recibieron un pretratamiento para desenmascarar los epítomos, utilizando una fuente de calor y buffer de citratos. Posteriormente, se llevó a cabo la reacción Ag-Ac mediante el método de inmunofluorescencia indirecta. Las micrografías se cuantificaron con ImageJ y se analizaron con Graphpad. Creado con BioRender (2022).

## 7. RESULTADOS.

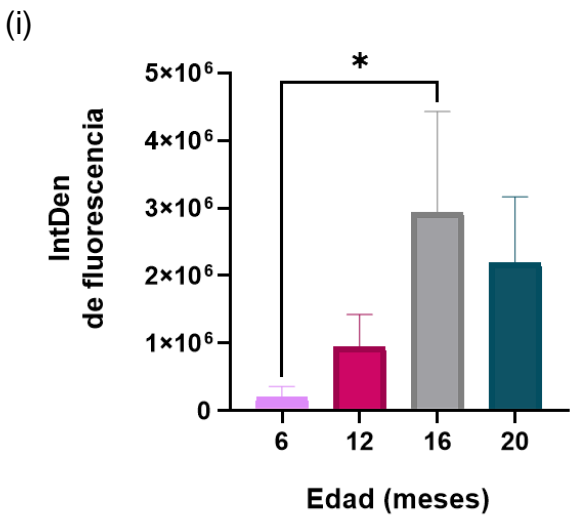
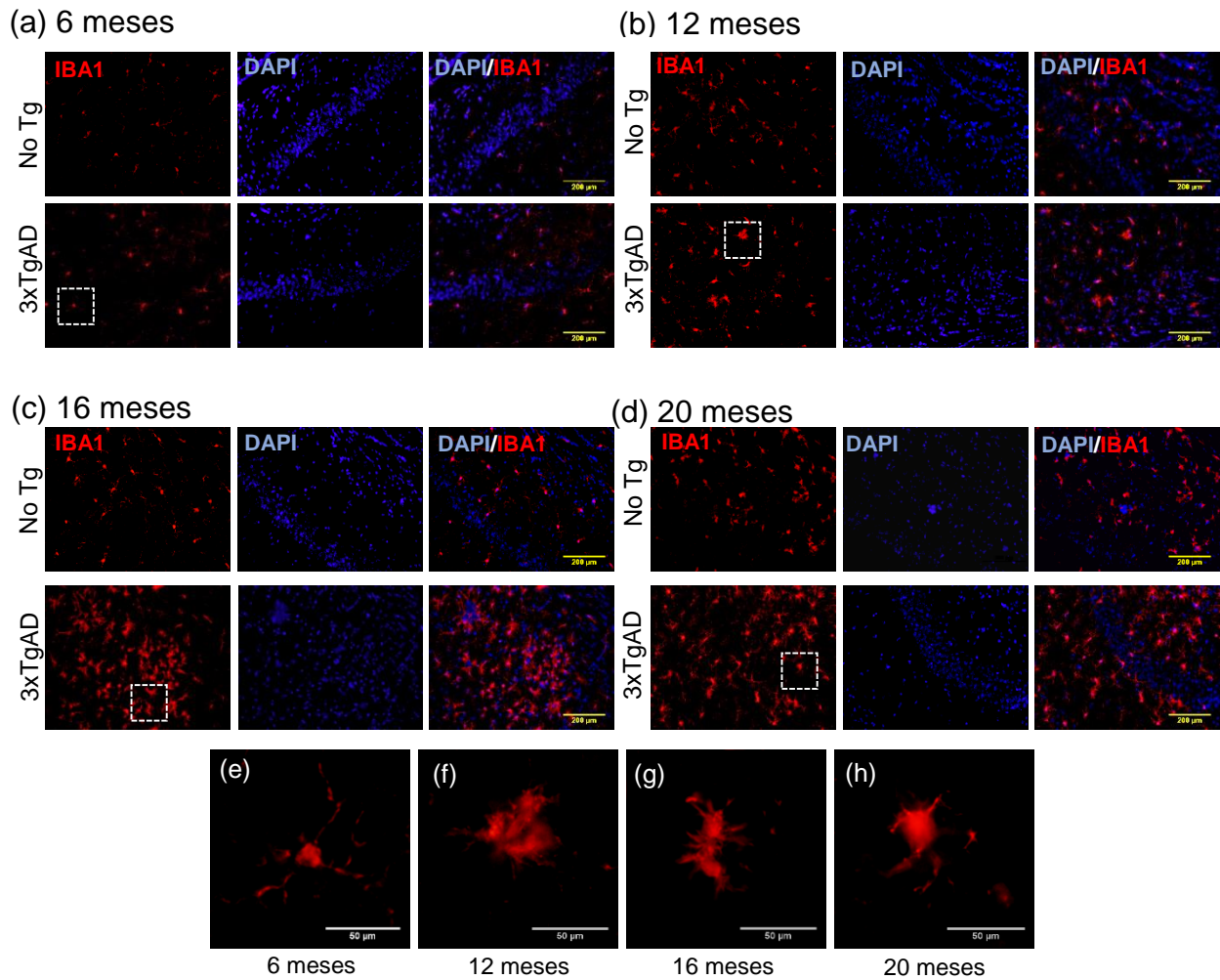
### 7.1 Activación Microglial dependiente de la edad en ratones 3xTgAD.

Para evaluar la progresión de la activación microglial, se realizaron inmunotinciones utilizando un anticuerpo anti-IBA1 y se seleccionaron las regiones de subículo, CA1 y corteza de ratones 3xTgAD a los 6, 12, 16 y 20 meses de edad. Se sabe que existe un aumento en la expresión de IBA1 durante la activación microglial. Además, las regiones seleccionadas están asociadas con una mayor cantidad de agregados  $\beta$ A en este modelo. Por cada región y edad se tomaron tres micrografías de ratones 3xTgAD distintos ( $n= 3$  / grupo de edad), y en cada una de las micrografías se cuantificó la IntDen de fluorescencia de IBA1 mediante el programa ImageJ. Finalmente, a partir de los datos obtenidos, se realizó una comparación entre hembras y machos para evaluar las diferencias de la activación microglial con respecto al sexo. Los controles (No Tg), no fueron cuantificados y solo se utilizó una micrografía por edad para el análisis cualitativo.

#### 7.1.1 Hipocampo (subículo): hembras.

Se realizó una comparación cualitativa entre microglía de ratones hembra 3xTgAD y No Tg. En ella se encontró que, en estos modelos la inmunoreactividad de IBA1 a los 6 meses es similar, mientras que, de 12 a 20 meses se observa un aumento progresivo, en mayor medida en el modelo 3xTgAD (**Fig. 11a-d**). A continuación, se tomaron micrografías representativas de las principales alteraciones morfológicas que ocurren en las células de la microglía de ratones hembra 3xTgAD. En la microglía de animales de 6 meses, se conserva el soma redondo y las prolongaciones finas, características de la microglía en condiciones fisiológicas normales. A los 12 meses se hallaron las primeras células con un fenotipo anormal, en las que se puede observar un incremento considerable en el tamaño del soma y el grosor de las prolongaciones, cambios asociados con la microglía activada. No obstante, la mayoría de las células de la microglía no presentaron cambios y, solo hasta los 16 meses se detectaron alteraciones en todas las células (**Fig. 11e-h**). El análisis cuantitativo de las imágenes de microglía de ratones 3xTgAD demostró que la inmunoreactividad de IBA1 es significativamente más alta a los 16 meses

comparada con 6 meses ( $p= 0.0282$ ). No se encontraron diferencias significativas entre el resto de las edades (**Fig. 11i**).



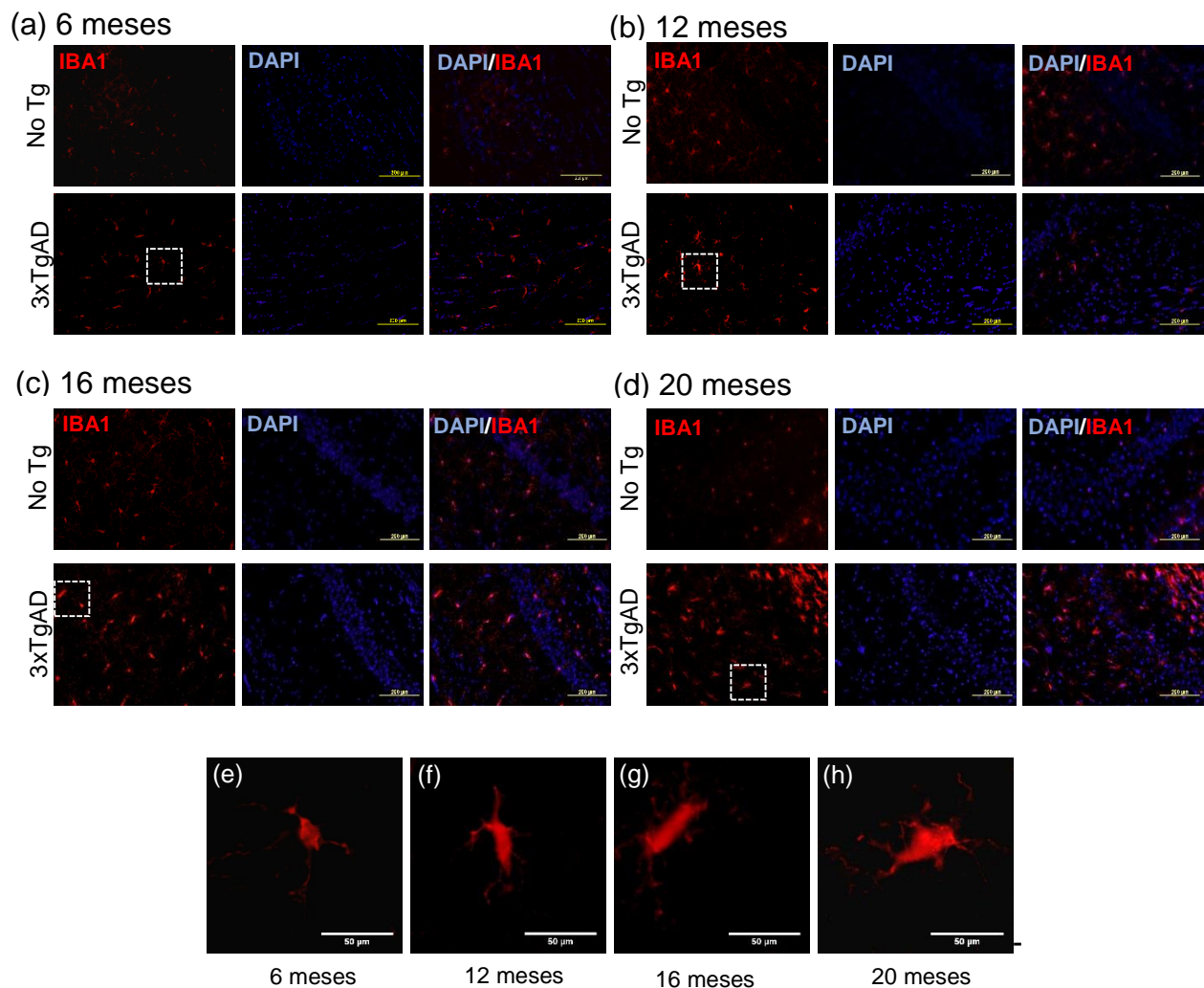
**Figura 11. Activación microglial dependiente de la edad en la región de subículo de ratones hembra.**

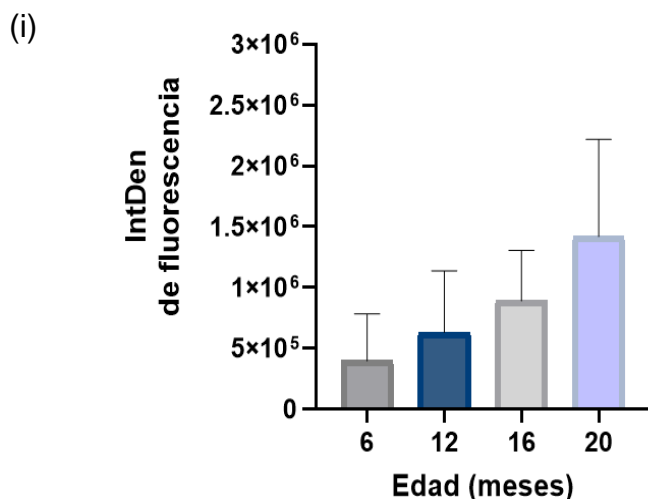
**(a-d)** Micrografías representativas de cerebros de ratones 3xTgAD y No Tg, marcadas con anti-IBA1 (20x). **(e-h)** Cambios morfológicos de microglía en ratones 3xTgAD, en los que se observa un fenotipo anormal a los 12, 16 y 20 meses. Escala: 50 $\mu$ m. **(i)** Análisis cuantitativo de la activación microglial, reportada como la IntDen de fluorescencia de IBA1 en el modelo 3xTgAD ( $n=3$  / grupo de edad). Evaluación estadística: ANOVA de una vía y post hoc de Tukey,  $*p<0.05$ . Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  SD (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).



### 7.1.2 Hipocampo (subículo): machos.

En la comparación cualitativa de microglía en ratones macho 3xTgAD y No Tg, se observó que la inmunoreactividad de IBA1 a los 6, 12 y 16 meses es similar, y solo se muestran diferencias a los 20 meses (**Fig. 12a-d**). Sin embargo, al analizar las células de manera individual, se encontró un fenotipo activado desde los 12 hasta los 20 meses en modelo 3xTgAD (**Fig. 12e-h**). En la cuantificación de la activación microglial, hallamos un aumento progresivo en la IntDen de fluorescencia, pero no se encontraron diferencias significativas entre edades (**Fig. 12i**).

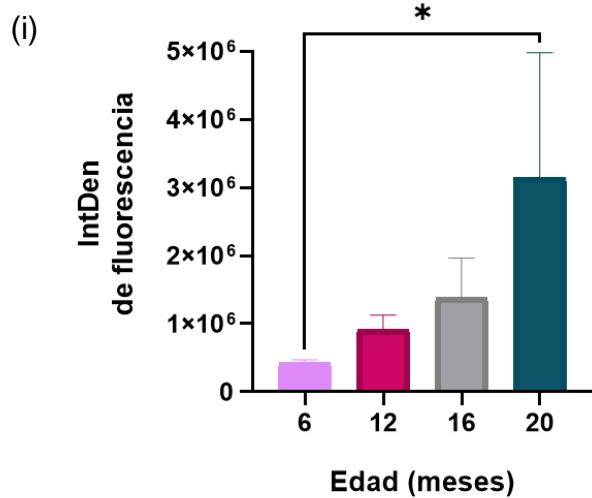
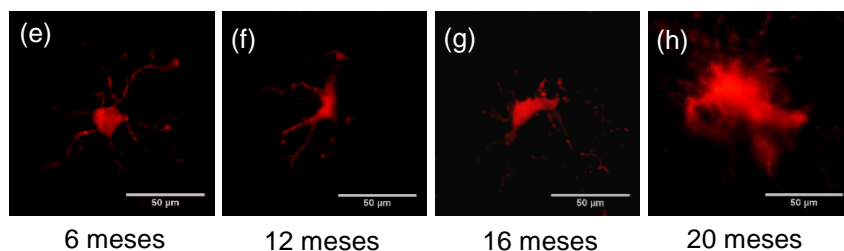
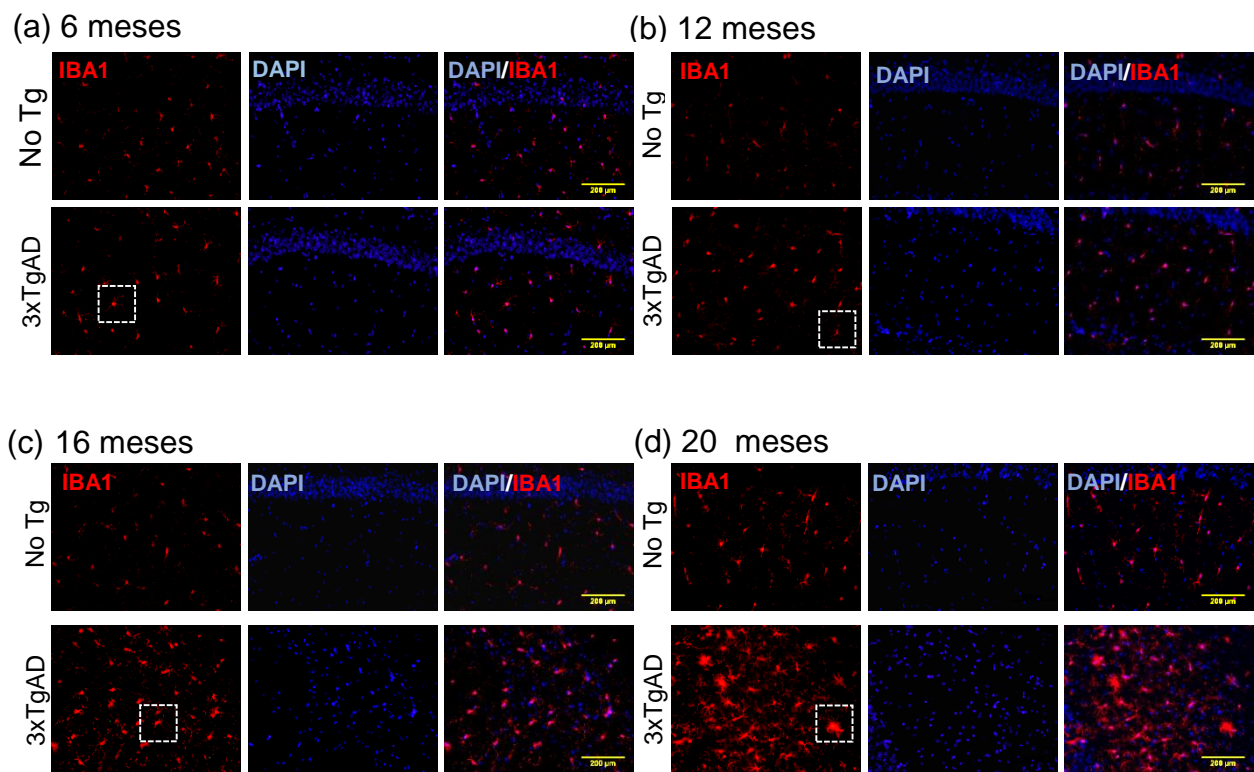




**Figura 12. Activación microglial dependiente de la edad en la región de subículo de ratones macho. (a-d)** Micrografías representativas de cerebros de ratones 3xTgAD y No Tg, marcadas con anti-IBA1 (20x). **(e-h)** Cambios morfológicos de microglía en ratones 3xTgAD, se observa microglía activada desde los 12 meses. Escala: 50µm. **(i)** Análisis cuantitativo de la IntDen de fluorescencia de IBA1 en ratones 3xTgAD (n=3 / grupo de edad). La gráfica muestra un incremento progresivo de la activación microglial, sin diferencias significativas. Evaluación estadística: ANOVA de una vía y post hoc de Tukey, \*p<0.05. Los resultados se muestran como el promedio ± SD (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.)

