



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

NEUROINFLAMACIÓN EN EL MODELO MURINO DE ANGIOPATÍA AMILOIDE CEREBRAL (Tg-SwDI)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

QFB ALICIA MERCEDES TORRES PANIAGUA

TUTOR PRINCIPAL

DRA. GOHAR GEVORGYAN

Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. ALIESHA A. GONZALES ARENAS

Instituto de Investigaciones Biomédicas

DRA. PERLA DEYANIRA MALDONADO

Facultad de Medicina

Ciudad de México. Octubre, 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.

Dedicatoria

A mis padres, mi hermano, Donnie quienes siempre han creído en mí, me han dado su amor y me han alentado a perseguir mis sueños académicos.

A Alejandro por su apoyo, confianza y cariño.

A todos mis seres queridos, gracias por su paciencia, comprensión y amor incondicional.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por otorgarme una beca nacional para estudios de posgrado (CVU 1149943) durante mi estancia en el Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímica de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Dra. Gohar Gevorgyan (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM), tutora principal. Agradezco sinceramente la oportunidad que me ha brindado al permitirme ingresar a su laboratorio.

Al B. Exp. Gonzalo Asariel Acero Galindo (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) por su apoyo técnico y observaciones a lo largo del proyecto.

A la Dra. Georgina Diaz Herrera (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) por la asesoría en el manejo y mantenimiento de los animales en este trabajo

A los miembros del comité tutor: Dra. Aliesha A. Gonzales Arenas (Instituto de Investigaciones Biomédicas) y la Dra. Perla Deyanira Maldonado (Facultad de Medicina) por su asesoramiento y correcciones durante la duración del trabajo.

A M. en C. Adrián Rodríguez (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) M. en C. Juan (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) por su asesoría teórica.

Al programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA-UNAM), Proyecto IN203322, Responsable: Dra. Gohar Gevorgyan

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo económico brindado para la asistencia al XXV Congreso de Inmunología.

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ABREVIATURAS	v
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	5
4. ANTECEDENTES	7
4.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	7
4.1.1 ETIOLOGÍA	7
4.1.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	9
4.1.3 PATOLOGÍA	9
4.1.3.1 Características patológicas típicas de la enfermedad	9
4.1.3.2 Atrofia cerebral	11
4.1.4 HIPÓTESIS AMILOIDE	13
4.2 ANGIOPATÍA AMILOIDE CEREBRAL	15
4.3 NEUROINFLAMACIÓN	18
4.3.1 Microglía	18
4.3.2 Astrocitos	21
4.3.3 Proteína translocadora (TSPO)	23
4.3.4 Otros mecanismos de neuroinflamación	26
4.4 MODELOS ANIMALES CON PATOLOGÍA TIPO ALZHEIMER Y AAC	27
4.4.1 PATOLOGÍA CEREBRAL EN RATONES Tg-SwDI	27
5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
6 HIPÓTESIS	30
7 OBJETIVOS	30
7.1 Objetivo General	30
7.2 Objetivos Particulares	30
8. MATERIALES Y MÉTODOS	31
8.1 Animales	31
8.2 Preparación de tejidos	32
8.3 Inmunofluorescencia	32

8.4 Cuantificación de Intensidad de Fluorescencia utilizando ROIs (Regions of Interest)	33
8.5 Análisis estadístico.	33
9. RESULTADOS	34
9.1 Delimitación de las regiones del hipocampo y del tálamo	34
9.2. Caracterización de microglía en ratones Tg-SwDI con patología conjunta tipo EA y AAC	35
9.3 Caracterización de astrocitos en ratones Tg-SwDI con patología conjunta tipo EA y AAC	43
9.4 Caracterización de TSPO en ratones Tg-SwDI con patología conjunta tipo EA y AAC	51
9.5.1 Expresión de TSPO en células de la glía de ratones Tg-SwDI	53
10. DISCUSIÓN	56
11. CONCLUSIONES	66
11.1 Conclusión General	66
11.2 Conclusiones Particulares	66
12. PERSPECTIVAS	67
13. REFERENCIAS	68
ANEXO 1. Controles secundarios	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de deposición de Aβ parenquimal y vascular.....	11
Figura 2 Esquema del patrón de producción, acumulación y degradación de Aβ en AAC y EA.....	17
Figura 3 Estructura y Función de TSPO.	24
Figura 4 Representación esquemática de la progresión de la patología en ratones Tg-SwDI.....	28
Figura 5. Selección de áreas para la cuantificación en corte coronal a -1.655 mm de Bregma.	34
Figura 6. Cambios relacionados con la edad de la presencia de microglía en ratones Tg-SwDI hembra de 3, 6, 9, 12 y 15 meses.	36
Figura 7. Cambios relacionados con la edad de la presencia de microglía en ratones Tg-SwDI macho de 3, 6, 9, 12 y 15 meses.	37
Figura 8. Respuesta de la microglía a la presencia de Aβ en CA1 de ratones Tg-SwDI.....	38
Figura 9. Respuesta de la microglía a la presencia de Aβ en Giro Dentado de ratones Tg-SwDI.	39
Figura 10. Respuesta de la microglía a la presencia de Aβ en Tálamo de ratones Tg-SwDI.	40
Figura 11. Conglomerados de microglía rodeando placas Aβ.	41
Figura 12 . Diferencias entre microglía de ratones viejos y jóvenes.	42
Figura 13 Comparación entre machos y hembras de la expresión de Iba-1.....	43
Figura 14. Cambios relacionados con la edad de la presencia de astrocitos en ratones Tg-SwDI hembra de 3, 6, 9, 12 y 15 meses.	44
Figura 15. Cambios relacionados con la edad de la presencia de astrocitos en ratones Tg-SwDI macho de 3, 6, 9, 12 y 15 meses.	45
Figura 16. Respuesta de los astrocitos a la presencia de Aβ en CA1 de ratones Tg-SwDI.....	46
Figura 17. Respuesta de los astrocitos a la presencia de Aβ en GD de ratones Tg-SwDI.....	47
Figura 18 Co-tinción de Aβ con GFAP en Tálamo de ratones Tg-SwDI.	47
Figura 19 . Diferencias entre microglía de ratones viejos y jóvenes..	49
Figura 20 . Comparación entre machos y hembras de la expresión de GFAP.....	49
Figura 21. Astrocitos rodeando a la microglía.....	50
Figura 22. Cambios relacionados con la edad en la expresión de TSPO en ratones Tg-SwDI hembra de 3, 6, 9, 12 y 15 meses.....	51
Figura 23. Cambios relacionados con la edad en la expresión de TSPO en ratones Tg-SwDI macho de 3, 6, 9, 12 y 15 meses.....	52
Figura 24 Comparación entre machos y hembras de la expresión de TSPO.....	53
Figura 25. Expresión de TSPO en microglía de ratones Tg-SwDI.	54
Figura 26. Expresión de TSPO en astrocitos.....	55
Figura 27 Neuroinflamación en el modelo murino Tg-SwDI.....	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Edad de los ratones Tg-SwDI y C57BL/6 a utilizar en el estudio	31
Tabla 2. Lista de anticuerpos utilizados	32
Tabla 3. Regiones del cerebro analizadas en Inmunofluorescencia	34

ABREVIATURAS

Aβ	Péptido β Amiloide
AAC	Angiopatía amiloide cerebral
AF	Alexa Fluor
ANT	Translocador de nucleótidos de adenina (Adenine Nucleotid Translocator)
APP	Proteína precursora amiloide (Amiloid Precursor Protein)
APOE	Apolipoproteína E
BACE	Enzima 1 de escisión de APP de sitio β (Beta secretase-enzyme)
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro (Brain Derived Neurotrophic Factor)
BHE	Barrera hematoencefálica
CA1	<i>Cornu Ammonis</i>
Ca²⁺	Calcio
CRAC	Consenso de aminoácidos de reconocimiento de colesterol (cholesterol recognition amino-acid consensus)
CSF1R	receptor de factor estimulante de colonias macrófagos (Colony Stimulating Factor 1 Receptor)
DAM	Microglía asociada a patología (Disease Associated Microglía)
DAMP	Patrones moleculares asociadas a daño (Damage Associated Molecular Patterns)
DCL	Deterioro Cognitivo Leve
EA	Enfermedad de Alzheimer
EAE	Enfermedad de Alzheimer Esporádica
EAF	Enfermedad de Alzheimer Familiar
GD	Giro dentado
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial (Glial Fibrillary Acidic Protein)
Iba-1	Molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1 (Ionized calcium-Binding Adapter molecule 1)
Int Den	Densidad Integrada de Fluorescencia (Integrated Density)

IFNγ	Interferón gamma
iNOs	Óxido nítrico sintasa inducible (Inducible nitric oxide synthase)
KO	Knock out
LCR	Líquido cefaloraquídeo
LDL	Lipoproteína de baja densidad (Low-density lipoprotein)
LRP1	Receptor de LDL (Low-density lipoprotein receptor related protein-1)
m-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos (macrophage- Colony stimulating factor)
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (Major Histocompatibility Complex)
MMP	Metaloproteinas
MRI	Imágenes por resonancia magnética (Magnetic Resonance Imaging)
NO	Óxido nítrico (Nitric Oxide)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBR	Receptor de benzodiazepinas de Tipo Periférico (peripheral-type benzodiazepine receptor)
PET	Tomografía de Emisión de Positrones (Positron Emission Tomography)
PK11195	1-(2-clorofenil)-N-metil-N-(1-metilpropil)-3-isoquinolinacarboxamida
PS	Presenilina
RAGE	Receptor de productos finales de glicación avanzada (Receptor of Advanced Glicacion End products)
REDOX	Reducción-oxidación
Ro5-4864	7-cloro-5-(4-clorofenil)-1,3-dihidro-1-metil-2H -1,4-benzodiazepin-2-one
ROIs	Regiones de interés (Regions of Interest)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species)
sAPPβ	Fragmento β APP soluble (soluble β APP fragment)
SIP	Sistema inmune periférico
SNC	Sistema nervioso central
TBS	Solución salina amortiguadora de Tris (Tris Saline Buffer)

TLR	Receptor tipo Toll (Toll Like Receptor)
TNF-α	Factor de necrosis tumoral
Tg	Transgénico
TREM2	Receptor desencadenante expresado en células mieloides (Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2)
TSPO	Proteína translocadora (Translocator Protein)
VDAC	Canal iónico dependiente de voltaje (Voltage dependent anion channels)

1. RESUMEN

Introducción: La Enfermedad de Alzheimer (EA) y la Angiopatía Amiloide Cerebral (AAC) son dos de las causas más comunes de demencia en adultos mayores. Son enfermedades neurodegenerativas que se caracterizan por la acumulación de proteínas mal plegadas en el cerebro. En la EA encontramos agregados neurofibrilares intracelulares de la proteína tau hiperfosforilada junto con los agregados intra- y extracelulares del péptido β -amiloide ($A\beta$) en el parénquima cerebral, mientras que en AAC, el péptido $A\beta$ se encuentra depositado en vasos sanguíneos cerebrales. Una de las características más importantes que comparten es la neuroinflamación, un mecanismo de defensa donde participan principalmente dos células residentes del sistema nervioso central (SNC), la microglía y los astrocitos.

En condiciones patológicas, como la acumulación de $A\beta$, las células de la glía adoptan un estado reactivo, inicialmente, tienen efectos neuroprotectores porque reconocen a $A\beta$ y pueden fagocitarlo. Sin embargo, la sobre-estimulación crónica de estas células ocasiona una liberación excesiva de mediadores proinflamatorios, lo que perpetúa un ciclo de neurotoxicidad. Una de las moléculas presentes en las células reactivas del cerebro es la proteína translocadora (TSPO) expresada en la membrana externa de la mitocondria e involucrada en procesos como la inflamación, apoptosis, y la translocación de colesterol al interior de la mitocondria. Sus ligandos son utilizados en tomografía de emisión de positrones (PET) como una herramienta para detectar la neuroinflamación relacionada con enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas.

Objetivo: En este trabajo se buscó caracterizar la cronología de los cambios patológicos con relación a la presencia de $A\beta$.

Materiales y métodos: Los ratones transgénicos Tg-SwDI desarrollan patología conjunta tipo EA y AAC, ya que contienen el transgen humano APP con 3 mutaciones: Swedish, Dutch y Iowa. Mediante inmunofluorescencia utilizando cortes coronales de tejido cerebral, evaluamos la expresión de marcador de microglía, la molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1 (Iba-1), la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en astrocitos y TSPO en cerebros de ratones Tg-SwDI en relación con la acumulación de $A\beta$.

Resultados y discusión: Observamos que la expresión de Iba-1 aumentó con la edad, tanto en machos como en hembras, en las regiones analizadas del hipocampo [Giro Dentado (GD) y CA1] y del tálamo. En el tálamo observamos un fuerte aumento en la expresión de Iba-1 en los ratones de 6 meses y documentamos que la microglía se encuentra adyacente a los depósitos de $A\beta$ en todas las regiones analizadas, particularmente en el tálamo de ratones de 6 meses, donde la microglía forma conglomerados rodeando los agregados amiloides, posiblemente como un mecanismo para limitar

su propagación. Asimismo, la expresión de Iba-1 fue mayor en los ratones controles Tg-SwDI envejecidos que en los ratones C57BL/6 de la misma edad.

Los astrocitos en los ratones Tg-SwDI exhibieron una mayor expresión de GFAP con la edad en todas las regiones, tanto en machos como en hembras. Los astrocitos también se encuentran en vecindad con A β y de igual manera se observaron diferencias en comparación con ratones C57BL/6.

Finalmente, la expresión de TSPO aumentó con la edad en ratones Tg-SwDI, en todas las regiones, y no fue observable en ratones C57BL/6. Únicamente hallamos expresión de TSPO en la microglía de ratones Tg-SwDI y no en los astrocitos.

Conclusión: Los ratones Tg-SwDI con patología conjunta tipo EA y AAC presentan neuroinflamación en función de la acumulación de A β , caracterizada por la sobre-expresión de GFAP en astrocitos, Iba-1 en microglía y TSPO en el cerebro

2. ABSTRACT

Introduction: Two of the most common causes of dementia in the elderly are Alzheimer's Disease (AD) and Cerebral Amyloid Angiopathy (CAA). Both of them are neurodegenerative diseases, characterized by the accumulation of misfolded proteins in the brain. In AD we find hyperphosphorylated tau protein along with intra and extra cellular β -amyloid peptides ($A\beta$) in brain parenchyma. While in AAC, the $A\beta$ peptide is mainly deposited in cerebral blood vessels, given the nature of both diseases, they frequently coexist. One of the most important characteristics they share is neuroinflammation, a defense mechanism in which two resident cells of the CNS participate, microglia and astrocytes.

Under pathological conditions, such as $A\beta$ accumulation, they switch to a reactive state to clear the peptide. Initially, they have neuroprotective effects because they recognize $A\beta$ and can phagocytose it, however, chronic overstimulation of these cells causes excessive release of proinflammatory mediators, perpetuating a cycle of neurotoxicity. One of the molecules present in the reactive cells in the brain is the translocator protein (TSPO), expressed in the outer membrane of the mitochondria, involved in processes such as inflammation, apoptosis, and the translocation of cholesterol into the mitochondria. Its ligands are used in positron emission tomography (PET) as a tool to detect neuroinflammation related to neurodegenerative and psychiatric diseases.

Objective: In this work we sought to characterize the chronology of pathological changes in relation to the presence of $A\beta$.

Methods: The Tg-SwDI transgenic mice develop combined EA and AAC pathology due to the 3 mutations in human APP: Swedish, Dutch and Iowa. Through immunofluorescence staining, in coronal sections of cerebral tissue, we quantified the amount of expression of microglia marker, ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1), astrocyte marker, glial fibrillary acidic protein (GFAP), and TSPO expression in Tg-SwDI mouse brains in relation to the accumulation of $A\beta$.

Results and Discussion: We observed that the presence and activation of microglia increased with age, both in males and females in the analyzed regions of hippocampus (Dentate Gyrus (DG) and CA1) and thalamus. At 6 months we observed a strong increase in expression in the expression of Iba-1 in the thalamus and we found the microglia adjacent to $A\beta$ deposits in all regions analyzed, particularly in the thalamus of 6-month-old mice, microglia form clusters surrounding amyloid aggregates, possibly as a mechanism to limit their growth. Furthermore, Iba-1 expression was higher in aged Tg-SwDI mice than in age-matched C57BL/6 mice.

Astrocytes in Tg-SwDI mice exhibited increased GFAP expression with age in all regions, both in males and females. Astrocytes are also found in the vicinity of A β , and similarly, differences are observed compared to C57BL/6 mice.

Finally, TSPO expression increased with age in Tg-SwDI mice, in all regions, and was not observable in C57BL/6 mice. We only found TSPO expression in the microglia of Tg-SwDI mice and not in astrocytes.

Conclusion: Tg-SwDI mice with both AD and CAA have neuroinflammation in relation to the appearance of A β accumulation, characterized by the overexpression of GFAP in astrocytes, Iba-1 in microglia and TSPO in the brain.

3. INTRODUCCIÓN

La demencia es un síndrome clínico caracterizado por un deterioro escalado de las funciones cerebrales como memoria, lenguaje y autosuficiencia, que afectan las actividades diarias del paciente. (Revisado de Villarejo, et al., 2017). La causa más común de demencia en los adultos mayores es la Enfermedad de Alzheimer (EA) (Nichols et al., 2019). El aumento de la población anciana y de la esperanza de vida han provocado un aumento de los casos de enfermedades asociadas a la edad; por lo tanto, las enfermedades neurodegenerativas, como la EA, se convierten en problemas globales (Morales et al., 2016).