### 7.1.3 Hipocampo (CA1): hembras.

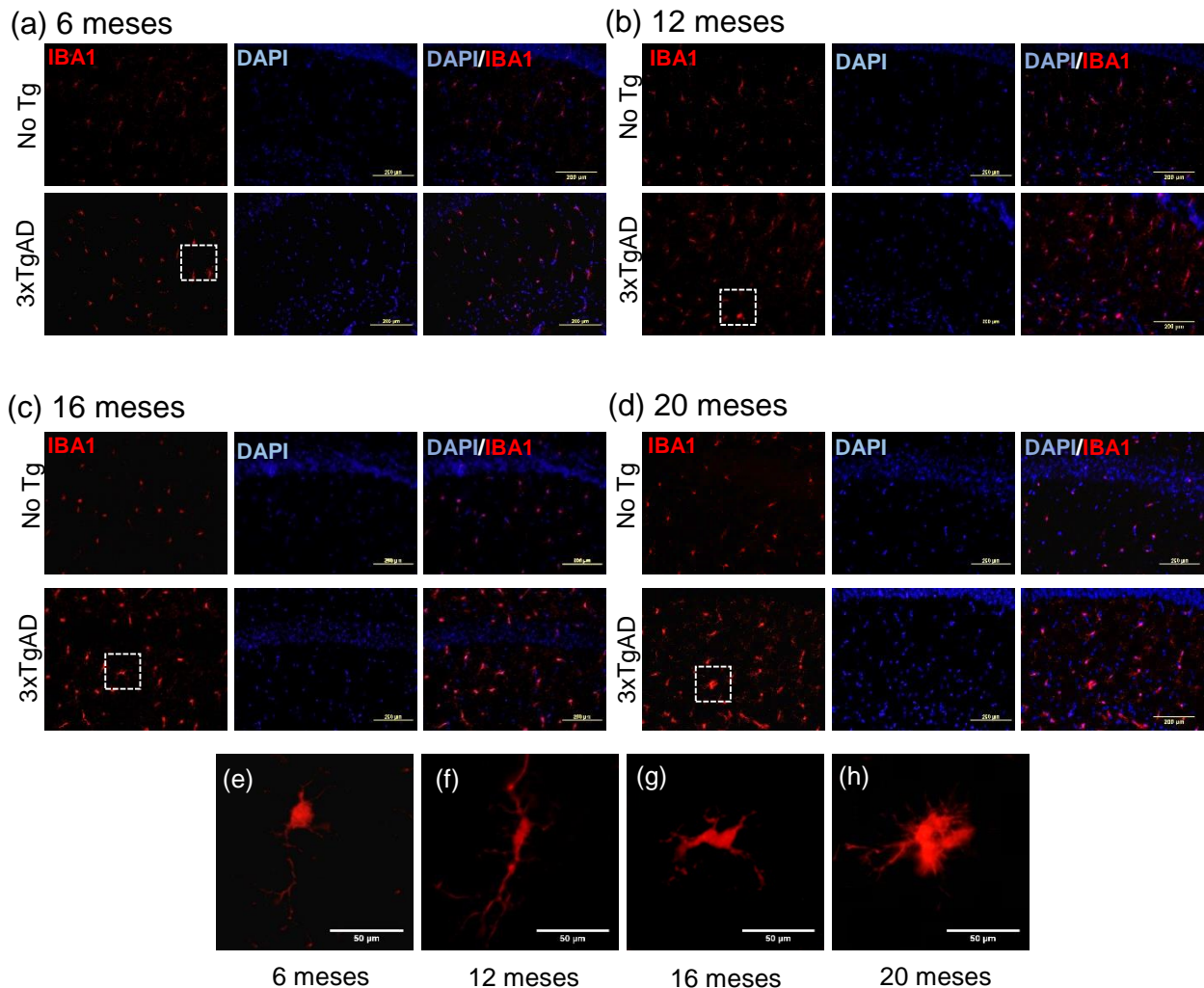
La comparación cualitativa en la región CA1 (**Fig. 13a-d**) sugiere que no existen diferencias en la inmunoreactividad de IBA1 entre microglía de ratones 3xTgAD y No Tg a los 6 y 12 meses de edad, pero sí se observan cambios a los 16 y 20 meses. En cuanto a la morfología, se encontró que la microglía de ratones 3xTgAD a los 6 meses no presenta alteraciones, a los 12 y 16 meses los somas han perdido su estructura. Mientras que, a los 20 meses se observa microglía con cambios importantes tanto en su estructura como en su tamaño (**Fig. 13e**). En la cuantificación de la expresión de IBA1, la prueba post hoc indicó que la IntDen de fluorescencia a los 20 meses fue significativamente mayor que a los 6 meses ( $p = 0.0362$ ). No se encontraron diferencias significativas en el resto de las edades (**Fig. 13i**).

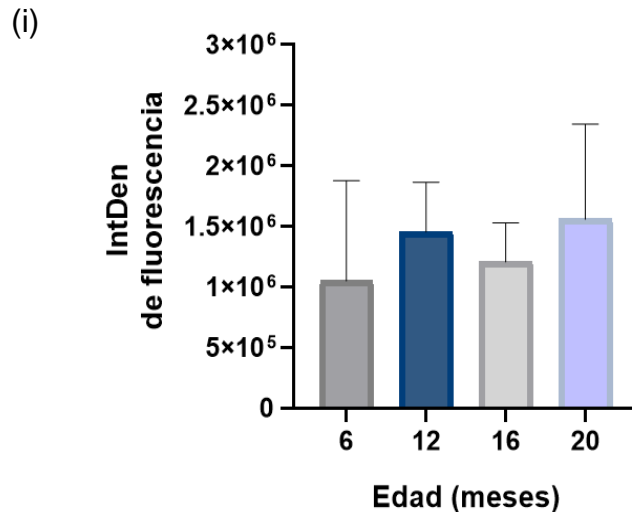


**Figura 13. Activación microglial dependiente de la edad en la región de CA1 de ratones hembra.** (a-d) Micrografías de cerebros de ratones 3xTgAD y No Tg, marcadas con anti-IBA1 (20x). (e-h) Cambios morfológicos en microglía del modelo 3xTgAD, las primeras alteraciones se observan a partir de los 12 meses. Escala: 50μm. (i) Análisis cuantitativo en el que se encontró un aumento progresivo de la IntDen de fluorescencia de IBA1 en cerebros de ratones 3xTgAD (n=3/ grupo de edad). Evaluación estadística: ANOVA unidireccional y post hoc de Tukey, \*p<0.05. Los resultados se muestran como el promedio ± SD (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.)

### 7.1.4 Hipocampo (CA1): Machos.

La evaluación cualitativa de las micrografías en la región CA1 de ratones macho (**Fig. 14a-d**), sugiere que no existen diferencias en la inmunoreactividad de IBA1 entre microglía de ratones 3xTgAD y No Tg a los 6 meses, pero sí se observan diferencias a los 12, 16 y 20 meses de edad. En la evaluación de la morfología observamos que la microglía de ratones 3xTgAD a los 6 meses no presenta alteraciones, y a partir de los 12 meses se observan cambios progresivos, como la pérdida de la redondez del soma microglial y el aumento de tamaño (**Fig. 14e-h**). En el análisis cuantitativo, la prueba post hoc indicó que no existen diferencias significativas en la IntDen de fluorescencia de IBA1 (**Fig. 14i**).



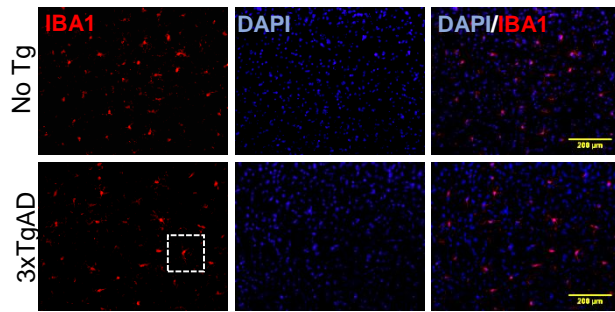


**Figura 14. Activación microglial dependiente de la edad en la región de CA1 de ratones macho.** (a-d) Micrografías de cerebros de ratones 3xTgAD y No Tg, marcadas con anti-IBA1 (20x). (e-h) Cambios morfológicos en microglía del modelo 3xTgAD, se observa microglía activada desde los 12 meses. Escala: 50 $\mu$ m. (i) Análisis cuantitativo de la IntDen de fluorescencia de IBA1 en cerebros de ratones 3xTgAD (n=3 / grupo de edad). Sin diferencias significativas. Evaluación estadística: ANOVA unidireccional y post hoc de Tukey, \*p<0.05. Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  SD (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.)

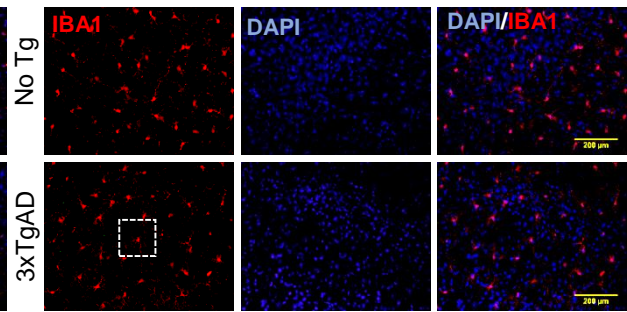
### 7.1.5 Corteza: hembras.

A los 6 y 12 meses de edad no se observan diferencias entre microglía de ratones 3xTgAD y No Tg. Mientras que, a los 16 y 20 meses se vuelve notoria una mayor inmunoreactividad de IBA1 en los ratones transgénicos (**Fig. 15 a-d**). Tampoco se encontraron alteraciones morfológicas en las microglías de 6 y 12 meses (**Fig. 15 e-f**). En 16 y 20 meses, detectamos microglía activada evidente por el aumento en el tamaño del soma y cambios considerables en la morfología microglial (**Fig. 15 g-h**). El análisis cuantitativo de microglía en la región de corteza demostró que la inmunoreactividad de IBA1 es significativamente más alta a los 20 meses comparada con 6 meses ( $p = 0.0278$ ), pero no existen diferencias significativas entre el resto de las edades (**Fig. 15i**).

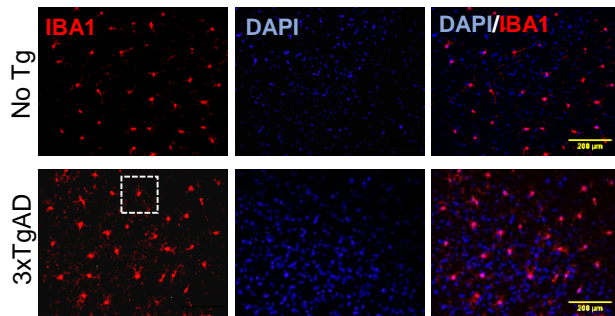
(a) 6 meses



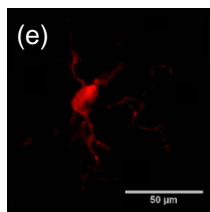
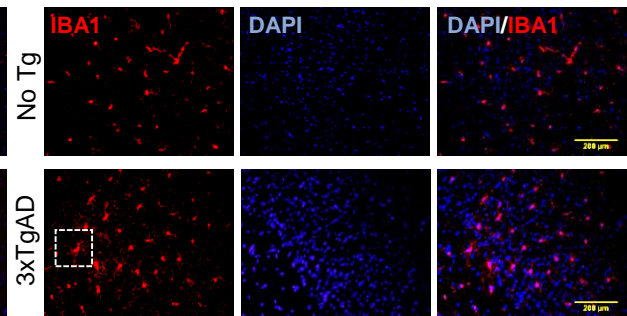
(q) 12 meses



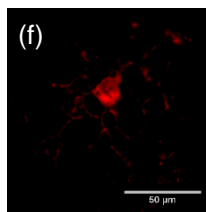
(c) 16 meses



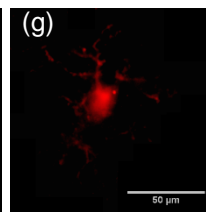
(d) 20 meses



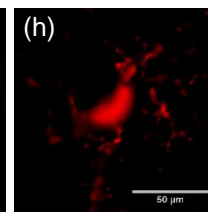
6 meses



12 meses

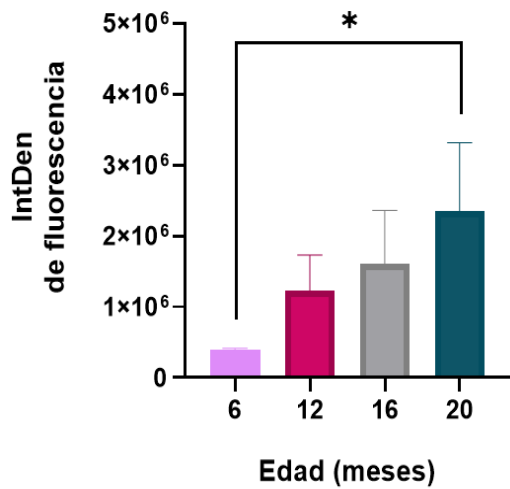


16 meses



20 meses

(i)

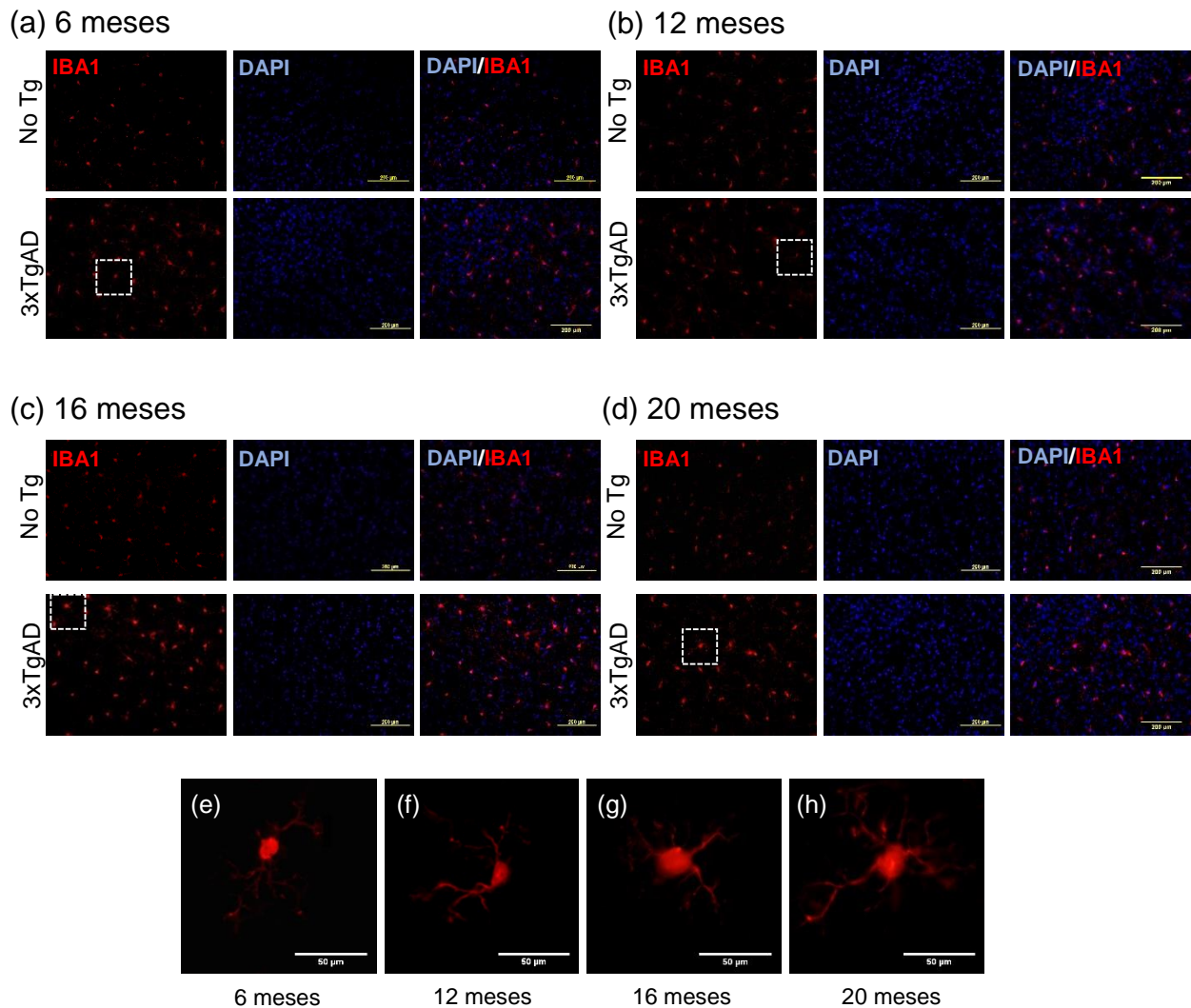


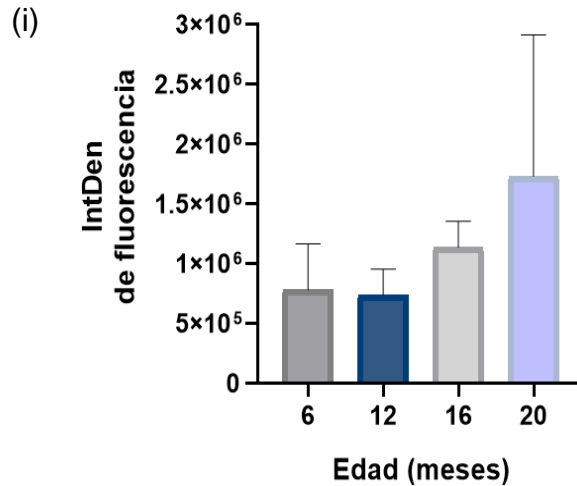
**Figura 15. Activación microglial dependiente de la edad en corteza de ratones hembra.**

(a-d) Micrografías de ratones 3xTgAD y no transgénicos, marcadas con anti-IBA1 (20x). (e-h) Cambios morfológicos generados entre microglías de corteza en el modelo 3xTgAD, se observa microglía activada a los 16 y 20 meses. Escala 50μm. (i) Análisis cuantitativo que muestra el aumento de la inmunoreactividad de IBA1 en la corteza de ratones 3xTgAD (n=3 / grupo de edad). Evaluación estadística: ANOVA de una vía y post hoc de Tukey, \*p<0.05. Los resultados se muestran como el promedio ± SD (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.)