Las características patológicas típicas de la EA incluyen la presencia de placas amiloides, constituidas principalmente por un péptido de 40 a 42 residuos de aminoácidos, el péptido β amiloide ($A\beta$), y marañas neurofibrilares constituidas de proteína Tau hiperfosforilada y plegada aberrantemente (Makin, 2018; Serrano-Pozo et al., 2011). Se cree que la acumulación de $A\beta$ en la EA, desencadena una serie de eventos, entre ellos la aparición de marañas neurofibrilares y la neuroinflamación, que culminan en un deterioro cognitivo (Zhang, 2015; Makin, 2018).

Además de jugar un papel esencial en la EA, $A\beta$ participa en otras patologías. Especialmente, en la angiopatía amiloide cerebral (AAC), donde $A\beta$ se deposita en y a lo largo de las paredes de la vasculatura en el Sistema Nervioso Central (SNC). La AAC es un componente importante de la EA, ya que más del 80% de personas con EA presentan AAC. La acumulación de $A\beta$ en la vasculatura da como resultado pérdida de células musculares lisas, lo que provoca la ruptura de los vasos sanguíneos, presencia de microhemorragias y, por otro lado, puede provocar isquemia.

Desde las primeras observaciones realizadas por Alois Alzheimer, se destacó la presencia de dos células alrededor de las placas: la microglía y los astrocitos. La activación de estas células y sus consecuencias se ha denominado como neuroinflamación. Comúnmente los pacientes con enfermedades neurodegenerativas desarrollan neuroinflamación, lo que provoca lesión y alteración de las funciones neuronales. En la EA, se ha descrito que la neuroinflamación modula el deterioro cognitivo y la pérdida de memoria. Los astrocitos y la microglía liberan mediadores proinflamatorios, como citocinas y especies reactivas de oxígeno (ROS), después de la exposición a $A\beta$. La presencia constante de estos componentes proinflamatorios daña a las neuronas y exagera la respuesta neuroinflamatoria, perpetuando un ciclo de neurotoxicidad en la EA.

En un estado neuroinflamatorio varias moléculas se encuentran sobre-expresadas en la microglía y los astrocitos activados, por ejemplo, la proteína translocadora de 18 kDa (TSPO). La detección de TSPO mediante técnicas de imagenología, como la tomografía por emisión de positrones (PET), permite evaluar la presencia y localización de la neuroinflamación en el cerebro de pacientes con enfermedades neurodegenerativas, como la EA y la AAC.

Para el estudio de ambas enfermedades se han desarrollado varios modelos transgénicos. Los ratones transgénicos Tg-SwDI desarrollan patología conjunta tipo Alzheimer y AAC, ya que expresan el gen humano APP con tres mutaciones: Swedish, Dutch e Iowa que en conjunto permiten la aparición de A β en la vasculatura y parénquima cerebral. En estos ratones se ha observado que desde los 2-3 meses de edad A β comienza a acumularse en vasos y en parénquima, a los 6 meses existe una cantidad apreciable de A β microvascular y es posible apreciar la aparición de la neuroinflamación. A los 12 meses los depósitos de A β son extensos y a los 2 años A β afecta al 90% de los microvasos.

Los ratones Tg-SwDI constituyen un modelo único e invaluable para investigar el depósito de A β vascular cerebral y parenquimal, así como sus efectos sobre la degeneración de la pared de los vasos y la neuroinflamación inducida por amiloide vascular (Miao et al., 2005; Van Vickle et al., 2008).

Debido a que la neuroinflamación es un componente importante de las enfermedades neurodegenerativas, es de crucial importancia entender su desarrollo e influencia en la patogénesis y el deterioro cognitivo en la EA y la AAC. En este trabajo buscamos caracterizar el perfil neuroinflamatorio en la cepa Tg-SwDI que cursa con la patología conjunta tipo Alzheimer y AAC a lo largo de la vida.

4. ANTECEDENTES

4.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La demencia definida por el Manual diagnóstico y estadístico de las enfermedades mentales (DSM-5), es un síndrome clínico que incluye la pérdida de funciones cognitivas con compromiso de la funcionalidad (Custodio et al., 2018), caracterizado por un deterioro escalonado de las funciones cerebrales: memoria, lenguaje, orientación, cálculo o percepción espacial, autosuficiencia, entre otras. (Villarejo, et al., 2017).

La EA es la causa más común de demencia en los adultos mayores (Nichols et al., 2019, Carmona et al., 2018, Alzheimer Association, 2020). Debido al progresivo envejecimiento de la población, se prevé un incremento de la prevalencia de demencia en todo el mundo (Villarejo et al., 2017). En general, el aumento de la esperanza de vida y el aumento asociado de la población anciana han provocado un aumento de los casos de enfermedades asociadas a la edad; por lo tanto, las enfermedades neurodegenerativas, como la EA, se convierten en problemas globales (Morales et al., 2016).

En un estudio de 2017 se encontró que en ese año 27 millones de mujeres y 16 millones de hombres padecían de demencia (Villarejo et al., 2017). Asimismo, en 2022, la asociación de Alzheimer y demencia estimó que 416 millones de personas a nivel mundial padecían EA (Gustavsson et al., 2023). La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que cada año se producen 10 millones de nuevos casos de demencia debido al aumento de la población en senectud (Villarejo et al., 2017; Nichols et al., 2019). Un estimado general del año 2015, indica que el costo en dólares de la atención de pacientes con EA fue de aproximadamente \$321,780 por persona.

4.1.1 ETIOLOGÍA

La EA tiene una etiología compleja con factores genéticos y ambientales que influyen el riesgo de desarrollar este padecimiento. En la mayoría de los casos, los pacientes desarrollan la enfermedad en edades avanzadas, presentando EA de tipo esporádica (EAE) caracterizada por su inicio tardío. Menos del 5% de los casos de EA son causados por mutaciones en el gen de la proteína precursora amiloide (APP) o en los genes de las presenilinas 1 y 2 (PS1 y PS2). En familias con mutaciones en alguno de estos genes, la enfermedad es heredada de manera dominante a los descendientes, por lo que, en estos casos, la enfermedad es comúnmente referida como EA familiar (EAF) y es de inicio temprano. (Hardy and Selkoe 2002; Kanekiyo et al., 2014; Rocchi et al., 2003).

La presencia de mutaciones en el gen APP o PS1 y PS2 acelera la producción del péptido A β , lo que resulta finalmente en el desarrollo de la EA antes de los 65 años. El gen APP codifica la proteína precursora del β -amiloide, una proteína transmembranal con un largo dominio extracelular y una región corta citoplasmática, que es procesada por dos secretasas α y γ o β y γ (Carmona et al., 2018).

Por otro lado, el gen de la apolipoproteína E (APOE) se reconoce como un factor de riesgo importante para la EA, principalmente en casos esporádicos de aparición tardía (Rocchi et al., 2003). La APOE está presente en las lipoproteínas transportadoras de colesterol y lípidos. Se encuentra ubicado en el cromosoma 19 y está conformado por 4 exones que codifican para 299 aminoácidos. Los 3 alelos más comunes del gen de APOE son $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ que están definidos por polimorfismos y codifican para 3 isoformas diferentes de la proteína (APOE2, APOE3 y APOE4) (Moreno y Tovar, 2012).

La isoforma más frecuente de esta proteína es APOE3 (Moreno y Tovar, 2012). En cambio, la presencia de APOE4 se ha establecido como un factor de riesgo para la EA y los individuos heterocigotos ($\epsilon 3/ \epsilon 4$) u homocigotos ($\epsilon 4/ \epsilon 4$) para APOE4 muestran cambios cognitivos más tempranos y una mayor densidad de placas amiloides y marañas neurofibrilares, que aquellos individuos que no portan un gen APOE4 (Brown et al., 2018). También existe una asociación de APOE4 con AAC grave. En general, APOE4 se asocia con un mayor riesgo de deterioro cognitivo relacionado con la edad, así como con deterioro cognitivo vascular durante el envejecimiento normal. Entre las tres isoformas de APOE humana, la APOE4 no solo inhibe la eliminación de $A\beta$ en el cerebro, sino que también aumenta la capacidad de $A\beta$ de hacerse semilla (Shinohara et al., 2016).

Debido al desarrollo de la secuenciación a gran escala se han identificado nuevos genes que aumentan el riesgo de EA: por ejemplo, polimorfismos en el receptor desencadenante expresado en células mieloides (TREM2), PLD3, ADAM10 y ABI3; incluso, hay regulación a la baja de algunos genes como el ligando CX3CL1, que tiene papeles conocidos en la neuroprotección y la neurotoxicidad en el contexto de la EA (Revisado de Freudenberg et al., 2018).

Por otra parte, se han descrito otro tipo de factores de riesgo que aumentan la propensión para desarrollar EA. Uno de los factores de riesgo más importantes es la edad, ya que con el envejecimiento las vías de eliminación del péptido $A\beta$ se ven deterioradas (Keable et al., 2016). Además, las características del envejecimiento como desgaste de los telómeros, alteraciones epigenéticas, disfunción mitocondrial, senescencia celular, detección desregulada de nutrientes, y comunicación intercelular alterada se correlacionan con la susceptibilidad a las enfermedades neurodegenerativas (Hou et al., 2019).

La presencia de ciertas enfermedades en el individuo se considera como factor de riesgo. Tal es el caso de enfermedades cerebrovasculares e hipertensión que contribuyen a la disfunción de la BHE, ya que pueden provocar acumulación de moléculas neurotóxicas, como ROS, y afectar negativamente al rendimiento cognitivo (Edwards lii, et al., 2019). Enfermedades como diabetes, obesidad y dislipidemia aumentan el riesgo de desarrollar EA mediante la activación del receptor de insulina y los niveles elevados de colesterol circulante. En estas condiciones la integridad de la BHE se ve comprometida (Edwards lii, et al., 2019; Keable et al., 2016).

Asimismo, algunos elementos psicosociales se han identificado como factores de riesgo incluyendo el tabaquismo (Cataldo et al., 2010), la calidad del sueño (Bhuniya et al., 2022), el estrés, el estado civil (Håkansson et al., 2009) y la condición física (Fan et al., 2015). La corrección de estos factores se correlaciona con una mejora en el rendimiento cognitivo o en los valores de $A\beta$ y tau en la sangre,

por lo que a menudo se les denomina factores de riesgo modificables (Bhuniya et al., 2022; Fan et al., 2015). Finalmente, algunos factores ambientales, ajenos a los individuos, también se han reportado como influyentes, entre ellos se encuentran la calidad del aire, la calidad del agua y contaminantes como metales pesados (Revisado de Killin et al., 2016).

4.1.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Actualmente, la progresión de la EA se clasifica en tres fases amplias: EA preclínica, deterioro cognitivo leve (DCL) y demencia. En la fase preclínica, aunque no existen síntomas, se pueden observar la presencia de biomarcadores y cambios cerebrales típicos de la enfermedad. En el DCL los síntomas muchas veces son imperceptibles o pueden confundirse con signos de la edad, aparecen como dificultades con la memoria y el lenguaje, especialmente el olvido de la información aprendida recientemente. La fase de demencia se divide en: leve, moderada y grave, que reflejan el grado en que los síntomas interfieren con la capacidad de una persona para llevar a cabo las actividades cotidianas (Alzheimer Association, 2021, Alzheimer Association, 2022).

La demencia de EA se caracteriza por síntomas considerables de memoria, lenguaje, pensamiento o comportamiento que progresivamente afectan la capacidad de una persona para desenvolverse en su entorno cotidiano. De igual manera, se ha observado la aparición de síntomas como: desafíos para planificar o resolver problemas, dificultades para completar las tareas diarias, confusión con el tiempo o el lugar en el que se encuentran, dificultades con el vocabulario como no encontrar la palabra correcta o llamar a las cosas por el nombre incorrecto y extraviar cosas (Alzheimer Association, 2018). Más tarde, las funciones corporales básicas, como la deglución, se ven afectadas (White, y Ruske, 2002, Alzheimer Association, 2018). Los síntomas se agravan con el tiempo, aunque la velocidad de progresión varía de persona a persona, aunque usualmente la demencia moderada es la etapa más larga (Alzheimer Association, 2022).

4.1.3 PATOLOGÍA

4.1.3.1 Características patológicas típicas de la enfermedad

Previo a la aparición de los síntomas y la atrofia de las estructuras cerebrales, se encuentran las características patológicas típicas de la EA que incluyen las placas amiloides constituidas principalmente por A β , y marañas neurofibrilares de tau. Ambas lesiones fueron descritas por Alois Alzheimer en su reporte original, principalmente en zonas del cerebro como el hipocampo, la neocorteza y otras regiones subcorticales (Makin, 2018; Serrano-Pozo et al., 2011).

Las marañas neurofibrilares están compuestas de la proteína tau hiperfosforilada y mal plegada. La proteína tau es una proteína asociada a microtúbulos que se localiza en el cuerpo celular y los axones en las neuronas. Los cambios de plegamiento aberrante e hiperfosforilación de los sitios específicos

ocurren en diferentes períodos de progresión de la enfermedad y siguen trayectorias distintas a lo largo del tiempo. Algunos cambios comienzan con los aumentos iniciales de agregados A β y otros aumentan con la atrofia y el hipometabolismo relacionado con el inicio de los síntomas (Barthélemy et al., 2020; Korolova et al., 2012).

Por otro lado, las placas amiloides están compuestas por depósitos extracelulares de A β , producido por la escisión de APP con β -secretasa y γ -secretasa (Huang et al., 2020). Los depósitos extracelulares de A β suelen ser clasificados entre placas difusas y placas compactas de acuerdo con su morfología resuelta mediante tinciones (Serrano-Pozo et al., 2011).

La APP es un receptor que se encuentra en, prácticamente, todas células; sin embargo, la isoforma APP695 es la que predomina en las neuronas. En condiciones fisiológicas, la APP permite el crecimiento de neuritas, la adhesión neuronal y la axonogénesis (UniProt, 2023). Esta proteína es sometida a un procesamiento proteolítico postraduccional, ya sea por la vía no amiloidogénica que incluye α - y γ -secretasas o por la vía amiloidogénica constituida por las β - y γ -secretasas. Estas dos vías son mutuamente excluyentes: en condiciones de homeostásis la vía no amiloidogénica es la prevalente (Huang et al., 2020; LaFerla et al., 2007; Sennvik et al., 2000). Las enzimas α -secretasas, que incluyen a las familias de enzimas de las metaloproteínas ADAM9, ADAM10 y ADAM17, cortan APP a una posición de 83 aminoácidos del carbono del extremo carboxi (C), produciendo un gran ectodominio amino (N) -terminal (sAPP α) que se secreta al medio extracelular. El fragmento C-terminal de 83 aminoácidos resultante (C83) se retiene en la membrana y posteriormente se escinde por la γ -secretasa, identificada como un complejo de enzimas compuesto PS1 y PS2, produciendo un fragmento corto denominado p3. Es importante destacar que la escisión por la α secretasa se produce dentro de la región A β , lo que impide su agregación (Huang et al., 2020; LaFerla et al., 2007; Sennvik et al., 2000).

La producción de A β , en la vía amiloidogénica, es iniciada por la enzima 1 de escisión de APP de sitio β (BACE1). Esta enzima corta la APP en el dominio extracelular a una distancia de 99 residuos de aminoácidos del carboxilo (C) terminal, lo que resulta en la liberación del fragmento β APP soluble (sAPP β) y se mantiene el fragmento de 99 residuos de aminoácidos (C99). Luego C99 es cortado por la enzima γ -secretasa, generando péptidos de 40 a 42 aminoácidos, denominados A β ₄₀ y A β ₄₂, respectivamente (Huang et al., 2020; LaFerla et al., 2007; Sennvik et al., 2000).

La acumulación de A β intraneuronal es un evento temprano en la progresión de la EA, que precede a la formación de depósitos extracelulares de A β . La liberación de A β podría ocurrir potencialmente dondequiera que la APP y las secretasas β y γ estén localizadas, y es probable que esto ocurra en varios compartimentos celulares (La Ferla et al., 2007). Concretamente, la proteína APP es sintetizada en el retículo endoplásmico y es transportada al aparato de Golgi (Sisodia 1992), lo que coincide con los reportes de la presencia de A β en el retículo endoplásmico, los complejos de Golgi, mitocondrias, endosomas, lisosomas y cuerpos multivesiculares en el citosol (La Ferla et al., 2007).

Parece ser que la gran mayoría de A β es secretada de las células, lo que sugiere que A β se produce predominantemente en la membrana plasmática, o como parte de la vía secretora, de modo que se

expulsa rápidamente de la célula (LaFerla et al., 2007). Con la producción aumentada de A β y su acumulación, se oligomeriza y comienza su deposición como placas difusas (Hardy, 2002).

Thal y colaboradores concertaron la deposición de A β en el cerebro humano en cinco fases. La deposición empieza en la neocorteza, este inicio también se observa en modelos animales, constituyendo la primera fase. La segunda fase incluye a CA1 y a la corteza entorrinal. En la tercera fase la deposición abarca el giro dentado, la amígdala, el tálamo y el hipotálamo. En la cuarta fase A β se encuentra en la sustancia nigra, colículo superior e inferior y la zona reticular intermedia. Finalmente, en la quinta fase se encuentra en el cerebelo y núcleos adicionales del tronco encefálico (Figura 1) (Thal, et al., 2002).