### 7.1.6 Corteza: machos.

El análisis cualitativo de las micrografías en la región de corteza (**Fig. 16a-d**), sugiere que no existen diferencias en la inmunoreactividad de IBA1 entre microglía de ratones 3xTgAD y No Tg a los 6 y 12 meses, y se observan algunas alteraciones en 16 y 20 meses de edad. De igual manera, en la evaluación de la morfología se encontró que la microglía de ratones 3xTgAD a los 6 y 12 meses no presenta alteraciones, y que, en 16 y 20 aumenta el tamaño del soma (**Fig. 16e-h**). La prueba post hoc demostró que no existen diferencias significativas en la IntDen de fluorescencia de IBA1 (**Fig. 16i**).



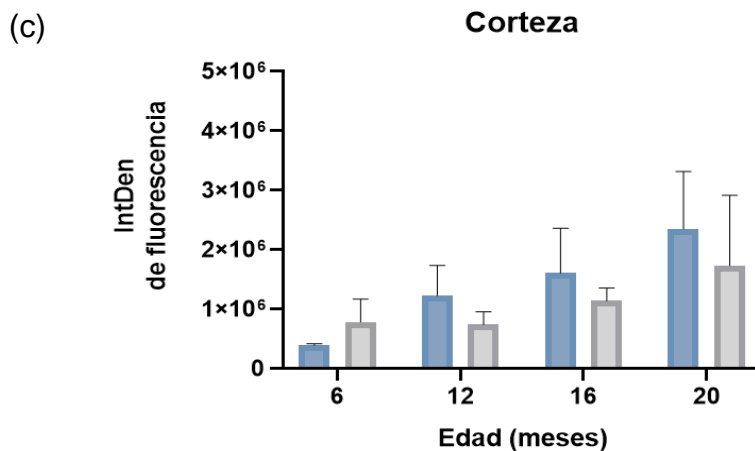
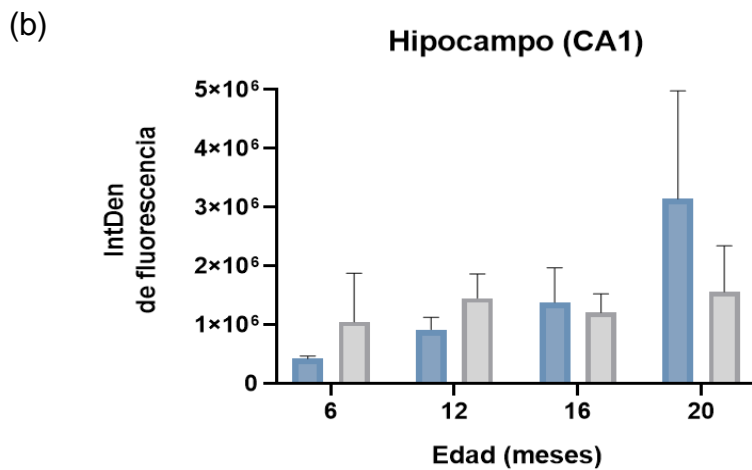
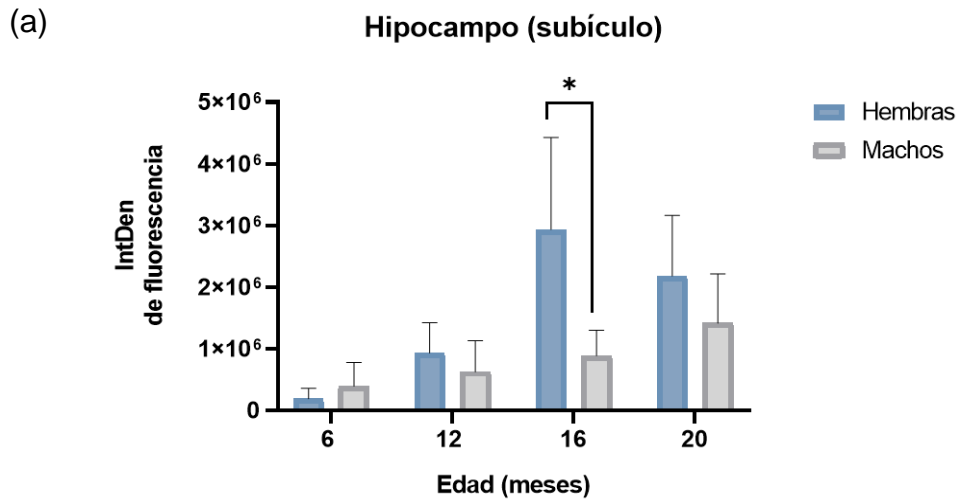


**Figura 16. Activación microglial dependiente de la edad en corteza de ratones macho. (a-d)** Micrografías de ratones 3xTgAD y no transgénicos, marcadas con anti-IBA1 (20x). **(e-h)** Cambios morfológicos generados entre microglías de corteza en el modelo 3xTgAD (escala 50µm). **(i).** Análisis cuantitativo de la inmunoreactividad de IBA1 en la corteza de cerebros de ratones hembra 3xTgAD (n=3 / grupo de edad). Evaluación estadística: ANOVA unidireccional y post hoc de Tukey, \*p<0.05. Los resultados se muestran como el promedio ± SD (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.)

### 7.1.7 Diferencias en la expresión de IBA1 entre machos y hembras.

Se realizó un análisis cuantitativo de la inmunoreactividad de IBA1 en las regiones de subículo, CA1 y corteza de ratones hembra y macho 3xTgAD, para determinar si existe alguna relación entre la activación microglial y el sexo. Se encontró que la IntDen de fluorescencia en la región de subículo, es significativamente más alta en hembras de 16 meses ( $p = 0.0187$ ), que en machos de la misma edad (**Fig. 17a**). Mientras que, las regiones de CA1 (**Fig. 17b**), y corteza (**Fig. 17c**), no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sexos. Los datos obtenidos de la IntDen de fluorescencia para cada grupo de edad y región se encuentran en el ANEXO II.





**Figura 17. Diferencias en la expresión de IBA1 entre sexos.** En las gráficas se muestra la comparación de la expresión de IBA1 en función de la edad, a partir de micrografías de cerebros de ratones del modelo 3xTgAD (n=3 / grupo de edad). **a) Hipocampo (subículo).** Se encontraron diferencias significativas a los 16 meses ( $p = 0.0187$ ). **b) Hipocampo (CA1).** No se encontró diferencia significativa. **c) Corteza.** Sin diferencias

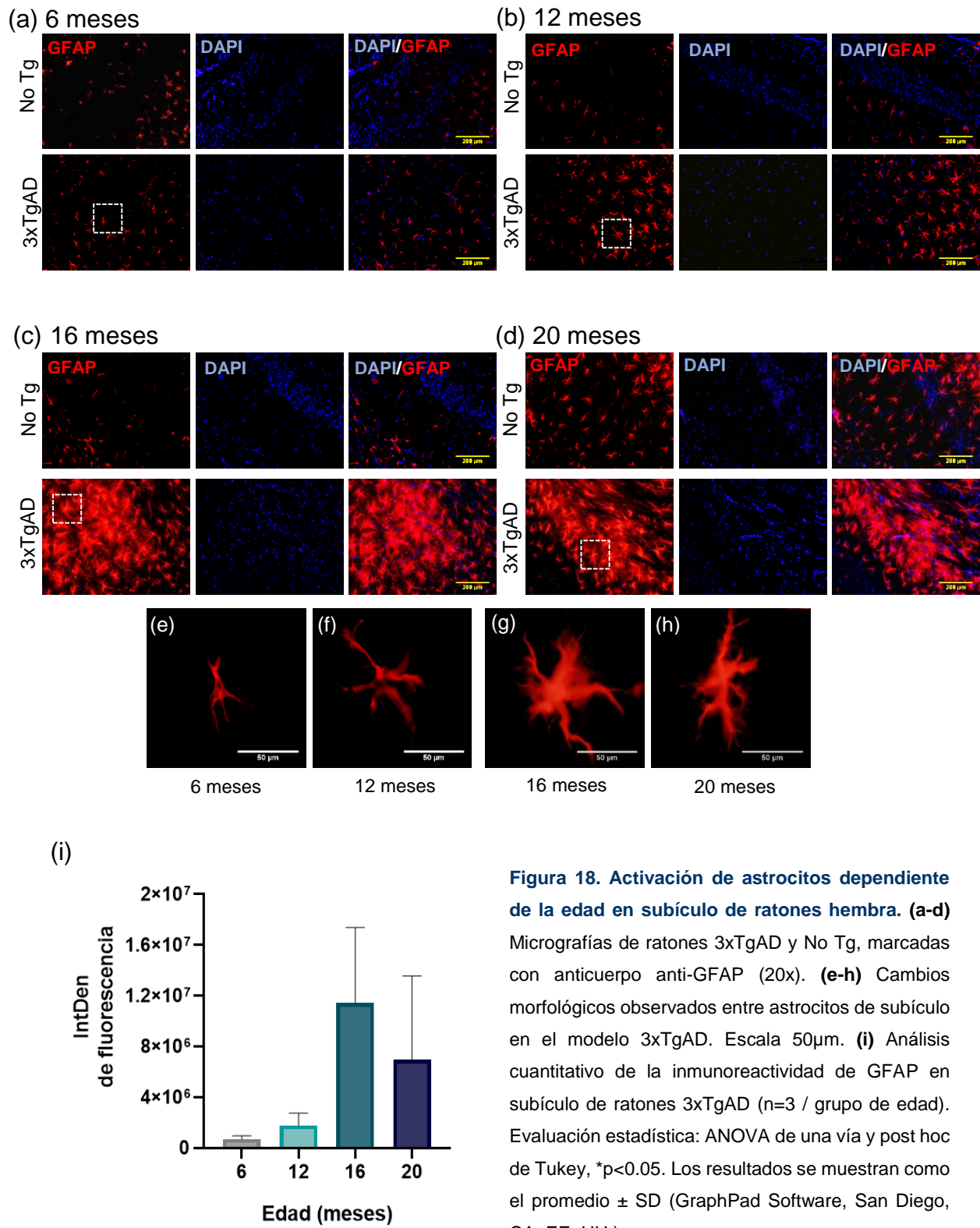
significativas. La evaluación estadística se obtuvo mediante ANOVA de dos vías, seguida por la post hoc de Šidák, para comparaciones múltiples, \* $p < 0.05$ . Las cifras corresponden al promedio  $\pm$  SD (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.)

## **7.2 Activación de astrocitos dependiente de la edad en ratones 3xTgAD.**

Para evaluar la activación de astrocitos, se realizaron inmunotinciones utilizando un anticuerpo anti-GFAP en las regiones de subículo y CA1 de cerebros de ratones 3xTgAD y No Tg, de 6, 12, 16 y 20 meses. GFAP es un marcador sensible de astrocitos que aumenta su expresión con la edad y en mayor medida durante la activación astrocítica (Nichols et al. 1993; Sofroniew & Vinters, 2010). Las regiones seleccionadas están asociadas con una mayor cantidad de agregados  $\beta$ A. Por cada región y edad se tomaron tres micrografías correspondientes a ratones 3xTgAD distintos ( $n = 3$  / grupo de edad), y de cada una de las micrografías se cuantificó la IntDen de fluorescencia mediante el programa ImageJ. A partir de los datos obtenidos, se realizó una comparación entre hembras y machos para determinar si existen diferencias en la activación de astrocitos entre sexos. Las micrografías de los cerebros de ratones No Tg, no fueron cuantificados y solo se utilizó una micrografía por edad para el análisis cualitativo.

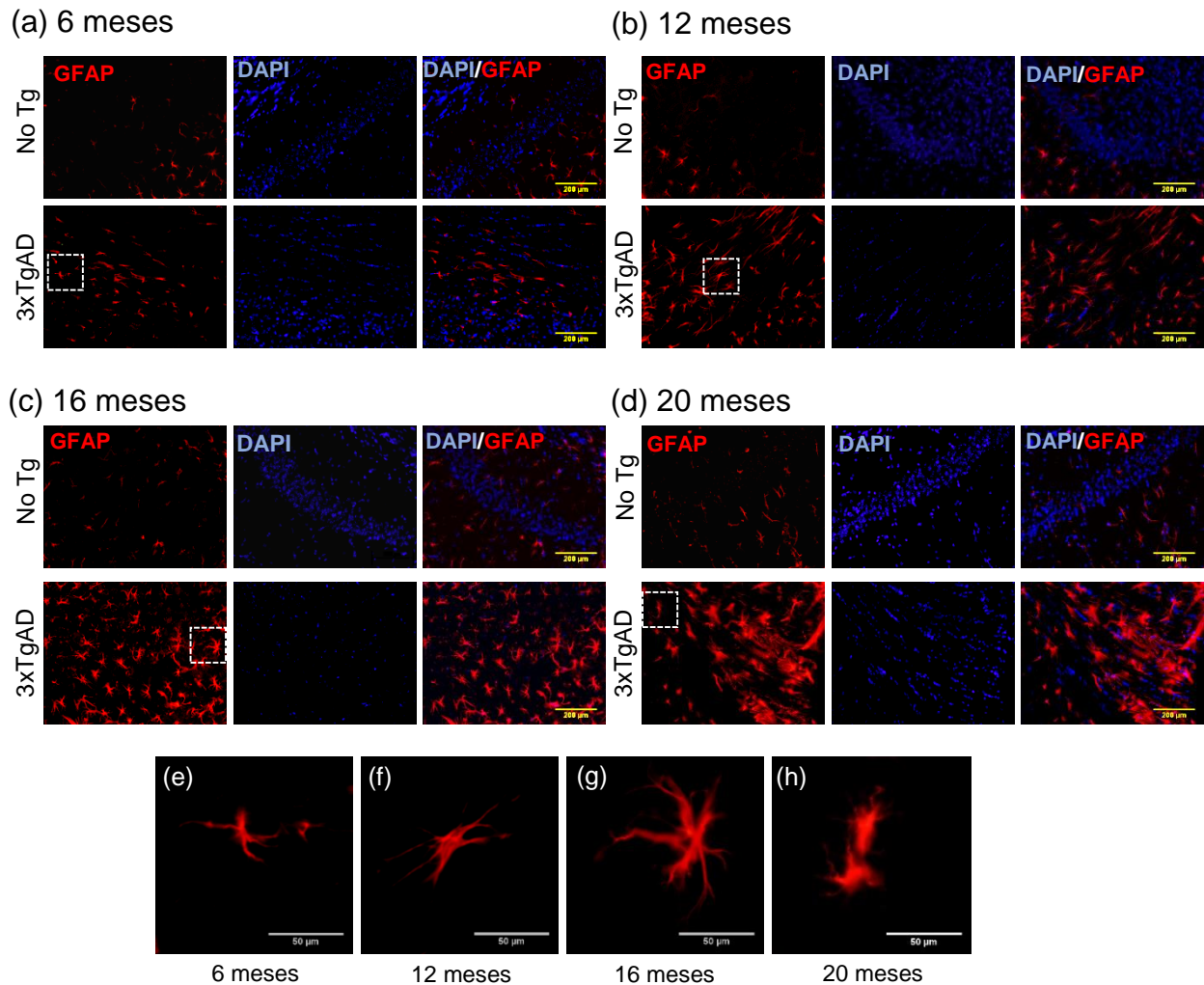
### **7.2.1 Hipocampo (subículo): hembras.**

En la comparación cualitativa entre astrocitos de ratones 3xTgAD y NoTg, no se encontraron diferencias a los 6 meses y a partir de los 12 meses se observaron cambios en la inmunoreactividad de GFAP, que aumentan gradualmente con la edad (**Fig. 18 a-d**). En cuanto a las alteraciones morfológicas, se observan astrocitos finos a los 6 meses, a los 12 meses se observan astrocitos de mayor grosor, pero es hasta los 16 y 20 meses cuando se observan cambios morfológicos asociados con la activación (**Fig. 18 e-h**). Sin embargo, el análisis cuantitativo mostró que la IntDen de GFAP no es significativamente mayor a ninguna edad.

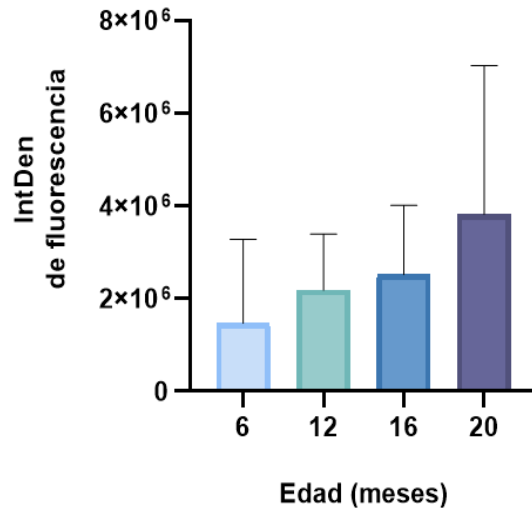


### 7.2.2 Hipocampo (subículo): machos.

Cualitativamente, la inmunoreactividad de GFAP en la región de subículo no fue diferente entre ratones transgénicos y NoTg a los 6 meses. De 12 a 20 meses incrementa GFAP paulatinamente, en el modelo 3xTgAD (**Fig. 19 a-d**). Morfológicamente, las células de 12 meses presentan alteraciones que necesitan mayor información para determinar si se trata de un fenotipo reactivo. En 16 y 20m se observa un fenotipo reactivo (**Fig. 19 e**). El análisis cuantitativo entre astrocitos de ratones 3xTgAD, confirmó que la IntDen de fluorescencia de GFAP no presenta diferencias significativas entre astrocitos 3xTgAD a ninguna edad (**Fig. 19i**).



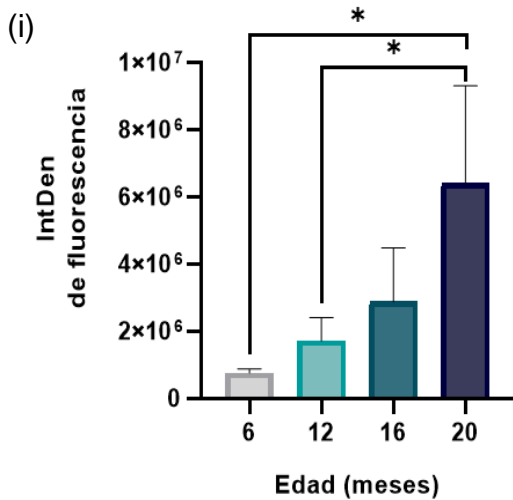
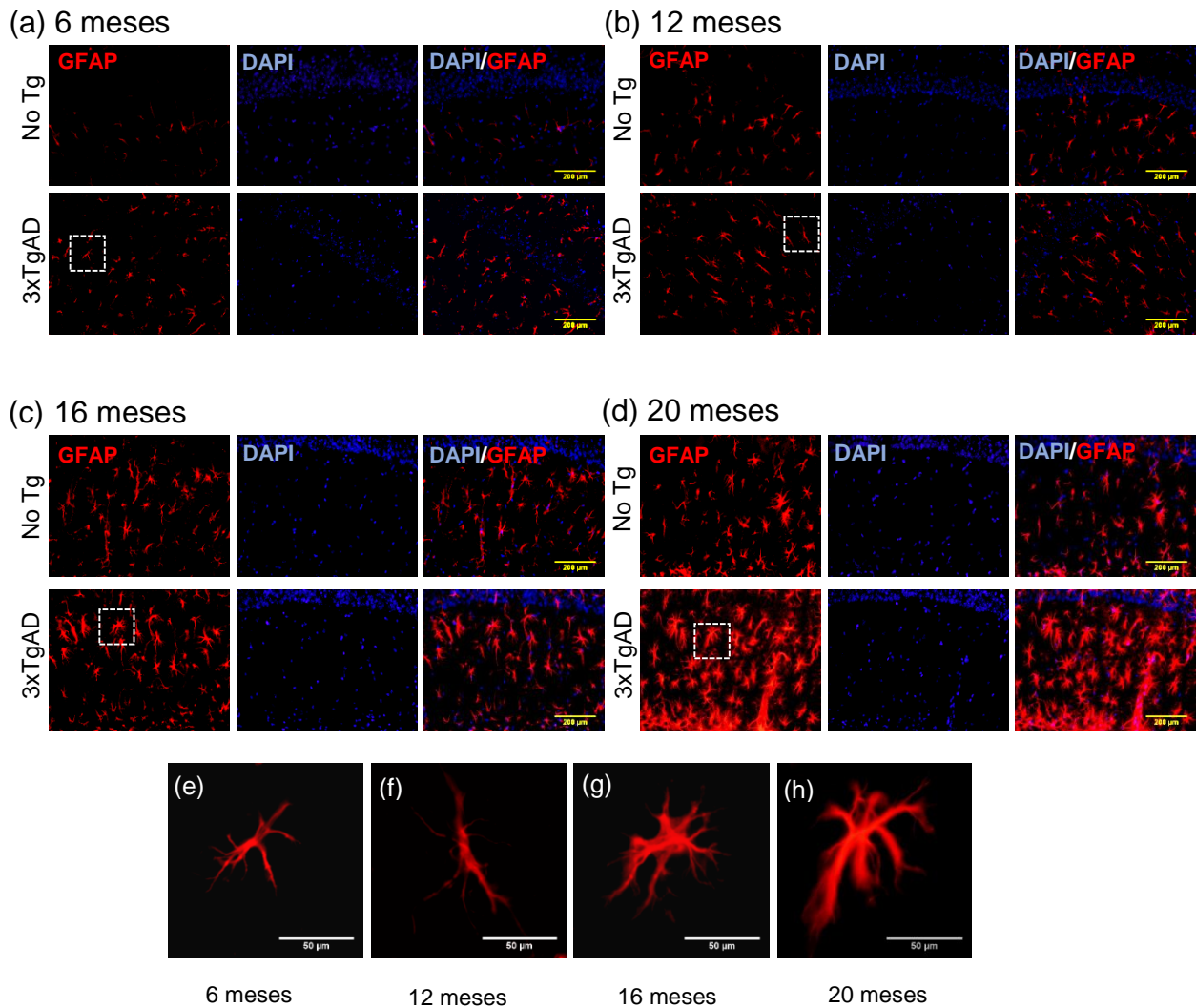
(i)



**Figura 19. Activación de astrocitos dependiente de la edad en subículo de ratones macho. (a-d)** Micrografías de ratones 3xTgAD y No Tg, marcadas con anticuerpo anti-GFAP (20x). **(e-h)** Cambios morfológicos observados entre astrocitos de CA1, donde se observa el aumento gradual de GFAP, de 6 a 16 meses, y atrofia celular en 20 meses. Escala 50µm. **(i)** Análisis cuantitativo de la IntDen de fluorescencia de GFAP en CA1 de ratones 3xTgAD (n=3 / grupo de edad). Evaluación estadística: ANOVA unidireccional y post hoc de Tukey, \*p<0.05. Los resultados se muestran como el promedio ± SD (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.)

### 7.2.3 Hipocampo (CA1): hembras.

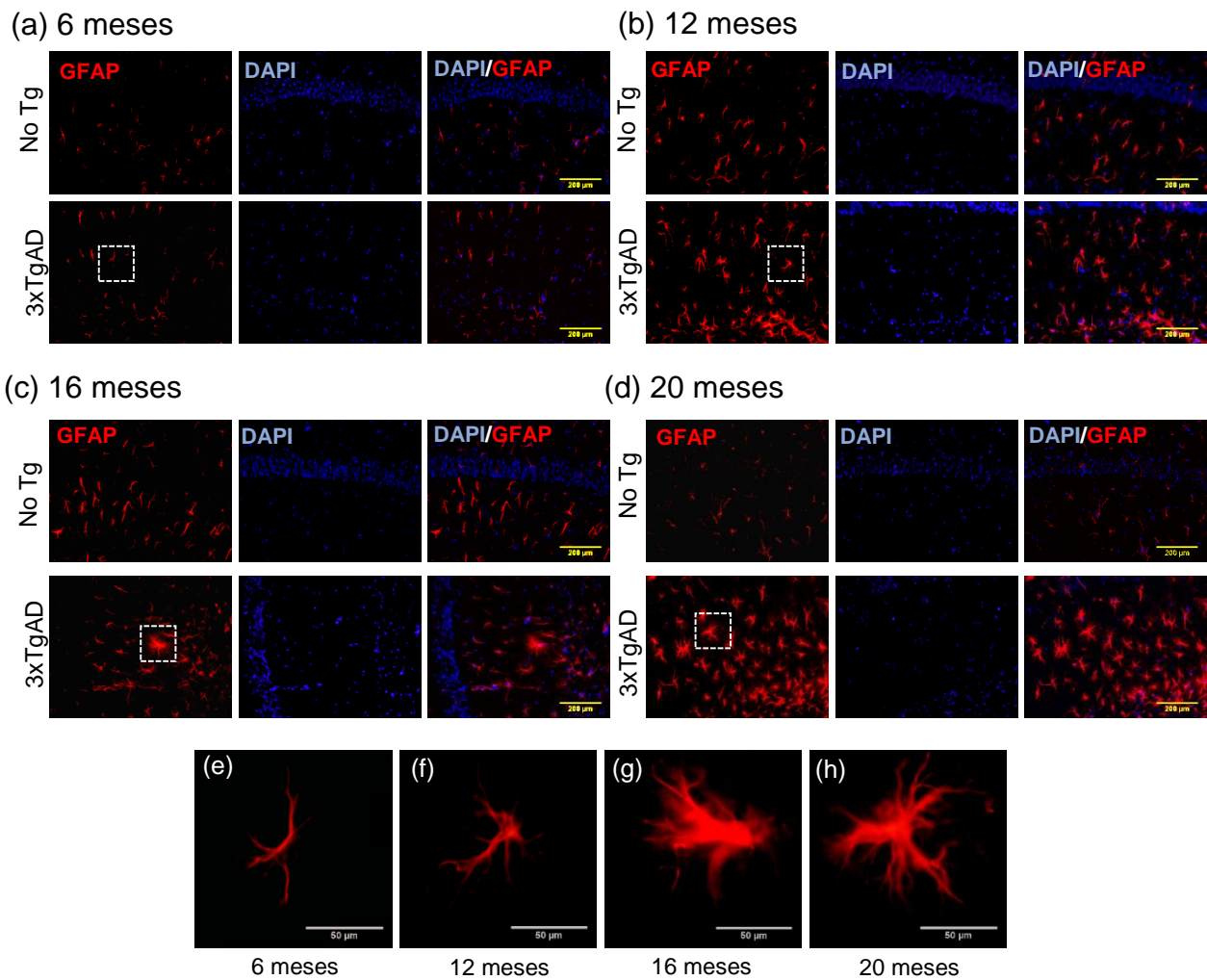
Se encontró que a los 6 y 12 meses los astrocitos de ratones 3xTgAD y NoTg, no presentan diferencia en la inmunoreactividad de GFAP, mientras que a los 16 y 20 meses GFAP aumenta sustancialmente en el modelo 3xTgAD (**Fig.20 a-d**). Morfológicamente, se hallaron astrocitos con un fenotipo normal a los 6 meses y a los 12 meses se observan de un mayor tamaño. La activación es evidente hasta 16 y 20 meses, en donde encontramos hipertrofia celular (**Fig. 20 g-h**). El análisis cuantitativo (**Fig. 20i**), confirmó que la IntDen de fluorescencia de GFAP es significativamente más alta a la edad de 20 meses, con respecto a 6 meses ( $p = 0.0152$ ), y 12 meses ( $p = 0.0391$ ).



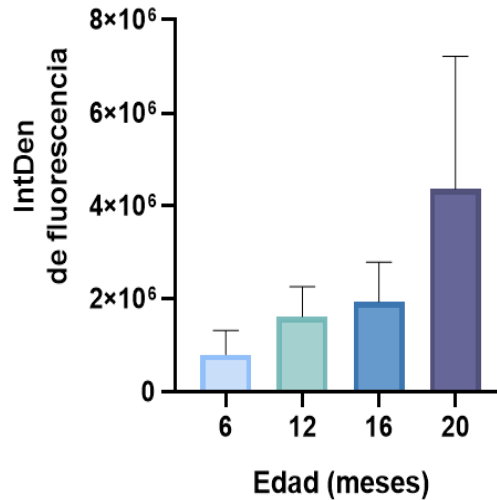
**Figura 20. Activación de astrocitos dependiente de la edad en CA1 de ratones hembra.** (a-d) Micrografías de ratones 3xTgAD y no transgénicos, marcadas con anticuerpo anti-GFAP (20x). (e-h) Cambios morfológicos, en los que se observa el incremento en la expresión de GFAP. Escala 50µm. (i) Análisis cuantitativo de la inmunoreactividad de GFAP en CA1 de ratones 3xTgAD (n=3 / grupo de edad). Evaluación estadística: ANOVA unidireccional y post hoc de Tukey, \*p<0.05. Los resultados se muestran como el promedio ± SD (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

### 7.2.4 Hipocampo (CA1): machos.

En el análisis cualitativo se observaron diferencias de inmunoreactividad de GFAP entre ratones 3xTgAD y No Tg, a partir de 12 meses. **(Fig. 21 a-d)**. Sin cambios morfológicos en astrocitos de 6 y 12 meses, y con activación de astrocitos en 16 y 20 meses **(Fig. 21 e-h)**. No obstante, en el análisis cuantitativo entre astrocitos de ratones 3xTgAD, no se determinó que existan diferencias significativas en la IntDen de fluorescencia de GFAP **(Fig 21i)**.



(i)

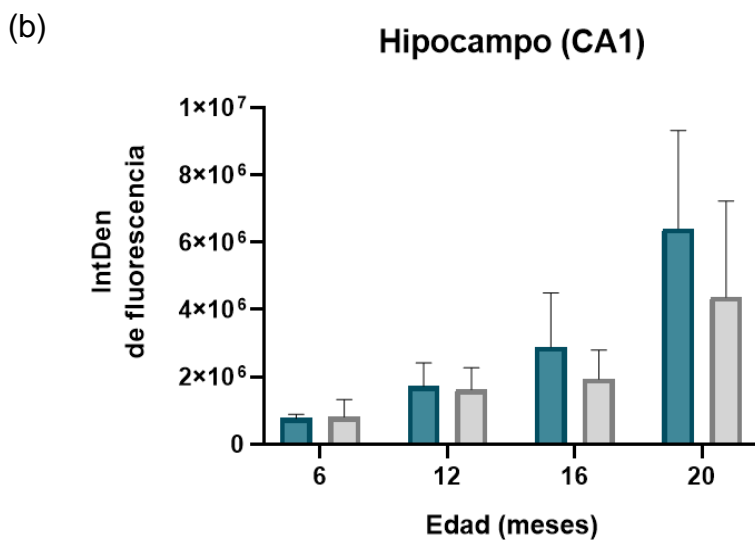
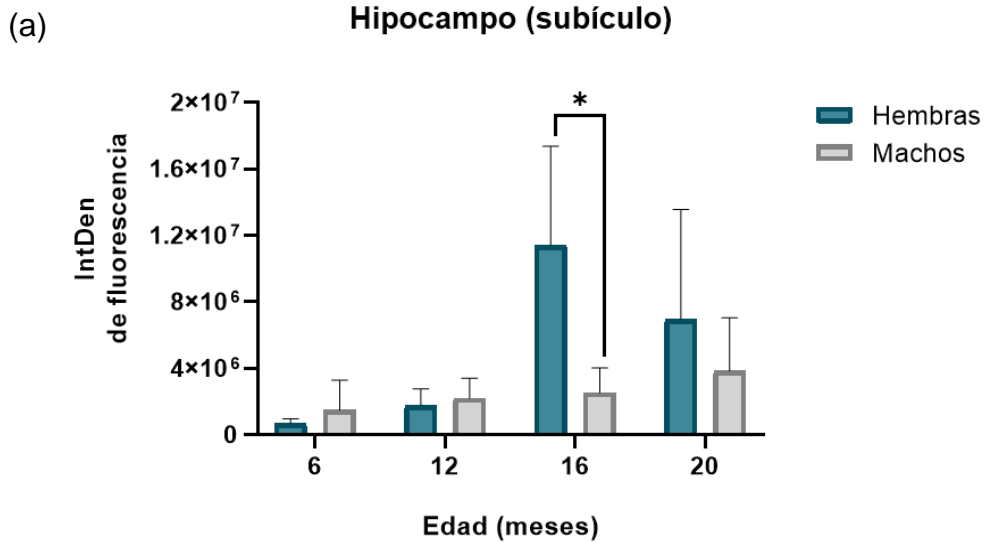


**Figura 21. Activación de astrocitos dependiente de la edad en CA1 de ratones macho. (a-d)** Micrografías de ratones 3xTgAD y no transgénicos, marcadas con anticuerpo anti-GFAP (20x). **(e-h)** Cambios morfológicos observados entre astrocitos de CA1 en el modelo 3xTgAD (escala 50µm). **(i)** Análisis cuantitativo de la inmunoreactividad de GFAP en CA1 de ratones 3xTgAD (n=3 / grupo de edad). Evaluación estadística: ANOVA unidireccional y post hoc de Tukey, \*p<0.05. Los resultados se muestran como el promedio ± SD (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.)

### 7.2.5 Diferencias en la expresión de GFAP entre machos y hembras

Se realizó un análisis cuantitativo de la inmunoreactividad de GFAP en las regiones de subículo y CA1 de ratones hembras y machos 3xTgAD, para determinar si existe alguna relación entre la activación celular y el sexo. Se encontró que la inmunoreactividad en la región de subículo es significativamente más alta (p= 0.0066), en hembras a los 16 meses (**Fig 22a**), mientras que, en la región CA1 no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos sexos (**Fig 22b**).