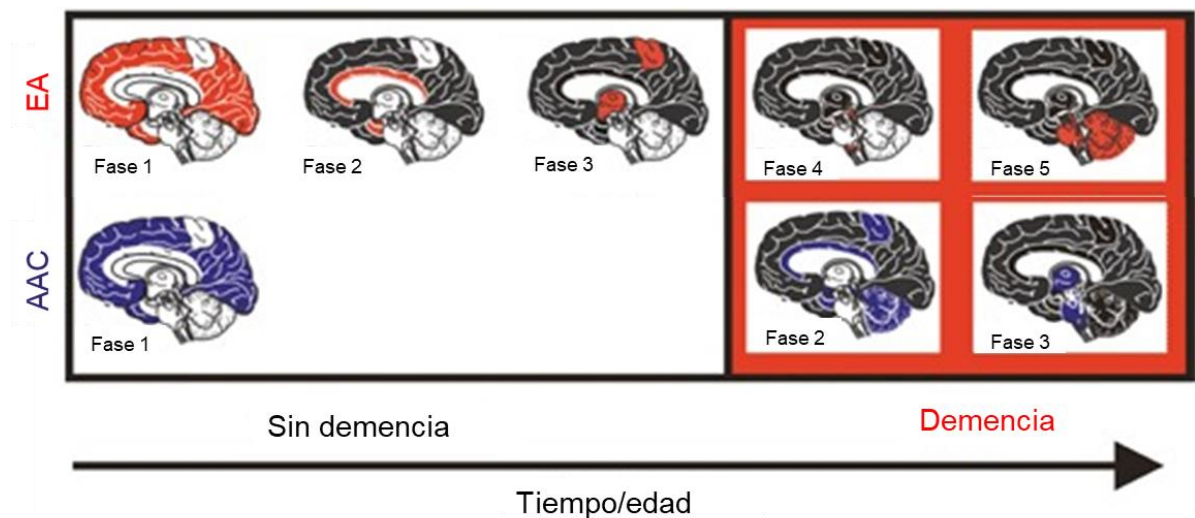


Figura 1. Esquema de deposición de A β parenquimal y vascular. La expansión de los depósitos de A β por todo el cerebro sigue cinco fases: (1) Las primeras placas de A β se producen en la neocorteza. (2) Luego se expanden hacia regiones alo corticales. (3) Los ganglios basales, tálamo e hipotálamo (4) el mesencéfalo y el bulbo raquídeo. (5) La protuberancia y el cerebelo también presentan depósitos de A β . Los depósitos vasculares de A β se producen en 3 fases: (1) en los vasos leptomenígeos y parenquimatosos de las regiones neocorticales. (2) En las regiones alo corticales, se ven afectados el mesencéfalo y el cerebelo. (3) AAC también se observa en la protuberancia, el bulbo raquídeo, los ganglios basales y el tálamo. Angiopatía Amiloide Cerebral (AAC), Enfermedad de Alzheimer (EA). Modificado de Thal et al., 2008.

4.1.3.2 Atrofia cerebral

En el cerebro de pacientes con EA se distingue un patrón típico de atrofia que afecta predominantemente los lóbulos temporales y estructuras que son parte del sistema de memoria. La atrofia de estas estructuras ha sido documentada en escáneres de imágenes por resonancia magnética (MRI) (De Toledo et al., 2000; Serrano-Pozo et al., 2011).

Estudios *post-mortem* han implicado a la corteza entorrinal como uno de los primeros sitios de la aparición de la patología de la EA (De Toledo et al., 2000; La Ferla et al., 2007). Más específicamente,

comienza en la segunda capa de la corteza entorrinal y se extiende gradualmente hacia el hipocampo, la corteza temporal, la corteza frontoparietal y los núcleos subcorticales. Recientemente, utilizando bases de datos de MRI, se encontraron cinco estadios de progresión, considerando la atrofia estructural en la EA: (1) hipocampo y amígdala; (2) giro temporal medio; (3) corteza entorrinal, corteza parahipocampal y otras áreas temporales; (4) cuerpo estriado y tálamo y (5) cortezas frontal media, cingular, parietal e insular, siendo las áreas más afectadas el hipocampo y la amígdala (Rao et al., 2022).

El hipocampo es una región crítica para la memoria y la representación interna del espacio. Es capaz de proporcionar recuerdos episódicos, que van desde eventos individuales detallados hasta narraciones más completas de múltiples eventos (Condello et al., 2015). La formación del hipocampo incluye la circunvolución dentada o giro dentado (GD), el hipocampo propiamente dicho o *Cornu Ammonis* (CA1, CA2 y CA3) y el subículo. El criterio principal para la inclusión en la formación del hipocampo es el carácter trilaminar de las estructuras (Burwell y Aster 2008). Junto al hipocampo, la corteza prefrontal, asiste en funciones complementarias en la memoria episódica. En detalle, el hipocampo es crucial para organizar los recuerdos dentro del contexto en el que se experimentan, mientras que la corteza prefrontal tiene un papel esencial en la recuperación de recuerdos apropiados al contexto (Revisado de Eichenbaum, 2017; Condello et al., 2015).

La anormalidad neuropatológica en la EA incluye pérdida neuronal y activación de la glía en el hipocampo (Rao et al., 2022). En las últimas etapas de la EA, se presenta una desconexión entre el GD y las subregiones del hipocampo, por lo que los síntomas y trastornos cognitivos se hacen más presentes (Reddy et al. 2018; Samuel et al. 1994; Hyman et al. 1986).

Otras regiones cerebrales están involucradas en los procesos cognitivos, por ejemplo, el tálamo está relacionado con la atención, factor muy importante para la cognición y la conciencia; esta estructura también se encuentra desconectada del hipocampo en pacientes con EA, afectando la memoria episódica (Tsivilis et al., 2008). El tálamo es una región cerebral muy compleja, caracterizada por diversos núcleos con distintas funciones. A grandes rasgos, los núcleos pueden agruparse en amplios grupos funcionales: visual, auditivo y vestibular, motor, somatosensorial y cognitivo, este último está constituido por el núcleo anteroventral y medio dorsal (Choi et al., 2022).

En los pacientes con EA, el tálamo se ve reducido, obteniendo como consecuencia un rendimiento global deteriorado, siendo el núcleo anterodorsal el más afectado (Braak y Braak, 1991). El *Nucleus reuniens*, que es parte del circuito talamocortical, tiene un papel global en la sincronización de las interacciones entre la corteza prefrontal y las áreas del hipocampo. Este núcleo talámico apoya la transferencia de información que subyace a sus interacciones en el procesamiento cognitivo (Revisado de Eichenbaum, 2017).

Es importante resaltar que aunque en pacientes jóvenes la atrofia es prominente y con una notable diferencia con respecto a los controles, a partir de los 70 años ya no se observa diferencia entre los pacientes y los controles de la misma edad. Es por esta razón que la atrofia se usa cuidadosamente como elemento diagnóstico en individuos más jóvenes (Castellani et al., 2010).

4.1.4 HIPÓTESIS AMILOIDE

La hipótesis de la cascada amiloide, propuesta en 1992, es una de las hipótesis más aceptadas sobre el desarrollo de la patología de EA. Mucho antes de que se propusiera esta hipótesis, se había reportado que la presencia de abundantes placas amiloides podría causar suficiente daño a las redes neuronales como para producir demencia (Blessed et al., 1968).

En esta hipótesis, se plantea que la deposición de A β es el primer paso en el desarrollo de la patología de EA, con lo que precede a la formación de marañas neurofibrilares, disfunción sináptica, pérdida de memoria y demencia. Con la producción aumentada de A β y su acumulación, este péptido se oligomeriza y se deposita como agregados difusos (Hardy, 2002). A β puede dañar las sinapsis y las neuritas, y los depósitos de placas en el cerebro reducen el número de sinapsis. A β causa daño principalmente a las neuronas colinérgicas, aunque también puede afectar neuronas que producen serotonina y norepinefrina o que utilizan glutamato como neurotransmisor. La amplia disfunción neuronal y muerte celular, consecuencia de la toxicidad de A β , deriva en demencia (Davis et al., 1999; Revisado de Chen et al., 2017).

Los factores que resultan en una alteración en la APP, en su procesamiento proteolítico o en cambios en la estabilidad de agregados del péptido A β , dan como resultado un desequilibrio entre la producción y degradación del péptido A β (Jarett et al., 1993). Aunque las mutaciones asociadas a la EA familiar aumentan la producción de A β , en los pacientes con la EA esporádico las especies de A β se acumulan debido a la disminución en su degradación y/o eliminación (Ries y Sastre, 2016). El péptido A β puede ser eliminado mediante enzimas protectoras como la enzima degradante de la insulina (IDE) y la neprilisina (NEP) (Jha et al., 2015; Son et al., 2015). Igualmente, el sistema linfático, participa en la eliminación de A β gracias a los pies de los astrocitos localizados alrededor de los vasos sanguíneos. Las células gliales participan en la eliminación del péptido mediante la liberación de enzimas y de manera activa en la internalización de A β por mecanismos de pinocitosis, fagocitosis y/o endocitosis mediada por receptores (Ries y Sastre, 2016). De igual manera, A β puede ser eliminada por la circulación periférica a través de la BHE, tras su interacción con el receptor de LDL (LRP1) y el receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE); también puede ser eliminado a través del drenaje perivascular (Zenaro et al., 2017).

Uno de los argumentos que enriquecen la hipótesis amiloide es que todos los genes identificados hasta el momento implicados en la EA de inicio temprano son capaces de interferir con el metabolismo de la APP dando lugar a un aumento en la producción (APP, PS1 y PS2) y depósito (APOE4) del péptido A β . Más evidencia que apoya esta hipótesis proviene de pacientes con síndrome de Down: en estos pacientes hay una alta incidencia de EA, ya que tienen una copia adicional del gen APP (Fessel, 2017), lo que conlleva a una producción aumentada del péptido A β desde su nacimiento y comienzan a desarrollar depósitos difusos amiloides en el cerebro a edades tempranas (Lemere et al., 1996).