**Figura 22. Diferencias en la expresión de GFAP entre sexos.** En las gráficas muestra la comparación de la expresión de GFAP en función de la edad, a partir de micrografías de cerebros de ratones del modelo 3xTgAD (n=3 / grupo de edad). **a) Hipocampo (subículo).** Se encontraron diferencias significativas a los 16 meses ( $p=0.0066$ ). **b) Hipocampo (CA1).** No se encontraron diferencias significativas. La evaluación estadística se obtuvo mediante ANOVA de dos vías, seguida por la post hoc de Šidák, para comparaciones múltiples,  $*p<0.05$ . Las cifras corresponden al promedio  $\pm$  SD. (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.).

## 8. DISCUSIÓN.

La EA es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada patológicamente por la acumulación de placas  $\beta$ A, agregación de la proteína tau hiperfosforilada en forma de NFTs y pérdida neuronal (Henstridge et al., 2019). De acuerdo con la hipótesis de la cascada amiloide, la deposición de las especies  $\beta$ A en el cerebro, es el evento iniciador de la EA. Siguiendo esta hipótesis, se han desarrollado agentes terapéuticos que actúan mediante la supresión, disminución de la producción o elevación de la tasa de eliminación de  $\beta$ A, en el cerebro y LCR (Uddin et al., 2020). Sin embargo, a pesar de que los tratamientos dirigidos al  $\beta$ A han logrado demostrar una reducción significativa de la deposición amiloide, sigue existiendo incertidumbre con respecto a los beneficios clínicos, lo que ha sugerido que la hipótesis de la cascada amiloide podría ser insuficiente para explicar la patogénesis de la EA. Por ello, en esta investigación nos enfocamos en otro de los eventos neuropatológicos clave en el inicio y desarrollo de la enfermedad, la neuroinflamación. En particular, evaluamos la progresión de la activación microglial y astrocítica en presencia de agregados  $\beta$ A, con el objetivo de ampliar nuestra comprensión acerca de los procesos fisiopatológicos y su impacto en el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos.

La neuroinflamación es una respuesta que promueve la infiltración de células inmunitarias y la activación de células gliales (Wang et al., 2015; Cai et al., 2022), las cuales inducen mecanismos de señalización responsables de la secreción de moléculas inflamatorias asociadas con la neurodegeneración (Uddin et al., 2022). Por ello, en los últimos años se ha sugerido el control de la activación microglial y astrocítica como objetivo terapéutico para la EA. Clásicamente, las microglías se han descrito en función de sus características morfológicas y su expresión antigénica, las cuales pueden actuar como indicadores de diferentes estados funcionales (Lier et al., 2021). A pesar de que se suelen utilizar las denominaciones “microglía en reposo” y “microglía activada”, se debe tener en cuenta que la microglía es mucho más diversa y que puede existir una variedad de estados de activación intermedios (Davis et al., 2017), lo que complica el análisis microglial desde un punto de vista únicamente cualitativo. No obstante, la descripción de la

morfología celular sigue siendo útil por la estrecha relación forma-función. Por lo que, para complementar nuestro análisis morfológico, cuantificamos la inmunoreactividad de la proteína IBA1, un marcador caracterizado por expresarse en todos los fenotipos microgliales, pero sobre todo por el aumento en su expresión durante la activación microglial.

En el análisis cualitativo de reactividad microglial comparamos la expresión de IBA1 en cerebros de ratones hembra y macho del modelo 3xTgAD y No Tg, para comprobar el incremento en la expresión del marcador con la progresión de la patología, en las áreas de subículo (Figs. 11 a-d y 12 a-d), CA1 (Figs. 13 a-d y 14 a-d), y corteza (Figs. 15 a-d y 16 a-d). De manera cualitativa determinamos que a los 6 meses de edad no existen diferencias entre ratones 3xTgAD y los No Tg, en ninguna de las tres regiones analizadas. Por el contrario, a partir de los 12 meses se observó un aumento de IBA1 en función de la edad en los ratones del modelo 3xTgAD. A continuación, evaluamos las alteraciones morfológicas con respecto al tamaño, redondez del soma, grosor y longitud de las prolongaciones. Al seleccionar una microglía representativa por región, comprobamos que a los 6 meses la morfología se mantuvo íntegra, sin cambios asociados con la activación (Figs. 11-16 e). A los 12 meses se encontró que, las microglías de corteza conservaron una estructura similar a la anterior. En CA1 se perdió la redondez del soma pero no hubo cambios de tamaño significativos, en contraste con subículo, donde las microglías exhibieron cambios morfológicos abruptos, como la pérdida de sus ramificaciones y el excesivo incremento de tamaño (Figura 11 f), lo que se relaciona con la deposición del  $\beta$ A. Esta morfología ameboide se considera fagocítica y se ha informado que tienen una mayor capacidad de eliminación del  $\beta$ A, en comparación con las células no ameboides (Guillot-Sestier et al., 2021). Cabe resaltar que en el modelo 3xTgAD, se ha reportado la presencia del  $\beta$ A desde los 6 meses de edad en subículo y CA1, en el 80 % de los ratones estudiados. Además, a los 12 meses se localizó  $\beta$ A en todas las regiones del hipocampo, en el 100 % de los ratones (Belfiore et al., 2019). Sin embargo, a pesar de que el  $\beta$ A puede aparecer desde los 6 meses, fue hasta los 12 meses que hallamos signos de activación microglial en subículo y los primeros indicios en CA1. Por otro lado, en corteza la microglía

activada se encontró hasta los 16 meses, a esta edad todas las muestras celulares evidenciaron activación morfológica, sin excepción. El resumen de la morfología microglial se muestra en la Fig. 23 (ANEXO).

El análisis cuantitativo del modelo 3xTgAD, confirmó el incremento en la expresión de IBA1 en función de la edad, tanto en hembras como en machos, en CA1 y corteza, así como en el subículo de machos. No obstante, el subículo de hembras mostró diferencias significativas en la IntDen de fluorescencia de IBA1 a los 16 meses, con respecto a 6 meses, y no entre 6 y 20 meses, como se esperaba (Fig.11i). Esto podría ocurrir porque, como se mencionó anteriormente, el subículo es una de las primeras regiones que presentan agregados amiloides, lo que conduce a una respuesta glial temprana y acelera la muerte microglial, por ende, en esta zona podríamos encontrar un número reducido de microglías al analizar ratones que alcanzan los 20 meses. Esto quiere decir que, la disminución de la IntDen de fluorescencia a edades avanzadas no necesariamente debe estar asociada con una cantidad menor de microglías activadas, sino con la muerte celular.

De manera similar al análisis de microglía, en el estudio de la activación de astrocitos comparamos el incremento de la expresión del marcador GFAP con la progresión de la EA. Nuestros resultados revelaron que tanto en hembras como en machos, en las secciones de subículo (Figs.18 a-d y 19 a-d), y CA1 (Figs. 20 a-d y 21 a-d), se produjo un incremento de GFAP en función de la edad, que podríamos asociar con la reactividad celular. En general, las diferentes regiones analizadas mostraron una morfología con cambios progresivos, que van desde estructuras finas y con pocas ramificaciones, a células de mayor tamaño y con un número mayor de extremidades. Recordemos que GFAP forma parte del citoesqueleto y de las ramificaciones principales, pero no está presente en toda la célula, por lo que el tamaño y el grado de ramificación detectados suelen ser limitados en tejido sano (Guillamón-Vivancos et al., 2015), como se observó en los controles y los ratones 3xTgAD de 6 meses. En cambio, cuando los astrocitos comienzan a responder a las lesiones del SNC, hay una remodelación del citoesqueleto que favorece la

regulación a la alza de GFAP (Brenner & Messing, 2021), y esta sobreexpresión del marcador, es lo que nosotros describimos como un incremento de tamaño o hipertrofia celular, observado principalmente en 16 y 20 meses. Sin embargo, también podemos encontrar astrocitos como el de la fig. 19 h, que no logran conservar sus ramificaciones o que son demasiado cortas, debido a un posible mecanismo de defensa (Escartin et al., 2021), y no como una menor expresión de GFAP en condiciones normales.

Al cuantificar la IntDen de fluorescencia en astrocitos, confirmamos que en CA1 de hembras y machos, así como en el subículo de machos, se lleva a cabo un aumento progresivo de GFAP, lo que coincide con la descripción morfológica de activación. No obstante, en el subículo de hembras nos encontramos con la misma particularidad de microglía. A pesar de que en este caso no se registraron diferencias estadísticamente significativas (Fig. 18i), podemos observar que la intensidad de fluorescencia se elevó en gran medida hasta los 16 meses y luego descendió a los 20 meses. Como se mencionó anteriormente, esto puede estar asociado con la presencia constante de  $\beta A$ , que favorece la muerte celular en edades avanzadas, y no con una disminución de la reactividad glial. Asimismo, aunque disminuye la IntDen de fluorescencia, la morfología celular conserva las características de activación, como se observa en la Fig. 24 (ANEXO). Por el contrario, los ratones macho en la región de subículo mostraron un aumento constante de GFAP, pero en menor medida que las hembras, lo que sugiere la existencia de un factor relacionado con el sexo en la respuesta glial. Además, se debe tener en cuenta que solo pudimos analizar micrografías de tres ratones distintos y que, para tener una mejor evaluación estadística deberíamos de considerar un mayor número de muestras, que permitan controlar un poco más la dispersión de nuestros datos, que no nos afecten tanto al momento de comparar los promedios de nuestras IntDen de fluorescencia y podamos determinar con mayor precisión si existen o no diferencias estadísticamente significativas en esta región. Asimismo, se debe tener en cuenta que, aunque el incremento en la expresión de GFAP es una fuerte indicación de astrocitos reactivos, no es un marcador absoluto de reactividad (Escartin et al., 2021), por lo que podríamos agregar el uso de otros

marcadores astrocíticos, en combinación con GFAP, y así obtener información más detallada acerca de los estados de activación,

Algunos estudios han reportado que la EA afecta en mayor medida a las mujeres tanto en la prevalencia de la enfermedad como en la tasa de progresión de los síntomas. Aunque se ha sugerido que esto está relacionado con que la esperanza de vida en mujeres es de 5.4 años más que en hombres (Riedel et al., 2016; United Nations, 2022), todavía no está claro cuáles son los mecanismos que subyacen esta divergencia sexual. Entre las principales causas, se han incluido factores de riesgo genético, la influencia de las hormonas sexuales, diferencias en la estructura cerebral y la neuroinflamación (Fisher et al., 2018).

Hasta ahora, las diferencias en las respuestas neuroinflamatorias dependientes del sexo, no se han estudiado en gran medida. Por ello, a partir de nuestros datos obtenidos, efectuamos un análisis estadístico para evaluar las diferencias con respecto al sexo. Aquí encontramos que, la IntDen de fluorescencia tanto de IBA1 (Fig. 17a), como de GFAP (Fig. 22a), fue significativamente mayor en hembras que en machos, a los 16 meses, en la región de subículo. Mientras que, las regiones de CA1 y corteza de IBA1 (Fig. 17b-c), así como CA1 de GFAP (Fig. 22b), no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sexos, a ninguna edad. Sin embargo, se encontró que en estas regiones, los valores de la IntDen de IBA1 y GFAP en 16 y 20 meses estuvieron disminuidos en machos, en comparación con las hembras. Si observamos las figuras 17 y 22, podemos observar que, de manera general, la IntDen de fluorescencia de los machos tiende a crecer constantemente pero en menor medida que las hembras, excepto por la edad de 12 meses en CA1 para IBA1 (Fig. 17b). Lo que sugiere, una progresión más lenta de la activación glial en machos, durante la EA. Los mecanismos moleculares implicados no son claros, pero se ha sugerido, que la incidencia de la EA es mayor en mujeres debido a la disminución acelerada de los niveles de estrógeno durante la menopausia, mientras que en hombres la disminución de testosterona es gradual. Esta disminución de hormonas sexuales puede afectar el metabolismo mitocondrial y conducir al incremento del estrés oxidativo y la liberación de ROS. En consecuencia, se puede

desencadenar la activación del inflamasoma NLRP3, que conduce a la producción de citocinas proinflamatorias y a la siembra de ASC, favoreciendo la agregación de  $\beta$ A (Ennerfelt & Lukens, 2020; Leng & Edison, 2021). Además, en microglías del modelo de ratón APP/PS1, se encontró que alteraciones en el metabolismo, relacionadas estrechamente con la inflamación, podrían regular a la alza a Cst7 y en consecuencia suprimir la fagocitosis de  $\beta$ A en hembras. Mientras que, en los machos no hubo alteración metabólica y conservaron su función fagocítica, lo que sugirió una mejor respuesta de las microglías de los machos frente al  $\beta$ A (Guillot-Sestier et al., 2021). Asimismo, se sabe menos sobre la respuesta inflamatoria dependiente del sexo en astrocitos, pero en un estudio en el que se evaluó la actividad antiinflamatoria de IGF-1 en cultivos celulares de astrocitos, se encontró que IGF-1 fue capaz de contrarrestar la activación inducida por LPS, al disminuir la expresión de las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10, solo en astrocitos masculinos. Asimismo, se encontró que IGF-1 moduló los cambios en la fagocitosis en un estado de activación inducido, solamente en astrocitos masculinos, lo que podría reducir una respuesta exacerbada (Pinto-Benito et al., 2022). Así que, considerando que el estrés oxidativo y las ROS generadas por la disminución de hormonas sexuales también amplifica la respuesta inflamatoria de los astrocitos (en mayor medida en hembras), y que además, los astrocitos muestran un mejor control de la fagocitosis durante la activación, demostramos que nuestros resultados de activación morfológica en subículo, así como los análisis cuantitativos de la inmunoreactividad de GFAP en machos, coinciden con una respuesta atenuada durante la EA, en comparación con la hembras. De igual modo, la comparación morfológica microglial entre hembras y machos, así como su análisis estadístico, sugiere que los machos también presentan una respuesta microglial atenuada. Sin embargo, a pesar de que los ratones macho responden de una forma más lenta, en nuestro laboratorio también hemos encontrado que los ratones macho 3xTgAD suelen morir antes que las hembras, a pesar de que estas muestren respuestas mucho más exacerbadas, lo que nos regresa al problema de si es que la activación glial es una respuesta neuroprotectora o neurotóxica.

## 9. CONCLUSIONES.

Esta investigación ha proporcionado evidencia de la complejidad de las respuestas gliales que acontecen en la EA. Las microglías y astrocitos son células multifacéticas que actúan en función de la región cerebral, edad, género y patología. En el modelo 3xTgAD, encontramos que:

- 1) Los cambios morfológicos en la microglial de hembras aparecen primero en la región de subículo y coincide con la aparición de agregados amiloides a los 12 meses y no a los 6 meses como otros estudios acerca de este modelo murino. Luego, la activación se extiende a otras regiones del hipocampo como CA1 y más tarde a corteza;
- 2) En machos ocurre de la misma manera, pero los cambios morfológicos surgen de forma más paulatina.
- 3) Encontramos que en los ratones que sobreviven a los 20 meses de edad, disminuye la cantidad de microglía y astrocitos en la región de subículo, lo que puede ser debido a la muerte celular.
- 4) Confirmamos que los cambios morfológicos en la microglía tienen lugar antes que en la astrogía, al demostrar que las primeras microglías activadas se observan a los 12 meses, mientras que los astrocitos activados son evidentes hasta los 16 meses.
- 5) Finalmente, los datos de activación tanto de microglía como de astrocitos confirmaron la implicación de la respuesta glial en la divergencia sexual de la EA, en la que se observó una progresión más lenta de la activación glial en machos, en comparación con las hembras.

Esta investigación requiere de mayor exploración, ya que estos resultados sobre la activación glial evidencian una importante contribución en la progresión de la EA, por lo que la comprensión de los diversos estados de activación de estas células podría ayudar a identificar nuevos blancos farmacológicos.

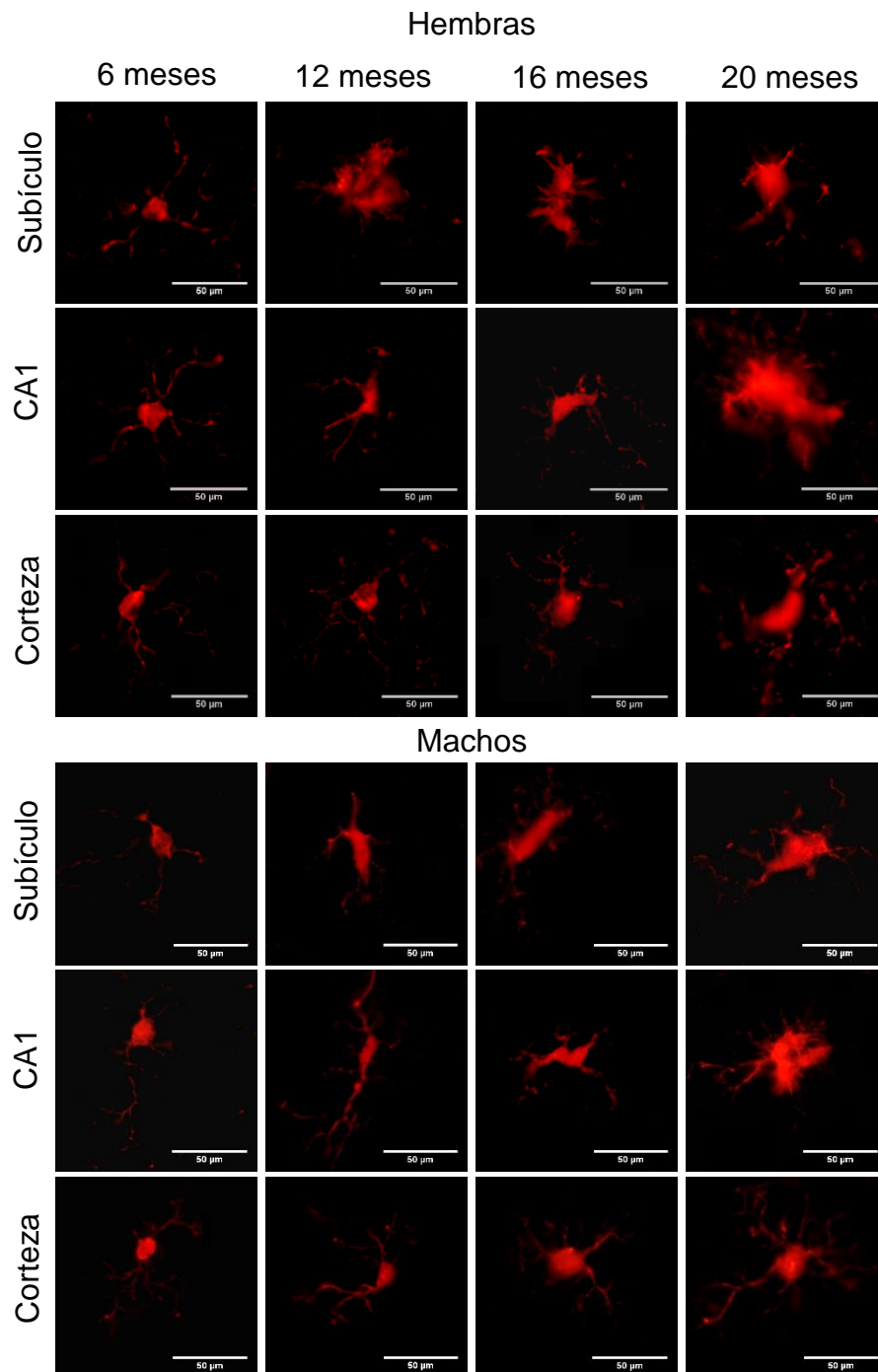


## **10. PERSPECTIVAS.**

- Estudiar la gliosis reactiva con una combinación de marcadores homeostáticos y de activación, para conseguir una definición más detallada de los estados de activación.
- Estudiar la relación entre microglía reactiva y astrocitos reactivos en presencia de péptidos amiloides y ovillos neurofibrilares con el objetivo de abordar la comunicación entre estas células durante EA.

## 11. ANEXO I.

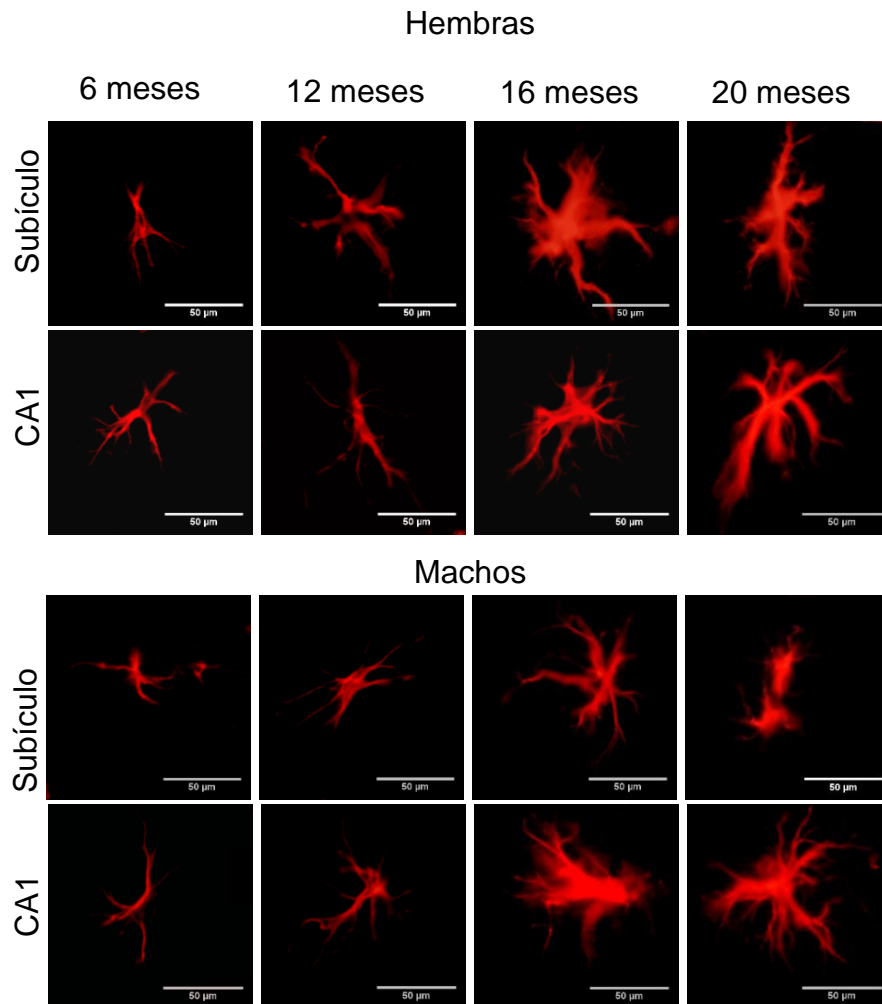
### 11.1 Morfología microglial en ratones 3xTgAD.



**Figura 23. Activación de microglía en ratones 3xTgAD.** Se muestran las tres regiones analizadas, en las que se observa la progresión de la EA. a) En hembras, encontramos un fenotipo microglial anormal a los 12 m en subículo y en CA1, mientras que, en corteza se observa hasta los 16 m. Solo la región de subículo presenta

microglía ameboide a los 12m, mientras que en CA1 aparece hasta los 20m. b) Se encontraron fenotipos anormales a partir de 12 m en subículo, y en CA1 y corteza hasta los 16. No obstante, solo se encontró morfología ameboide en CA1 a los 20 meses. Al comparar estas micrografías, observamos que la activación microglial ocurre primero en la región de subículo, luego en CA1 y finalmente en corteza, con cambios más drásticos en hembras que en machos. Escala: 50  $\mu$ m.

## 11.2 Morfología de astrocitos en ratones 3xTgAD.



**Figura 24. Morfología de astrocitos reactivos en ratones 3xTgAD.** Micrografías en las que se observan los cambios morfológicos relacionados con la activación de astrocitos, durante la EA. **a)** Observamos el incremento de tamaño en astrocitos de 12 m, con respecto a 6 m, en subículo y CA1. En 16 y 20 m es evidente la hipertrofia celular. Según estas micrografías, la activación en hembras, ocurre un poco antes en la región de subículo. **b)** En machos, los astrocitos de 6 y 12 m, tanto en subículo como en CA1 presentan características similares que no se asocian con la activación. Mientras que, a los 16 m en subículo, así como a los 16 y 20 m en CA1 observamos hipertrofia celular. Además, se observa la atrofia de las ramificaciones a los 20 m en la región de subículo. Escala: 50  $\mu$ m.

## 12. ANEXO II.

**Tabla 3.** Resultados de la densidad integrada de fluorescencia de IBA1 en cerebros de ratones hembra y macho del modelo 3xTgAD (n=3/ por grupo).

IntDen de fluorescencia de IBA1		
Hipocampo (Subículo)		
	Hembras	Machos
6 meses	92513.774	135639.887
	104361.05	209433.528
	388174.791	841561.674
12 meses	442191.254	369810.911
	1418771.903	311011.413
	948259.918	1214214.267
16 meses	3913323.026	440445.831
	3681814.855	1258201.495
	1220601.891	970580.293
20 meses	1796607.588	886866.86
	1454639.062	2338584.031
	3303963.381	1029352.758
Hipocampo (CA1)		
6 meses	374744.945	1996213.527
	467477.652	700653.52
	427479.245	446501.377
12 meses	692320.749	1877603.915
	966645.631	1426098.274
	1096718.58	1057235.856
16 meses	941795.178	1160863.927
	2048523.97	907229.062
	1159140.48	1547437.361
20 meses	2818873.1	1106206.64
	1489169.15	2464900.442
	5121837.34	1105587.508
Corteza		
6 meses	411970.728	1122801.25
	395976.041	360830.569
	361452.09	857322.811
12 meses	1716417.42	657641.255
	707130.254	569956.804
	1263644.14	984564.101
16 meses	2477168.63	971868.359
	1127762.97	1383701.018
	1216776.49	1059696.22
20 meses	2572346.66	943827.842
	3184122.07	3092227.47
	1293315.81	1157901.417

**Tabla 4.** Resultados de la densidad integrada de fluorescencia de GFAP en cerebros de ratones hembra y macho del modelo 3xTgAD (n=3/ por grupo).

IntDen de fluorescencia de GFAP		
Hipocampo (Subículo)		
	Hembras	Machos
6 meses	978857.358	335608.403
	624343.95	519872.285
	462976.612	3556757.84
12 meses	920671.417	1348242.49
	2844970.58	1637431.08
	1529118.36	3576908.28
16 meses	4649082.52	1069993.49
	13609628.7	2421380.08
	15953838.2	4065802.74
20 meses	14570903.4	7434247.95
	3408750.63	1278617.44
	2871261.22	2757391.59
Hipocampo (CA1)		
6 meses	649997.657	796442.533
	896755.168	286182.886
	733273.927	1328722.71
12 meses	929854.857	2189308.39
	2268122.88	910645.087
	1948198.87	1750446.63
16 meses	1269167.23	1141963.75
	2909542.88	1821698.24
	4473725.94	2842163.66
20 meses	3867133.49	7321572.54
	5756211.65	4135691
	9581863.07	1633500.54

### 13. REFERENCIAS.

Ables, J. L., Breunig, J. J., Eisch, A. J., & Rakic, P. (2011). Not (ch) just development: Notch signalling in the adult brain. *Nature reviews. Neuroscience*, 12(5), 269–283. <https://doi.org/10.1038/nrn3024>

Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews. Neuroscience*, 7(1), 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>

Ahmad, M. H., Fatima, M., & Mondal, A. C. (2019). Influence of microglia and astrocyte activation in the neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease: Rational insights for the therapeutic approaches. *Journal of clinical neuroscience: official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 59, 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2018.10.034>

Allen, N. J., & Eroglu, C. (2017). Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron*, 96(3), 697–708. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.056>

Anderson, J. P., Esch, F. S., Keim, P. S., Sambamurti, K., Lieberburg, I., & Robakis, N. K. (1991). Exact cleavage site of Alzheimer amyloid precursor in neuronal PC-12 cells. *Neuroscience letters*, 128(1), 126–128. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(91\)90775-o](https://doi.org/10.1016/0304-3940(91)90775-o)

Antonucci, F., Turola, E., Riganti, L., Caleo, M., Gabrielli, M., Perrotta, C., Novellino, L., Clementi, E., Giussani, P., Viani, P., Matteoli, M., & Verderio, C. (2012). Microvesicles released from microglia stimulate synaptic activity via enhanced sphingolipid metabolism. *The EMBO journal*, 31(5), 1231–1240. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.489>

Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R. P., & Haydon, P. G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends in neurosciences*, 22(5), 208–215. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(98\)01349-6](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(98)01349-6)

Argaw, A. T., Asp, L., Zhang, J., Navrazhina, K., Pham, T., Mariani, J. N., Mahase, S., Dutta, D. J., Seto, J., Kramer, E. G., Ferrara, N., Sofroniew, M. V., & John, G. R.

(2012). Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *The Journal of clinical investigation*, 122(7), 2454–2468. <https://doi.org/10.1172/JCI60842>

Bachiller, S., Jiménez-Ferrer, I., Paulus, A., Yang, Y., Swanberg, M., Deierborg, T., & Boza-Serrano, A. (2018). Microglia in Neurological Diseases: A Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 488. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00488>

Bak, L. K., Schousboe, A., & Waagepetersen, H. S. (2006). The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *Journal of neurochemistry*, 98(3), 641–653. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03913.x>

Baldwin, K. T., & Eroglu, C. (2017). Molecular mechanisms of astrocyte-induced synaptogenesis. *Current opinion in neurobiology*, 45, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.05.006>

Batarseh, Y. S., Duong, Q. V., Mousa, Y. M., Al Rihani, S. B., Elfakhri, K., & Kaddoumi, A. (2016). Amyloid- $\beta$  and Astrocytes Interplay in Amyloid- $\beta$  Related Disorders. *International journal of molecular sciences*, 17(3), 338. <https://doi.org/10.3390/ijms17030338>

Bateman, R. J., Aisen, P. S., De Strooper, B., Fox, N. C., Lemere, C. A., Ringman, J. M., Salloway, S., Sperling, R. A., Windisch, M., & Xiong, C. (2011). Autosomal-dominant Alzheimer's disease: a review and proposal for the prevention of Alzheimer's disease. *Alzheimer's research & therapy*, 3(1), 1. <https://doi.org/10.1186/alzrt59>

Bayer, T. A., Cappai, R., Masters, C. L., Beyreuther, K., & Multhaup, G. (1999). It all sticks together--the APP-related family of proteins and Alzheimer's disease. *Molecular psychiatry*, 4(6), 524–528. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000552>

Beattie, E. C., Stellwagen, D., Morishita, W., Bresnahan, J. C., Ha, B. K., Von Zastrow, M., Beattie, M. S., & Malenka, R. C. (2002). Control of synaptic strength by glial TNF $\alpha$ . *Science* (New York, N.Y.), 295(5563), 2282–2285. <https://doi.org/10.1126/science.1067859>

Bélanger, M., Allaman, I., & Magistretti, P. J. (2011). Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell metabolism*, 14(6), 724–738. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.016>

Belfiore, R., Rodin, A., Ferreira, E., Velázquez, R., Branca, C., Caccamo, A., & Oddo, S. (2019). Temporal and regional progression of Alzheimer's disease-like pathology in 3xTg-AD mice. *Aging cell*, 18(1), e12873. <https://doi.org/10.1111/acel.12873>

Bell, R. D., Winkler, E. A., Sagare, A. P., Singh, I., LaRue, B., Deane, R., & Zlokovic, B. V. (2010). Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron*, 68(3), 409–427. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.043>

Bianco, F., Pravettoni, E., Colombo, A., Schenk, U., Möller, T., Matteoli, M., & Verderio, C. (2005). Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 174(11), 7268–7277. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.11.7268>

Blanco-Suárez, E., Caldwell, A. L., & Allen, N. J. (2017). Role of astrocyte-synapse interactions in CNS disorders. *The Journal of physiology*, 595(6), 1903–1916. <https://doi.org/10.1113/JP270988>

Brenner, M., & Messing, A. (2021). Regulation of GFAP Expression. *ASN neuro*, 13, 1759091420981206. <https://doi.org/10.1177/1759091420981206>

Brown, A. M., & Ransom, B. R. (2007). Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*, 55(12), 1263–1271. <https://doi.org/10.1002/glia.20557>



Brown, G. C., & Neher, J. J. (2014). Microglial phagocytosis of live neurons. *Nature reviews. Neuroscience*, 15(4), 209–216. <https://doi.org/10.1038/nrn3710>

Bu G. (2009). Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy. *Nature reviews. Neuroscience*, 10(5), 333–344. <https://doi.org/10.1038/nrn2620>

Cameron, R. S., & Rakic, P. (1991). Glial cell lineage in the cerebral cortex: a review and synthesis. *Glia*, 4(2), 124–137. <https://doi.org/10.1002/glia.440040204>

Butovsky, O., Jedrychowski, M. P., Moore, C. S., Cialic, R., Lanser, A. J., Gabriely, G., Koeglsperger, T., Dake, B., Wu, P. M., Doykan, C. E., Fanek, Z., Liu, L., Chen, Z., Rothstein, J. D., Ransohoff, R. M., Gygi, S. P., Antel, J. P., & Weiner, H. L. (2014). Identification of a unique TGF- $\beta$ -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nature neuroscience*, 17(1), 131–143. <https://doi.org/10.1038/nn.3599>

Cai, Y., Liu, J., Wang, B., Sun, M., & Yang, H. (2022). Microglia in the Neuroinflammatory Pathogenesis of Alzheimer's disease and Related Therapeutic Targets. *Frontiers in immunology*, 13, 856376. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.856376>

Chaboub, L. S., & Deneen, B. (2013). Astrocyte form and function in the developing central nervous system. *Seminars in pediatric neurology*, 20(4), 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2013.10.003>

Chao M. V. (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nature reviews. Neuroscience*, 4(4), 299–309. <https://doi.org/10.1038/nrn1078>

Chavakis, T., Bierhaus, A., & Nawroth, P. P. (2004). RAGE (receptor for advanced glycation end products) : a central player in the inflammatory response. *Microbes and infection*, 6 (13), 1219 – 1225. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.08.004>

Chen, W. J., Goldstein, J. L., & Brown, M. S. (1990). NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *The Journal of biological chemistry*, 265(6), 3116–3123.