En numerosos estudios en ratones transgénicos se ha demostrado que la sobreexpresión de APP humana mutada desarrolla, la deposición de amiloides difusos, seguidos de placas que contienen A β fibrilar que se asocian al daño neurítico ya la activación de la microglía (Gómez y Irizarry 2002). Existen múltiples trabajos en los que se ha demostrado que el péptido A β fibrilar es tóxico para las neuronas en cultivo y que dicha toxicidad puede prevenirse, al menos en parte, bloqueando la formación de fibrillas del péptido A β (Hardy y Selkoe, 2002). La inmunización de ratones transgénicos de APP con A β ₄₂ humano resultó en la eliminación de depósitos de A β del cerebro y la reversión de déficits cognitivos, lo que respalda la hipótesis de que la deposición de A β es un evento central en la EA (Revisado de Chen et al., 2017).

Se ha observado que los oligómeros de A β solubles en el cerebro de pacientes con EA se correlacionan mejor que la cantidad de placas seniles con la gravedad del cuadro clínico de demencia (Hardy, 2002), lo que sugiere que más que el propio A β fibrilar, especies intermedias de oligómeros solubles del péptido A β , son responsables de la disfunción neuronal y sináptica. Mientras que las fibrillas de amiloide son más grandes, insolubles y se ensamblan en placas amiloides, los oligómeros de A β tienen tamaños diferentes y son solubles, haciéndolos capaces de diseminarse por todo el cerebro (Revisado de Chen et al., 2017). Además, los oligómeros de A β pueden unirse a múltiples receptores en la superficie de la membrana neuronal e interferir con las vías de señalización normales y también pueden interactuar directamente con la membrana para formar una estructura de poros, lo que deriva en el cambio de la integridad y la permeabilidad de la membrana (Huang et al., 2020).

Estos efectos pueden sumar a la desregulación de la homeostasis del calcio (Ca²⁺), daño mitocondrial, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), reducción del nivel de ATP y fosforilación anormal de tau, lo que resulta en disfunción sináptica, pérdida de neuronas y deterioro de la potenciación a largo plazo (Huang et al., 2020; Hardy, 2002). La formación de oligómeros de A β se correlaciona con los déficits de memoria (Revisado de Chen et al., 2017).

La hipótesis amiloide es objeto de discusión, principalmente se ha señalado que es, al menos, incompleta (Kametani et al., 2018). En este sentido, existen otras teorías que intentan explicar el fenómeno de la EA, como la hipótesis colinérgica. Según esta teoría, la reducción de la inervación colinérgica es responsable del deterioro cognitivo (Lombardo & Maskos 2015), respaldado por observaciones que indican que los fármacos anticolinérgicos tenían efectos amnésicos y reproducían déficits de memoria similares a los observados en sujetos ancianos sin demencia (Revisado de Contestabile 2011). Por otro lado, la hipótesis de Tau señala que el principal causante de la EA es Tau, ya que la patología de tau se propaga de manera definida en el cerebro y su distribución puede correlacionarse con las etapas clínicas de la enfermedad (Braak y Braak, 1991). Incluso se considera que la patología tau se correlaciona mejor que la patología A β con las características clínicas de la demencia (Revisado de Morris et al., 2014; Kametani & Hasegawa, 2018). Recientemente esta hipótesis ha ganado atención porque, al igual que A β , se ha confirmado que tau prolifera y se propaga entre células (Kametani & Hasegawa, 2018). Sin embargo, hasta el momento, la hipótesis amiloide es la más aceptada, en parte porque se ha demostrado que anticuerpos anti-A β aprobados por la

FDA, como aducanumab, median la eliminación de las placas amiloides del cerebro de pacientes con EA (Revisado de Karran et al., 2022).

4.2 ANGIOPATÍA AMILOIDE CEREBRAL

La deposición de A β no se da únicamente en el parénquima cerebral, cuando ocurre dentro de los vasos sanguíneos cerebrales se le conoce como angiopatía amiloide cerebral (AAC). A β se deposita en y a lo largo de las paredes de la vasculatura en el SNC, lo que da como resultado una respuesta neuroinflamatoria robusta, microhemorragias y hemorragias intracerebrales (Yamada 2002; Alzheimer Association, 2018). La AAC es bastante común, con un estimado de 20 a 40% de los individuos de la población general que presentan esta patología en la autopsia (Yamada 2002), y se considera la segunda causa de hemorragia cerebral no traumática en los ancianos, representando del 15 al 40 % de los casos (Revisado de Qi y Ma, 2017).

La AAC se considera un componente importante de la EA, ya que más del 80% de las personas con EA también presentan al menos una patología leve de AAC (Yamada 2002). Previamente, la AAC era considerada un síntoma de EA por su alta incidencia (Ellis et al., 1996), sin embargo, se ha demostrado que la AAC se puede presentar en presencia o ausencia de EA (Yamada et al., 2002; Yamada 2012; Greenberg et al., 2019) y por sí misma es considerada como la segunda causa de demencia en adultos mayores (Alzheimer Association, 2022). Se cree que debido al papel compartido de A β las condiciones y síntomas de ambas enfermedades se traslapan, lo que tiene un papel importante en los efectos del deterioro cognitivo. AAC contribuye a la patogénesis de la EA, afectando el drenaje perivascular como una de las mayores rutas de eliminación de A β del cerebro (Alzheimer Association, 2018; Greenberg et al., 2019).

Los casos de AAC familiar son usualmente causados por mutaciones en el gen APP, al igual que en los pacientes con EA. La aparición de AAC esporádica también es muy similar a los factores de riesgo de la EA, como la presencia de ciertas isoformas de APOE. Por ejemplo, se ha encontrado que los pacientes con alelos APOE2 o APOE4 parecen tener un mayor riesgo de hemorragias craneales que la población general, aunque en pacientes con EA, la presencia de APOE2 se considere un factor de protección (Kuhn y Sharman 2022; Greenberg et al., 1995).

En contraste con la pérdida de sinapsis y neuronas debido a A β en EA, el daño relacionado a AAC parece provenir de la disfunción de los vasos sanguíneos, ya sea por la pérdida de integridad de los vasos y hemorragia o por la pérdida del suplemento normal de sangre y la isquemia. Las lesiones hemorrágicas relacionadas a AAC incluyen hemorragias intracerebrales pequeñas (mayormente asintomáticas) y sangrado en el tejido cortical. También puede haber contribuciones potenciales de la pérdida de axones y mielina y microinfartos cerebrales (Greenberg et al., 2019). Además de las implicaciones y el riesgo de accidente cerebrovascular hemorrágico, es probable que uno de los síntomas cognitivos de AAC sea un juicio o una capacidad deficiente para tomar decisiones, a diferencia de la pérdida de memoria de la EA. (Alzheimer Association, 2018; Revisado de Desimone et al., 2017).

En conjunto, la presencia de AAC avanzada en EA está asociada con mayor impedimento y declive cognitivo, mostrando contribuciones compartidas derivando en una mayor disfunción clínica (Greenberg et al., 2019). La interacción entre AAC y la presencia de placas amiloides se asocia con una disminución cognitiva en participantes ancianos sin diagnóstico de EA (Malek-Ahmadi et al., 2019). En otro estudio reportaron que la AAC interactuaba con placas neuríticas, lo que aceleró la carga de tau y el deterioro cognitivo. Específicamente, aquellos con AAC más grave y niveles más altos de placa neurítica tenían una mayor carga de tau y un deterioro cognitivo más rápido (Rabin et al., 2022).

Por otra parte, las placas parenquimatosas propias de la EA están constituidas principalmente de $A\beta_{42}$, mientras que $A\beta_{40}$ se deposita en mayor medida a lo largo de la vasculatura (Revisado de Desimone et al., 2017, Jäkel et al., 2017). La mayor propensión de $A\beta_{42}$ para formar placas, a comparación de $A\beta_{40}$, puede explicarse por los diferentes estados conformacionales de los péptidos, con el C-terminal de $A\beta_{42}$ más estructurado y los residuos 31-34 y 38-41 formando una horquilla β que reduce la flexibilidad del extremo C-terminal (Sgourakis et al., 2007).