Chiarini, A., Armato, U., Hu, P., & Dal Prà, I. (2020). Danger-Sensing/Patten Recognition Receptors and Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *International journal of molecular sciences*, 21(23), 9036. <https://doi.org/10.3390/ijms21239036>

Christopherson, K. S., Ullian, E. M., Stokes, C. C., Mallowney, C. E., Hell, J. W., Agah, A., Lawler, J., Mosher, D. F., Bornstein, P., & Barres, B. A. (2005). Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell*, 120(3), 421–433. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.020>

Chuang, K. A., Li, M. H., Lin, N. H., Chang, C. H., Lu, I. H., Pan, I. H., Takahashi, T., Perng, M. D., & Wen, S. F. (2017). Rhinacanthin C Alleviates Amyloid- $\beta$  Fibrils' Toxicity on Neurons and Attenuates Neuroinflammation Triggered by LPS, Amyloid- $\beta$ , and Interferon- $\gamma$  in Glial Cells. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 5414297. <https://doi.org/10.1155/2017/5414297>

Chun, H., Marriott, I., Lee, C. J., & Cho, H. (2018). Elucidating the Interactive Roles of Glia in Alzheimer's disease Using Established and Newly Developed Experimental Models. *Frontiers in neurology*, 9, 797. <https://doi.org/10.3389/fneur.2018.00797>

Coburger, I., Dahms, S. O., Roeser, D., Gührs, K. H., Hortschansky, P., & Than, M. E. (2013). Analysis of the overall structure of the multi-domain amyloid precursor protein (APP). *PloS one*, 8(12), e81926. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081926>

Coburger, I., Hoefgen, S., & Than, M. E. (2014). The structural biology of the amyloid precursor protein APP - a complex puzzle reveals its multi-domain architecture. *Biological chemistry*, 395(5), 485–498. <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0280>

Cornell-Bell, A. H., Finkbeiner, S. M., Cooper, M. S., & Smith, S. J. (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 247(4941), 470–473. <https://doi.org/10.1126/science.1967852>

Cornejo, F., Vruwink, M., Metz, C., Muñoz, P., Salgado, N., Poblete, J., Andrés, M. E., Eugénín, J., & von Bernhardi, R. (2018). Scavenger Receptor-A deficiency impairs immune response of microglia and astrocytes potentiating Alzheimer's disease pathophysiology. *Brain, behavior, and immunity*, 69, 336–350. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.12.007>

Crehan, H., Hardy, J., & Pocock, J. (2012). Microglia, Alzheimer's disease, and complement. *International journal of Alzheimer's disease*, 2012, 983640. <https://doi.org/10.1155/2012/983640>

Davis, B. M., Salinas-Navarro, M., Cordeiro, M. F., Moons, L., & De Groef, L. (2017). Characterizing microglia activation: a spatial statistics approach to maximize information extraction. *Scientific reports*, 7(1), 1576. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01747-8>

Deane, R., Bell, R. D., Sagare, A., & Zlokovic, B. V. (2009). Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS & neurological disorders drug targets*, 8(1), 16–30. <https://doi.org/10.2174/187152709787601867>

Deczkowska, A., Keren-Shaul, H., Weiner, A., Colonna, M., Schwartz, M., & Amit, I. (2018). Disease-Associated Microglia: A Universal Immune Sensor of Neurodegeneration. *Cell*, 173(5), 1073–1081. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.003>

Doens, D., & Fernández, P. L. (2014). Microglia receptors and their implications in the response to amyloid  $\beta$  for Alzheimer's disease pathogenesis. *Journal of neuroinflammation*, 11, 48. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-48>

Eckman, E. A., Watson, M., Marlow, L., Sambamurti, K., & Eckman, C. B. (2003). Alzheimer's disease beta-amyloid peptide is increased in mice deficient in

endothelin-converting enzyme. *The Journal of biological chemistry*, 278(4), 2081–2084. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200642200>

Ennerfelt, HE, Lukens, JR. (2020). The role of innate immunity in Alzheimer's disease. *Immunol Rev.* 00: 1– 22. <https://doi.org/10.1111/imr.12896>

Emsley, J., & Macklis, J. (2006). Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron Glia Biology*, 2(3), 175-186. Doi: 10.1017/S1740925X06000202

Eroglu, C., Allen, NJ, Susman, MW, O'Rourke, NA, Park, CY, Ozkan, E., Chakraborty, C., Mulinyawe, SB, Annis, DS, Huberman, AD, Green, EM, Lawler, J., Dolmetsch, R., García, KC, Smith, SJ, Luo, ZD, Rosenthal, A., Mosher, DF y Barres, BA (2009). El receptor de gabapentina alfa2delta-1 es un receptor de trombospondina neuronal responsable de la sinaptogénesis excitadora del SNC. *Cell*, 139 (2), 380–392. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.025>

Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., Steinhäuser, C., Volterra, A., Carmignoto, G., Agarwal, A., Allen, N. J., Araque, A., Barbeito, L., Barzilai, A., Bergles, D. E., Bonvento, G., Butt, A. M., Chen, W. T., Cohen-Salmon, M., Cunningham, C., ... Verkhratsky, A. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nature neuroscience*, 24(3), 312–325. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00783-4>

Esquerda-Canals, G., Montoliu-Gaya, L., Güell-Bosch, J., & Villegas, S. (2017). Mouse Models of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 57(4), 1171–1183. <https://doi.org/10.3233/JAD-170045>

Falkowska, A., Gutowska, I., Goschorska, M., Nowacki, P., Chlubek, D., & Baranowska-Bosiacka, I. (2015). Energy Metabolism of the Brain, Including the Cooperation between Astrocytes and Neurons, Especially in the Context of Glycogen Metabolism. *International journal of molecular sciences*, 16(11), 25959–25981. <https://doi.org/10.3390/ijms161125939>

Falsig, J., van Beek, J., Hermann, C., & Leist, M. (2008). Molecular basis for detection of invading pathogens in the brain. *Journal of neuroscience research*, 86(7), 1434–1447. <https://doi.org/10.1002/jnr.21590>

Ferraiuolo, L., Higginbottom, A., Heath, P. R., Barber, S., Greenald, D., Kirby, J., & Shaw, P. J. (2011). Dysregulation of astrocyte-motoneuron cross-talk in mutant superoxide dismutase 1-related amyotrophic lateral sclerosis. *Brain: a journal of neurology*, 134(Pt 9), 2627–2641. <https://doi.org/10.1093/brain/awr193>

Fisher, D. W., Bennett, D. A., & Dong, H. (2018). Sexual dimorphism in predisposition to Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 70, 308–324. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.04.004>

Food and Drug Administration (2023). Drugs@FDA: FDA-Approved Drugs. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm>

Frade, J. M., & Barde, Y. A. (1998). Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. *Neuron*, 20(1), 35–41. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80432-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80432-8)

Franklin, H., Clarke, B. E., & Patani, R. (2021). Astrocytes and microglia in neurodegenerative diseases: Lessons from human in vitro models. *Progress in neurobiology*, 200, 101973. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101973>

Frautschy, S. A., Yang, F., Irrizarry, M., Hyman, B., Saido, T. C., Hsiao, K., & Cole, G. M. (1998). Microglial response to amyloid plaques in APP<sup>sw</sup> transgenic mice. *The American journal of pathology*, 152(1), 307–317.

Freeman M. R. (2010). Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6005), 774–778. <https://doi.org/10.1126/science.1190928>

Frost, J. L., & Schafer, D. P. (2016). Microglia: Architects of the Developing Nervous System. *Trends in cell biology*, 26(8), 587–597. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.02.006>

Fuhrmann, M., Bittner, T., Jung, C. K., Burgold, S., Page, R. M., Mitteregger, G., Haass, C., LaFerla, F. M., Kretschmar, H., & Herms, J. (2010). Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature neuroscience*, 13(4), 411–413. <https://doi.org/10.1038/nn.2511>

Gandy S. (2005). The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *The Journal of clinical investigation*, 115(5), 1121–1129. <https://doi.org/10.1172/JCI25100>

Gertsik, N., Chiu, D., & Li, Y. M. (2015). Complex regulation of  $\gamma$ -secretase: from obligatory to modulatory subunits. *Frontiers in aging neuroscience*, 6, 342. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00342>

Glenner, G. G., & Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and biophysical research communications*, 120(3), 885–890. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(84\)80190-4](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(84)80190-4)

Ginhoux, F., & Guilliams, M. (2016). Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*, 44(3), 439–449. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.024>

Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M., & Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6005), 841–845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>

Gonçalves, C. A., Leite, M. C., & Nardin, P. (2008). Biological and methodological features of the measurement of S100B, a putative marker of brain injury. *Clinical biochemistry*, 41(10-11), 755–763. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.04.003>

González-Reyes, R. E., Nava-Mesa, M. O., Vargas-Sánchez, K., Ariza-Salamanca, D., & Mora-Muñoz, L. (2017). Involvement of Astrocytes in Alzheimer's disease from

a Neuroinflammatory and Oxidative Stress Perspective. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 427. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00427>

Guillamón-Vivancos, T., Gómez-Pinedo, U., & Matías-Guiu, J. (2015). Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): function and molecular description. *Neurologia (Barcelona, Spain)*, 30(2), 119–129. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2012.12.007>

Guillot-Sestier, M. V., Araiz, A. R., Mela, V., Gaban, A. S., O'Neill, E., Joshi, L., Chouchani, E. T., Mills, E. L., & Lynch, M. A. (2021). Microglial metabolism is a pivotal factor in sexual dimorphism in Alzheimer's disease. *Communications biology*, 4(1), 711. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02259-y>

Healy, L. M., Perron, G., Won, S. Y., Michell-Robinson, M. A., Rezk, A., Ludwin, S. K., Moore, C. S., Hall, J. A., Bar-Or, A., & Antel, J. P. (2016). MerTK Is a Functional Regulator of Myelin Phagocytosis by Human Myeloid Cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 196(8), 3375–3384. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502562>

Hamelin, L., Lagarde, J., Dorothée, G., Leroy, C., Labit, M., Comley, R. A., de Souza, L. C., Corne, H., Dauphinot, L., Bertoux, M., Dubois, B., Gervais, P., Colliot, O., Potier, M. C., Bottlaender, M., Sarazin, M., & Clinical IMABio3 team (2016). Early and protective microglial activation in Alzheimer's disease: a prospective study using 18F-DPA-714 PET imaging. *Brain: a journal of neurology*, 139(Pt 4), 1252–1264. <https://doi.org/10.1093/brain/aww017>

Hammond, T. R., Dufort, C., Dissing-Olesen, L., Giera, S., Young, A., Wysoker, A., Walker, A. J., Gergits, F., Segel, M., Nemesh, J., Marsh, S. E., Saunders, A., Macosko, E., Ginhoux, F., Chen, J., Franklin, R., Piao, X., McCarroll, S. A., & Stevens, B. (2019). Single-Cell RNA Sequencing of Microglia throughout the Mouse Lifespan and in the Injured Brain Reveals Complex Cell-State Changes. *Immunity*, 50(1), 253–271.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.11.004>

Hansen, D. V., Hanson, J. E., & Sheng, M. (2018). Microglia in Alzheimer's disease. *The Journal of cell biology*, 217(2), 459–472. <https://doi.org/10.1083/jcb.201709069>

Han, X., Zhang, T., Liu, H., Mi, Y., & Gou, X. (2020). Astrocyte Senescence and Alzheimer's disease: A Review. *Frontiers in aging neuroscience*, 12, 148. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00148>

Harada, K., Kamiya, T., & Tsuboi, T. (2016). Gliotransmitter Release from Astrocytes: Functional, Developmental, and Pathological Implications in the Brain. *Frontiers in neuroscience*, 9, 499. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00499>

Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science (New York, N.Y.)*, 256(5054), 184–185. <https://doi.org/10.1126/science.1566067>

Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G. C., ... Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet. Neurology*, 14(4), 388–405. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)70016-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)70016-5)

Henstridge, C. M., Hyman, B. T., & Spires-Jones, T. L. (2019). Beyond the neuron-cellular interactions early in Alzheimer disease pathogenesis. *Nature reviews. Neuroscience*, 20(2), 94–108. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0113-1>

Herculano-Houzel S. (2014). The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia*, 62(9), 1377–1391. <https://doi.org/10.1002/glia.22683>

Hickman, S. E., Kingery, N. D., Ohsumi, T. K., Borowsky, M. L., Wang, L. C., Means, T. K., & El Khoury, J. (2013). The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nature neuroscience*, 16(12), 1896–1905. <https://doi.org/10.1038/nn.3554>



Hickman, S., Izzy, S., Sen, P., Morsett, L., & El Khoury, J. (2018). Microglia in neurodegeneration. *Nature neuroscience*, 21(10), 1359–1369. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0242-x>

Hol, E. M., & Pekny, M. (2015). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current opinion in cell biology*, 32, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.02.004>

Hoogland, I., Westhoff, D., Engelen-Lee, J. Y., Melief, J., Valls Serón, M., Houben-Weerts, J., Huitinga, I., van Westerloo, D. J., van der Poll, T., van Gool, W. A., & van de Beek, D. (2018). Microglial Activation After Systemic Stimulation With Lipopolysaccharide and Escherichia coli. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 110. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00110>

Hong, S., Beja-Glasser, V. F., Nfonoyim, B. M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., Merry, K. M., Shi, Q., Rosenthal, A., Barres, B. A., Lemere, C. A., Selkoe, D. J., & Stevens, B. (2016). Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science (New York, N.Y.)*, 352(6286), 712–716. <https://doi.org/10.1126/science.aad8373>

Hopperton, K. E., Mohammad, D., Trépanier, M. O., Giuliano, V., & Bazinet, R. P. (2018). Markers of microglia in post-mortem brain samples from patients with Alzheimer's disease: a systematic review. *Molecular psychiatry*, 23(2), 177–198. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.246>

Hornig, S., Therattil, A., Moyon, S., Gordon, A., Kim, K., Argaw, A. T., Hara, Y., Mariani, J. N., Sawai, S., Flodby, P., Crandall, E. D., Borok, Z., Sofroniew, M. V., Chapouly, C., & John, G. R. (2017). Astrocytic tight junctions control inflammatory CNS lesion pathogenesis. *The Journal of clinical investigation*, 127(8), 3136–3151. <https://doi.org/10.1172/JCI91301>

Huang, Y., Li, S. N., Zhou, X. Y., Zhang, L. X., Chen, G. X., Wang, T. H., Xia, Q. J., Liang, N., & Zhang, X. (2019). The Dual Role of AQP4 in Cytotoxic and Vasogenic Edema Following Spinal Cord Contusion and Its Possible Association With Energy

Metabolism via COX5A. *Frontiers in neuroscience*, 13, 584.  
<https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00584>

Huse, J. T., Pijak, D. S., Leslie, G. J., Lee, V. M., & Doms, R. W. (2000). Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *The Journal of biological chemistry*, 275(43), 33729–33737. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004175200>

Imai, Y., Ibata, I., Ito, D., Ohsawa, K., & Kohsaka, S. (1996). A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochemical and biophysical research communications*, 224(3), 855–862. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1112>

Ji, R. R., Xu, Z. Z., & Gao, Y. J. (2014). Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. *Nature reviews. Drug discovery*, 13(7), 533–548. <https://doi.org/10.1038/nrd4334>

Jung, Y. J., & Chung, W. S. (2018). Phagocytic Roles of Glial Cells in Healthy and Diseased Brains. *Biomolecules & therapeutics*, 26(4), 350–357. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2017.133>

Jurga, A. M., Paleczna, M., & Kuter, K. Z. (2020). Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Frontiers in cellular neuroscience*, 14, 198. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00198>

Keren-Shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-Natan, O., Dvir-Szternfeld, R., Ulland, T. K., David, E., Baruch, K., Lara-Astaiso, D., Toth, B., Itzkovitz, S., Colonna, M., Schwartz, M., & Amit, I. (2017). A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell*, 169(7), 1276–1290.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.018>

Karran, E., & De Strooper, B. (2016). The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *Journal of neurochemistry*, 139 Suppl 2, 237–252. <https://doi.org/10.1111/jnc.13632>

Katsumoto, A., Lu, H., Miranda, A. S., & Ransohoff, R. M. (2014). Ontogeny and functions of central nervous system macrophages. *Journal of immunology* (Baltimore, Md: 1950), 193(6), 2615–2621. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400716>

Kaushal, V., Dye, R., Pakavathkumar, P., Foveau, B., Flores, J., Hyman, B., Ghetti, B., Koller, B. H., & LeBlanc, A. C. (2015). Neuronal NLRP1 inflammasome activation of Caspase-1 coordinately regulates inflammatory interleukin-1-beta production and axonal degeneration-associated Caspase-6 activation. *Cell death and differentiation*, 22(10), 1676–1686. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.16>

Kettenmann, H., Kirchhoff, F., & Verkhratsky, A. (2013). Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron*, 77(1), 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.023>

Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiological reviews*, 91(2), 461–553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>

Kettenmann, H., & Verkhratsky, A. (2008). Neuroglia: the 150 years after. *Trends in neurosciences*, 31(12), 653–659. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.09.003>

Khakh, B. S., & Deneen, B. (2019). The Emerging Nature of Astrocyte Diversity. *Annual review of neuroscience*, 42, 187–207. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-070918-050443>

Khakh, B. S., & Sofroniew, M. V. (2015). Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nature neuroscience*, 18(7), 942–952. <https://doi.org/10.1038/nn.4043>

Khoury JE, Toft M, Hickman SE, Means TK, Terada K, Geula C, et al. La deficiencia de Ccr2 altera la acumulación microglial y acelera la progresión de la enfermedad similar a la de Alzheimer. *Nat Med*. 2007; 13: 432–8.

Kimberly, W. T., Zheng, J. B., Guénette, S. Y., & Selkoe, D. J. (2001). The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. *The Journal of biological chemistry*, 276(43), 40288–40292. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100447200>

Kimelberg H. K. (2004). The problem of astrocyte identity. *Neurochemistry international*, 45(2-3), 191–202. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2003.08.015>

Krabbe, G., Halle, A., Matyash, V., Rinnenthal, J. L., Eom, G. D., Bernhardt, U., Miller, K. R., Prokop, S., Kettenmann, H., & Heppner, F. L. (2013). Functional impairment of microglia coincides with Beta-amyloid deposition in mice with Alzheimer-like pathology. *PloS one*, 8(4), e60921. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060921>

Kraft, A. W., Hu, X., Yoon, H., Yan, P., Xiao, Q., Wang, Y., Gil, S. C., Brown, J., Wilhelmsson, U., Restivo, J. L., Cirrito, J. R., Holtzman, D. M., Kim, J., Pekny, M., & Lee, J. M. (2013). Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP/PS1 mice. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27(1), 187–198. <https://doi.org/10.1096/fj.12-208660>

Kreutzberg G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences*, 19(8), 312–318. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(96\)10049-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(96)10049-7)

Kvamme, E., Roberg, B., & Torgner, I. A. (2000). Phosphate-activated glutaminase and mitochondrial glutamine transport in the brain. *Neurochemical research*, 25(9-10), 1407–1419. <https://doi.org/10.1023/a:1007668801570>

Jacobsen, K. T., & Iverfeldt, K. (2009). Amyloid precursor protein and its homologues: a family of proteolysis-dependent receptors. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 66(14), 2299–2318. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0020-8>

Kriegstein, A., & Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual review of neuroscience*, 32, 149–184. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135600>

Lane, C. A., Hardy, J., & Schott, J. M. (2018). Alzheimer's disease. *European journal of neurology*, 25(1), 59–70. <https://doi.org/10.1111/ene.13439>

Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P., & Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 39(1), 151–170. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90229-w](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90229-w)

Lee, C. Y., & Landreth, G. E. (2010). The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 117(8), 949–960. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0433-4>

Ledo, J. H., Liebmann, T., Zhang, R., Chang, J. C., Azevedo, E. P., Wong, E., Silva, H. M., Troyanskaya, O. G., Bustos, V., & Greengard, P. (2020). Presenilin 1 phosphorylation regulates amyloid- $\beta$  degradation by microglia. *Molecular psychiatry*, 10.1038/s41380-020-0856-8. Advance online publication. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0856-8>

Lehrman, E. K., Wilton, D. K., Litvina, E. Y., Welsh, C. A., Chang, S. T., Frouin, A., Walker, A. J., Heller, M. D., Umemori, H., Chen, C., & Stevens, B. (2018). CD47 Protects Synapses from Excess Microglia-Mediated Pruning during Development. *Neuron*, 100(1), 120–134.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.09.017>

Leng, F., & Edison, P. (2021). Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nature reviews. Neurology*, 17(3), 157–172. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y>

Liddel, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Münch, A. E., Chung, W. S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D.

H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Stevens, B., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), 481–487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>

Li, K., Li, J., Zheng, J., & Qin, S. (2019). Reactive Astrocytes in Neurodegenerative Diseases. *Aging and disease*, 10(3), 664–675. <https://doi.org/10.14336/AD.2018.0720>

Li, Q., & Barres, B. A. (2018). Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nature reviews. Immunology*, 18(4), 225–242. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.125>

Li, T., Chen, X., Zhang, C., Zhang, Y., & Yao, W. (2019). An update on reactive astrocytes in chronic pain. *Journal of neuroinflammation*, 16(1), 140. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1524-2>

Li, X., Li, M., Tian, L., Chen, J., Liu, R., & Ning, B. (2020). Reactive Astrogliosis: Implications in Spinal Cord Injury Progression and Therapy. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020, 9494352. <https://doi.org/10.1155/2020/9494352>

Li, Y., Du, X. F., Liu, C. S., Wen, Z. L., & Du, J. L. (2012). Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo. *Developmental cell*, 23(6), 1189–1202. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.10.027>

Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Münch, A. E., Chung, W. S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Stevens, B., ... Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), 481–487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>

Liddelow, S. A., & Barres, B. A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*, 46(6), 957–967. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006>

Lier, J., Streit, W. J., & Bechmann, I. (2021). Beyond Activation: Characterizing Microglial Functional Phenotypes. *Cells*, 10(9), 2236. <https://doi.org/10.3390/cells10092236>

Lue, L. F., Walker, D. G., Brachova, L., Beach, T. G., Rogers, J., Schmidt, A. M., Stern, D. M., & Yan, S. D. (2001). Involvement of microglial receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) in Alzheimer's disease: identification of a cellular activation mechanism. *Experimental neurology*, 171(1), 29–45. <https://doi.org/10.1006/exnr.2001.7732>

Matejuk, A., & Ransohoff, R. M. (2020). Crosstalk between Astrocytes and Microglia: An Overview. *Frontiers in immunology*, 11, 1416. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01416>

Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., & Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(12), 4245–4249. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.12.4245>

Messing, A., & Brenner, M. (2020). GFAP at 50. *ASN neuro*, 12, 1759091420949680. <https://doi.org/10.1177/1759091420949680>

Minter, M. R., Taylor, J. M., & Crack, P. J. (2016). The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 136(3), 457–474. <https://doi.org/10.1111/jnc.13411>

Mittelbronn, M., Dietz, K., Schluessener, H. J., & Meyermann, R. (2001). Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta neuropathologica*, 101(3), 249–255. <https://doi.org/10.1007/s004010000284>

Monier, A., Evrard, P., Gressens, P., & Verney, C. (2006). Distribution and differentiation of microglia in the human encephalon during the first two trimesters of gestation. *The Journal of comparative neurology*, 499(4), 565–582. <https://doi.org/10.1002/cne.21123>

Morris, A. W., Carare, R. O., Schreiber, S., & Hawkes, C. A. (2014). The Cerebrovascular Basement Membrane: Role in the Clearance of  $\beta$ -amyloid and Cerebral Amyloid Angiopathy. *Frontiers in aging neuroscience*, 6, 251. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00251>

Norenberg M. D. (1979). Distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 27(3), 756–762. <https://doi.org/10.1177/27.3.39099>

Oberheim, N. A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J. H., Wang, F., Xu, Q., Wyatt, J. D., Pilcher, W., Ojemann, J. G., Ransom, B. R., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2009). Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(10), 3276–3287. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4707-08.2009>

Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y., & LaFerla, F. M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39(3), 409–421. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00434-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00434-3)

O'Shea, T. M., Burda, J. E., & Sofroniew, M. V. (2017). Cell biology of spinal cord injury and repair. *The Journal of clinical investigation*, 127(9), 3259–3270. <https://doi.org/10.1172/JCI90608>

Pannasch, U., & Rouach, N. (2013). Emerging role for astroglial networks in information processing: from synapse to behavior. *Trends in neurosciences*, 36(7), 405–417. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.04.004>

Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T. A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D., & Gross, C. T. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6048), 1456–1458. <https://doi.org/10.1126/science.1202529>



Parkhurst, C. N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J. N., Yates, J. R., 3rd, Lafaille, J. J., Hempstead, B. L., Littman, D. R., & Gan, W. B. (2013). Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*, 155(7), 1596–1609. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.030>

Pekny, M., & Pekna, M. (2004). Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *The Journal of pathology*, 204(4), 428–437. <https://doi.org/10.1002/path.1645>

Perlmutter, L. S., Barron, E., & Chui, H. C. (1990). Morphologic association between microglia and senile plaque amyloid in Alzheimer's disease. *Neuroscience letters*, 119(1), 32–36. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(90\)90748-x](https://doi.org/10.1016/0304-3940(90)90748-x)

Phelps C. H. (1972). Barbiturate-induced glycogen accumulation in brain. An electron microscopic study. *Brain research*, 39(1), 225–234. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(72\)90797-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(72)90797-4)

Pinto-Benito, D., Paradela-Leal, C., Ganchala, D., de Castro-Molina, P., & Arevalo, M. A. (2022). IGF-1 regulates astrocytic phagocytosis and inflammation through the p110 $\alpha$  isoform of PI3K in a sex-specific manner. *Glia*, 70(6), 1153–1169. <https://doi.org/10.1002/glia.24163>

Porchet, R., Probst, A., Bouras, C., Dráberová, E., Dráber, P., & Riederer, B. M. (2003). Analysis of glial acidic fibrillary protein in the human entorhinal cortex during aging and in Alzheimer's disease. *Proteomics*, 3(8), 1476–1485. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300456>

Pósfai, B., Cserép, C., Orsolits, B., & Dénes, Á. (2019). New Insights into Microglia-Neuron Interactions: A Neuron's Perspective. *Neuroscience*, 405, 103–117. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.04.046>

Prinz, M., Jung, S., & Priller, J. (2019). Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell*, 179(2), 292–311. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.053>

Puzzo, D., Gulisano, W., Palmeri, A., & Arancio, O. (2015). Rodent models for Alzheimer's disease drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*, 10(7), 703–711. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.1041913>

Quintana F. J. (2017). Astrocytes to the rescue! Glia limitans astrocytic endfeet control CNS inflammation. *The Journal of clinical investigation*, 127(8), 2897–2899. <https://doi.org/10.1172/JCI95769>

Ransohoff, R. M., & Cardona, A. E. (2010). The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature*, 468(7321), 253–262. <https://doi.org/10.1038/nature09615>

Ransohoff, R. M., & El Khoury, J. (2015). Microglia in Health and Disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(1), a020560. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020560>

Ransohoff R. M. (2016). A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist?. *Nature neuroscience*, 19(8), 987–991. <https://doi.org/10.1038/nn.4338>

Reinhard, C., Hébert, S. S., & De Strooper, B. (2005). The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function. *The EMBO journal*, 24(23), 3996–4006. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600860>

Riedel, B. C., Thompson, P. M., & Brinton, R. D. (2016). Age, APOE and sex: Triad of risk of Alzheimer's disease. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 160, 134–147. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.03.012>

Ries, M., & Sastre, M. (2016). Mechanisms of A $\beta$  Clearance and Degradation by Glial Cells. *Frontiers in aging neuroscience*, 8, 160. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00160>

Rogers, J. T., Morganti, J. M., Bachstetter, A. D., Hudson, C. E., Peters, M. M., Grimmig, B. A., Weeber, E. J., Bickford, P. C., & Gemma, C. (2011). CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for*

Neuroscience, 31(45), 16241–16250. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3667-11.2011>

Rodgers, K.R., Lin, Y., Langan, T.J. et al. Innate Immune Functions of Astrocytes are Dependent Upon Tumor Necrosis Factor-Alpha. *Sci Rep* **10**, 7047 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63766-2>

Root-Bernstein R. (2020). Synergistic Activation of Toll-Like and NOD Receptors by Complementary Antigens as Facilitators of Autoimmune Disease: Review, Model and Novel Predictions. *International journal of molecular sciences*, 21(13), 4645. <https://doi.org/10.3390/ijms21134645>

Rowland, H. A., Hooper, N. M., & Kellett, K. (2018). Modelling Sporadic Alzheimer's Disease Using Induced Pluripotent Stem Cells. *Neurochemical research*, 43(12), 2179–2198. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2663-z>

Gomez-Nicola, D., & Perry, V. H. (2015). Microglial dynamics and role in the healthy and diseased brain: a paradigm of functional plasticity. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 21(2), 169–184. <https://doi.org/10.1177/1073858414530512>

Saijo, K., & Glass, C. K. (2011). Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nature reviews. Immunology*, 11(11), 775–787. <https://doi.org/10.1038/nri3086>

Sandbrink, R., Masters, C. L., & Beyreuther, K. (1996). APP gene family. Alternative splicing generates functionally related isoforms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 777, 281–287. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1996.tb34433.x>

Santello, M., Toni, N., & Volterra, A. (2019). Astrocyte function from information processing to cognition and cognitive impairment. *Nature neuroscience*, 22(2), 154–166. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0325-8>

Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., Ransohoff, R. M., Greenberg, M. E., Barres, B. A., & Stevens, B.

(2012). Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*, 74(4), 691–705.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>

Schafer, D. P., & Stevens, B. (2015). Microglia Function in Central Nervous System Development and Plasticity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7 (10), a020545. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020545>

Secretaría de Salud, Gobierno de México. 2022. Enfermedad de Alzheimer, demencia más común que afecta a personas adultas mayores. <https://www.gob.mx/salud>

Selkoe D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological reviews*, 81(2), 741–766.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.741>

Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO molecular medicine*, 8(6), 595–608.  
<https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>

Shi, Y., & Holtzman, D. M. (2018). Interplay between innate immunity and Alzheimer disease: APOE and TREM2 in the spotlight. *Nature reviews. Immunology*, 18(12), 759–772. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0051-1>

Shigeri, Y., Seal, R. P., & Shimamoto, K. (2004). Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain research. Brain research reviews*, 45(3), 250–265. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.04.004>

Small, S. A., & Gandy, S. (2006). Sorting through the cell biology of Alzheimer's disease: intracellular pathways to pathogenesis. *Neuron*, 52(1), 15–31.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.001>

Sofroniew M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in neurosciences*, 32(12), 638–647.  
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002>

Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119(1), 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>

Sofroniew M. V. (2015). Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nature reviews. Neuroscience*, 16(5), 249–263. <https://doi.org/10.1038/nrn3898>

Solito, E., & Sastre, M. (2012). Microglia function in Alzheimer's disease. *Frontiers in pharmacology*, 3, 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00014>

Song, W. M., & Colonna, M. (2018). The identity and function of microglia in 'neurodegeneration. *Nature immunology*, 19(10), 1048–1058. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0212-1>

Sosunov, A. A., Wu, X., Tsankova, N. M., Guilfoyle, E., McKhann, G. M., 2nd, & Goldman, J. E. (2014). Phenotypic heterogeneity and plasticity of isocortical and hippocampal astrocytes in the human brain. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 34(6), 2285–2298. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4037-13.2014>

Stellwagen, D., Beattie, E. C., Seo, J. Y., & Malenka, R. C. (2005). Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(12), 3219–3228. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4486-04.2005>

Schwabe, T., Srinivasan, K., & Rhinn, H. (2020). Shifting paradigms: The central role of microglia in Alzheimer's disease. *Neurobiology of disease*, 143, 104962. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104962>

Szepesi, Z., Manouchehrian, O., Bachiller, S., & Deierborg, T. (2018). Bidirectional Microglia-Neuron Communication in Health and Disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 323. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00323>

Tabata H. (2015). Diverse subtypes of astrocytes and their development during corticogenesis. *Frontiers in neuroscience*, 9, 114. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00114>

Thinakaran Gopal and Koo Edward H. (2008). Amyloid Precursor Protein Trafficking, Processing, and Function. *Journal of Biological Chemistry*. Volume 283, Number 44.

Traub L. M. (2005). Common principles in clathrin-mediated sorting at the Golgi and the plasma membrane. *Biochimica et biophysica acta*, 1744(3), 415–437. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2005.04.005>

Town, T., Nikolic, V., & Tan, J. (2005). The microglial "activation" continuum: from innate to adaptive responses. *Journal of neuroinflammation*, 2, 24. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-2-24>

Uddin, M. S., Kabir, M. T., Jalouli, M., Rahman, M. A., Jeandet, P., Behl, T., Alexiou, A., Albadrani, G. M., Abdel-Daim, M. M., Perveen, A., & Ashraf, G. M. (2022). Neuroinflammatory Signaling in the Pathogenesis of Alzheimer's disease. *Current neuropharmacology*, 20(1), 126–146. <https://doi.org/10.2174/1570159X19666210826130210>

Uddin, M. S., Kabir, M. T., Rahman, M. S., Behl, T., Jeandet, P., Ashraf, G. M., Najda, A., Bin-Jumah, M. N., El-Seedi, H. R., & Abdel-Daim, M. M. (2020). Revisiting the Amyloid Cascade Hypothesis: From Anti-A $\beta$  Therapeutics to Auspicious New Ways for Alzheimer's disease. *International journal of molecular sciences*, 21(16), 5858. <https://doi.org/10.3390/ijms21165858>

Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M., & Yamashita, T. (2013). Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nature neuroscience*, 16(5), 543–551. <https://doi.org/10.1038/nn.3358>

United Nations Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2022). *World Population Prospects 2022: Summary of Results*.

[https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/wpp2022\\_summary\\_of\\_results.pdf](https://www.un.org/development/desa/pd/sites/www.un.org.development.desa.pd/files/wpp2022_summary_of_results.pdf)

Uwechue, N. M., Marx, M. C., Chevy, Q., & Billups, B. (2012). Activation of glutamate transport evokes rapid glutamine release from perisynaptic astrocytes. *The Journal of physiology*, 590(10), 2317–2331. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.226605>

Van Eldik, L. J., Thompson, W. L., Ralay Ranaivo, H., Behanna, H. A., & Martin Watterson, D. (2007). Glia proinflammatory cytokine upregulation as a therapeutic target for neurodegenerative diseases: function-based and target-based discovery approaches. *International review of neurobiology*, 82, 277–296. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(07\)82015-0](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(07)82015-0)

Vasile, F., Dossi, E., & Rouach, N. (2017). Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain structure & function*, 222(5), 2017–2029. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1383-5>

Venegas, C., Kumar, S., Franklin, B. S., Dierkes, T., Brinkschulte, R., Tejera, D., Vieira-Saecker, A., Schwartz, S., Santarelli, F., Kummer, M. P., Griep, A., Gelpi, E., Beilharz, M., Riedel, D., Golenbock, D. T., Geyer, M., Walter, J., Latz, E., & Heneka, M. T. (2017). Microglia-derived ASC specks cross-seed amyloid- $\beta$  in Alzheimer's disease. *Nature*, 552(7685), 355–361. <https://doi.org/10.1038/nature25158>

Ventura, R., & Harris, K. M. (1999). Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(16), 6897–6906. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-16-06897.1999>

Verkhatsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of Astroglia. *Physiological reviews*, 98(1), 239–389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>

Wang, Y., Szretter, K. J., Vermi, W., Gilfillan, S., Rossini, C., Cella, M., Barrow, A. D., Diamond, M. S., & Colonna, M. (2012). IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nature immunology*, 13(8), 753–760. <https://doi.org/10.1038/ni.2360>

Wang, W. Y., Tan, M. S., Yu, J. T., & Tan, L. (2015). Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. *Annals of translational medicine*, 3 (10), 136. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.03.49>

Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J. F., Tanzi, R. E., & Solomon, F. (1992). Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(22), 10758–10762. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.22.10758>

Wilkins, H. M., & Swerdlow, R. H. (2017). Amyloid precursor protein processing and bioenergetics. *Brain research bulletin*, 133, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.009>

WHO (2017). Global action plan on the public health response to dementia 2017–2025. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259615/?sequence=1>

WHO (2022). Fact sheets: Dementia. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>

Zamanian J. L., Xu L., Foo L. C., Nouri N., Zhou Lu, Giffard R. G. and Barres B. A. (2012). Genomic analysis of reactive astrogliosis. *Journal of Neuroscience* 32 (18), 6391–6410. Doi: 10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012.

Zhang, Y. W., Thompson, R., Zhang, H., & Xu, H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular brain*, 4, 3. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-3>

Zhao, J., Liu, X., Xia, W., Zhang, Y., & Wang, C. (2020). Targeting Amyloidogenic Processing of APP in Alzheimer's disease. *Frontiers in molecular neuroscience*, 13, 137. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00137>

Zheng, H., & Koo, E. H. (2006). The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Molecular neurodegeneration*, 1, 5. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-1-5>