En el proceso de depósito de $A\beta$ vascular, inicialmente se deposita $A\beta_{42}$ y luego se acumula $A\beta_{40}$. La relación $A\beta_{40}:A\beta_{42}$ desplaza significativamente la deposición de $A\beta$, como se ha demostrado en mutaciones que causan AAC hereditaria: por ejemplo, la tipo Dutch (Yamada 2012). La disminución en los procesos de eliminación de $A\beta_{40}$, puede deberse a la conformación de hoja β antiparalela de las fibrillas $A\beta$ lo que los predispone a depositarse principalmente en las paredes de los vasos sanguíneos (Hubin et al., 2015). Además, dado que $A\beta_{40}$ es más soluble que $A\beta_{42}$, puede difundirse a través del drenaje perivascular para acumularse en las paredes de los vasos, a diferencia de $A\beta_{42}$ que es menos soluble, forma fibrillas más rápido y es más común que sea retenido en el parénquima e inicie nucleación de placas insolubles (Greenberg et al., 2020). La deposición sigue un patrón típico, con $A\beta$ depositado inicialmente en la túnica media y la adventicia. Posteriormente, $A\beta$ se acumula en todas las capas de la pared del vaso y provoca la pérdida de células musculares lisas. A esto le sigue la rotura de la pared de los vasos sanguíneos que conduce a la formación de microhemorragias (Figura 2) (Revisado de Desimone et al., 2017). La región del cerebro más frecuentemente y más severamente afectada por el depósito de $A\beta$ es el lóbulo occipital, seguido de los lóbulos frontal, parietal y temporal (Figura 1) (Jäkel et al., 2017; Krishner y Bradshaw, 2015). Adicionalmente, se sabe que existe una correlación entre una mayor severidad de la AAC y la presencia de hemorragias o lesiones isquémicas en el cerebro (Ellis et al., 1996).

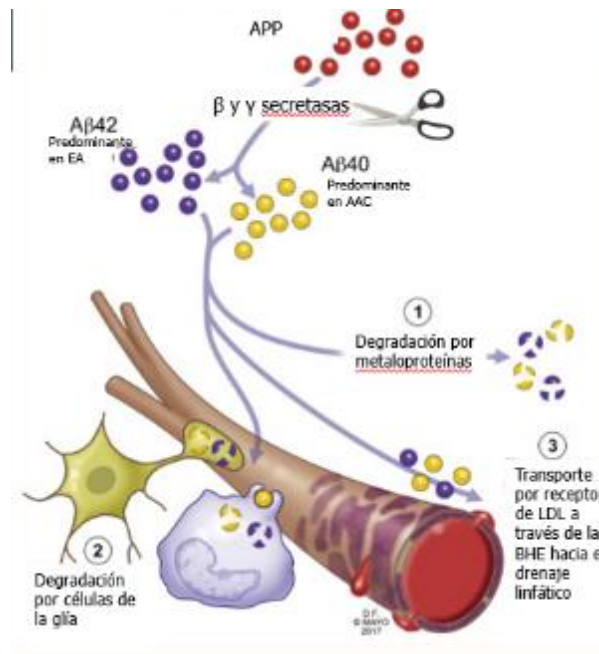


Figura 2 Esquema del patrón de producción, acumulación y degradación de Aβ en AAC y EA. La proteína precursora amiloide (APP) es escindida por las enzimas β y γ secretasas generando péptidos β-amiloides (Aβ). El péptido Aβ usualmente tiene una longitud de 42 (Aβ₄₂) o 40 (Aβ₄₀) aminoácidos. Aβ₄₂ es la forma predominante de Aβ en la Enfermedad de Alzheimer (EA), mientras que Aβ₄₀ predomina en la Angiopatía Amiloide Cerebral (AAC). Existen tres vías de eliminación: Degradación por enzimas (metaloproteinas), degradación por células de la glía y el transporte a través de la barrera hematoencefálica (BHE) a través del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL) o el drenaje a través del sistema linfático. Modificado de Desimone et al., 2017.

Cuando la deposición ocurre en capilares cerebrales, se clasifica como AAC de tipo 1 y la AAC sin la participación de los capilares es clasificada como AAC de tipo 2. La AAC tipo 1 tiende a ser esparcida especialmente en la neocorteza y el hipocampo y ha sido asociada a placas neuríticas y patología de EA severa. La acumulación preferencial en sitios de deposición inicial o "semilla" sugiere que la siembra y la expansión subsecuente de amiloide es un mecanismo de iniciación y progresión de la AAC esporádica (Kuhn, 2021).

Por lo general, las venas se ven afectadas con menos frecuencia que las arterias (Jäkel et al., 2017). Se ha visto que la localización de la hemorragia refleja la distribución de Aβ, favoreciendo los vasos corticales. Asimismo, la ubicación y el tamaño de la hemorragia determinan en gran medida los déficits clínicos. Aquellas que se extienden hacia los ventrículos pueden causar disminución de la conciencia, mientras que una hemorragia más pequeña puede causar más déficits focales, como dolores de cabeza o convulsiones. Las hemorragias muy pequeñas pueden ser asintomáticas y es más probable que las hemorragias ocurran en la parte posterior del cerebro (Kuhn, 2021).

La AAC se ha visto con más frecuencia en hombres (Ruitenbergh et al., 2001; Sinohara et al., 2016). Por el contrario, entre los pacientes con EA diagnosticados clínicamente, se detectó una patología de

EA más grave, incluidas placas neuríticas, placas difusas y ovillos neurofibrilares, en cerebros *post mórtem* de casos femeninos (Ruitenberget al., 2001; Barnes et al., 2005; Guillot-Sestier et al., 2021). Sin embargo, ninguno de estos estudios considera los casos de pacientes con ambas enfermedades. El efecto de dimorfismo sexual de esta asociación puede deberse a que los estrógenos afectan el transporte de colesterol y lípidos, y en el cerebro, los estrógenos regulan la expresión de la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad, que se ha implicado en el transporte de A β (Villa et al., 2021). Sin embargo, la deficiencia de estrógenos en mujeres posmenopáusicas es uno de los factores de riesgo, causando un déficit cognitivo (Robusto-Leitao y Ferreira, 2006).

4.3 NEUROINFLAMACIÓN

Por mucho tiempo se pensó que el cerebro era un órgano “inmunoprivilegiado” donde la respuesta del sistema inmune no tenía injerencia (Weaver 2023). Sin embargo, varios grupos de investigación comprobaron que en el sistema nervioso se encuentran células semejantes a las células del sistema inmune innato en periferia que se encargan de vigilar y mantener la homeóstasis del tejido.

La neuroinflamación es una respuesta fisiológica compleja, en la que se ven implicados una serie de cambios celulares y moleculares, el reclutamiento de células inmunitarias periféricas, la inducción de algunas vías de señalización intracelular y la liberación de mediadores inflamatorios en el cerebro (McGeer et al., 2013). Análogo a los mecanismos celulares periféricos, las células gliales contribuyen a los procesos degenerativos y regenerativos en el SNC (DiSabato et al., 2016). Las enfermedades neurodegenerativas cursan con un importante elemento neuroinflamatorio, que aparece desde la etapa más temprana de la enfermedad, con una variedad de efectos que pueden considerarse tanto positivos como negativos (Scuderi et al., 2020).

4.3.1 Microglía

La microglía es la principal célula del sistema inmunitario en el cerebro. A diferencia de las demás células de la glía, las células de la microglía tienen un origen mieloide y se consideran fagocitos mononucleares. Proviene del saco vitelino embrionario, análogo a otros macrófagos residentes de tejido, durante el desarrollo llegan al SNC y en la adultez se renuevan mediante división (Colonna y Butovsky, 2017; Revisado de Prinz et al., 2021).

En condiciones de homeostasis las células microgliales son muy móviles y sus procesos altamente ramificados se extienden y retraen constantemente, vigilando el entorno local, análogo a los macrófagos en la periferia (Bernier et al., 2020; Gehrmann et al., 1993). Se encuentran en comunicación con las otras células residentes del SNC, lo que les permite llevar a cabo eliminación de células apoptóticas, sinapsis no funcionales, participar en la plasticidad sináptica y la reparación de tejidos (Hansen et al., 2018; Revisado de Borst et al., 2021). Adicionalmente, realizan diversas

funciones protectoras como la fagocitosis de patógenos invasores, y actúan como la primera línea de defensa contra la acumulación de desechos de mielina o depósitos amiloides, formando una barrera dirigida a prevenir más daño (Hansen et al., 2018; Marttinen et al., 2018; Morales et al., 2016; Soto-Rojas et al., 2015; Zhang et al., 2015; Revisado de Borst et al., 2021).

Al igual que otros macrófagos, se considera que la microglía puede polarizarse hacia un perfil pro-inflamatorio M1 o un perfil anti-inflamatorio M2 (Ransohoff, 2016). En situaciones patológicas, como en enfermedades neurodegenerativas, accidente cerebrovascular, lesión traumática, infección aguda e invasión tumoral, la microglía cambia de un fenotipo en homeostasis a un fenotipo reactivo. En la activación, sufre cambios en su morfología, de una forma ramificada con procesos celulares finos y un soma reducido hacia un soma un poco más grande y procesos más reducidos en longitud y en número. Además, su movilidad se ve modificada y es capaz de proliferarse (Revisado de Heneka et al., 2010; Ahmad et al., 2018).

Cuando se polariza a un perfil M1, la microglía libera mediadores proinflamatorios que incluyen interleucinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 e IL-23), el factor de necrosis tumoral (TNF- α) e interferón gamma (IFN γ), ROS, especies de radicales libres, óxido de nitrógeno (NO), quimiocinas, metaloproteinasas (MMP-2, MMP-3, MMP-9), eicosanoides (prostaglandinas, leucotrieno C4, catepsinas B y L) y factores del complemento (C1, C3, C4) (Hansen et al., 2018; Marttinen et al., 2018; Morales et al., 2016; Soto-Rojas et al., 2015).

Por otro lado, la microglía también puede adquirir un fenotipo anti-inflamatorio M2 y reparar el tejido tras el daño, liberar IL-10 para promover la cicatrización de heridas y suprimir las respuestas inmunitarias destructivas (Philippens & Langermans 2021). Se han propuesto subclases de fenotipos adicionales, dependiendo del estímulo; la estimulación con IL-4 resulta en fenotipo M2a, la estimulación de TLRs resulta en un fenotipo M2b y la estimulación con IL-10 y glucocorticoides resulta en un fenotipo M2c (Ransohoff, 2016). Igualmente, puede secretar factores tróficos que brindan apoyo al SNC, en particular el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), la arginasa-1 (Arg-1) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β). Estos últimos evitan la polarización de microglía hacia un perfil M1 (Flores et al., 2020).

4.3.1.1 Microglía en la EA y la AAC

Una de las funciones de la microglía en la EA es la regulación de los niveles de A β en el cerebro, consecuentemente, la respuesta inflamatoria durante la EA se localiza principalmente en la vecindad de las placas A β (Revisado de Ahmad et al., 2018; Ries y Sastre, 2016). La microglía reactiva expresa una variedad de receptores de superficie, incluidos el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y los receptores del complemento. En particular, A β activa e ingresa a la microglía uniéndose a RAGE, CD14 o heterodímeros del receptor tipo Toll (TLR) TLR4 y TLR6, CD36 y TREM2 (Revisado de Heneka et al., 2010; Ries y Sastre, 2016).

Cada receptor tiene un mecanismo de acción propio, aunque tras estar en contacto con A β , la mayoría culminan en la polarización de la microglía hacia un fenotipo pro-inflamatorio M1. Por ejemplo, la unión de A β con CD36, TLR4 y TLR6 da como resultado la producción de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, mediante la vía de NF κ B. La unión del receptor RAGE, por otro lado, da como resultado la secreción del factor estimulante de colonias de macrófagos (m-CSF), que recluta más células (Philippens & Langermans 2021). Del mismo modo, en el hipocampo, la elevación de citocinas proinflamatorias como la IL-1 β induce la proliferación microglial, lo que asiste a la eliminación del A β fibrilar (Rao et al., 2022).

Dentro de los marcadores más utilizados para indicar si la microglía se encuentra reactiva es el marcador citoplasmático Iba-1. Es un marcador que se encuentra de forma constitutiva en la célula, y su expresión se ve aumentada frente a un estímulo de inflamación no resuelto, aunque es inespecífico de algún subtipo de microglía o una respuesta polarizada (Ito et al., 1998). Entre los marcadores exclusivos de microglía, que no se expresan en macrófagos, se incluyen P2Y12, Fcrls, TMEM119, OFFM113 Y TGFBR1 (Grubman et al., 2021)

En los últimos años se han descrito varios subtipos de la microglía, incluyendo diferentes subtipos en pacientes con EA. Se han identificado gracias al desarrollo de nuevas técnicas que permiten identificar varias moléculas en una sola célula. Uno de los subtipos más frecuentes en la EA es la microglía asociada a patologías (DAM), que muestra regulación positiva de genes implicados en las vías de metabolismo fagocítico y lipídico, así como factores de riesgo de EA como son APOE o TREM2. (Keren-Shoul et al., 2017). Aunque, a veces en individuos sanos también se llega a encontrar este subtipo (Grubman et al., 2021).

Los mecanismos de degradación de A β por microglía y astrocitos incluyen: proteólisis por NEP e IDE y eliminación por metaloproteínas o chaperonas extracelulares (Ries y Sastre, 2016). Se ha observado una diferencia entre las formas de A β : la forma soluble puede degradarse por proteasas extracelulares, mientras que A β fibrilar usualmente es más resistente a degradación por proteasas y puede ser fagocitada por lisosomas (Koenigsknecht et al., 2004; Philippens & Langermans 2021). Desde los primeros estudios *in vitro*, se ha informado que la microglía puede acumular A β hasta 24 horas, con capacidad de degradación intracelular (Ard et al., 1996).

En algunos estudios se encontró que en etapas tempranas de la EA la microglía tiene un fenotipo M2 y posteriormente se polariza hacia un perfil M1 (Jimenez et al., 2008). Se ha demostrado que la ausencia de microglía mediante depleción genética del receptor de factor estimulante de colonias macrófagos (CSF1R), en un modelo murino de EA, provoca un cambio hacia AAC lo que se acompaña de hemorragias, calcificación y letalidad (Kiani et al., 2022). Al administrarles microglía de ratones sanos, estos efectos disminuyeron, lo que resalta las funciones protectoras de la microglía en la reducción de hemorragias, disfunción de la BHE y calcificación cerebral (Kiani et al., 2022).

Aunque la microglía reactiva está implicada en la fagocitosis de A β , lo que contrarresta la carga del péptido, la sobreestimulación de los receptores puede desencadenar una liberación excesiva de los mediadores proinflamatorios, lo que puede contribuir a la disfunción neuronal y la muerte celular,

en última instancia creando un círculo vicioso (Revisado de Heneka et al., 2010; Revisado de Ahmad et al., 2018; Soto-Rojas et al., 2015). Se piensa que la fagocitosis por la microglía contribuye a la agregación y concentración de monómeros A β , la microglía muerta libera A β acumulado, lo que contribuye a más deposición del péptido (Baik et al., 2016). De manera irónica, se ha reportado que la microglía activa pierde su capacidad fagocítica, volviéndose disfuncional y contribuyendo a la patogénesis de la EA (Pan et al., 2011).

Es importante hacer hincapié en que, durante el curso de la neurodegeneración, otras funciones fisiológicas de la microglía también se afectan. Por ejemplo, el daño neuronal característico de las enfermedades neurodegenerativas conduce a la interrupción del eje microglía-neurona y genera una respuesta microglial anormal (Soreq et al., 2017). De igual manera, la microglía activada ocasiona quimiotaxis de astrocitos alrededor de las placas amiloides (Revisado de Heneka et al., 2010; Soto-Rojas et al., 2015; Edler et al., 2021).

El factor de riesgo primario para la EA es la edad avanzada. Si bien el envejecimiento en sí no es una enfermedad, suele ir acompañado de un bajo grado de inflamación crónica (Franchesci, et al., 2000). La edad tiene un efecto profundo en la sensibilidad de las células de la glía al ambiente. En la microglía se manifiesta por cambios en la densidad, activación, morfología, fenotipo, expresión de citocinas y fagocitosis, produciendo una inflamación persistente, lo que hace que el cerebro sea cada vez más susceptible a lesiones o neurodegeneración (Edler et al., 2021). Esta inflamación persistente se ha correlacionado con la alta expresión de mediadores inflamatorios en la vecindad de depósitos A β y ovillos neurofibrilares τ (Morales et al., 2016).

4.3.2 Astrocitos

Los astrocitos son la población de glía más abundante del SNC, comprenden una población de células con una compleja morfología estrellada y numerosos procesos extendidos, que se encuentran rodeando a las neuronas vecinas y a los vasos sanguíneos. En un cerebro sano, la morfología de los astrocitos varía con respecto a la región del cerebro donde se encuentren, probablemente debido a la comunicación sináptica con las diferentes neuronas (Monterey et al., 2021; Revisado de Heneka et al., 2010; Revisado de Ahmad et al., 2018). Los astrocitos, al igual que las neuronas y los oligodendrocitos, se originan a partir de la glía radial derivada del neuroepitelio (Verkhatsk & Nedergaard., 2017).

Los astrocitos realizan funciones esenciales para mantener la homeostasis cerebral y la función neuronal, en parte a través de la neurogénesis embrionaria y adulta. Los astrocitos hipocampales mediante liberación de moléculas activas instruyen a las células progenitoras a proliferarse o diferenciarse (Song et al., 2002; Revisado de Cassé et al., 2018).

Los astrocitos también regulan los niveles de fluido y pH en el cerebro, se encargan del soporte estructural, trófico y metabólico para las neuronas. (Monterey et al., 2021; Revisado de Heneka et al., 2010; Ahmad et al., 2018). De igual manera, suministran algunos precursores de neurotransmisores y sustratos energéticos, realizan la síntesis y almacenamiento de glutatión y

modulan la excitabilidad neuronal y la neurotransmisión a través de la regulación de los niveles de iones y neurotransmisores en el espacio extracelular. Por lo que resulta evidente que la interacción entre los astrocitos y las neuronas es crítica para la supervivencia y el funcionamiento normal del SNC (Revisado de Heneka et al., 2010; Ahmad et al., 2018; Verkhratsk & Nedergaard., 2017).

4.3.2.1 Astrocitos en la EA y la AAC

Al igual que la microglía, los astrocitos juegan un papel importante en la patogénesis de la EA. En condiciones patológicas, los astrocitos transitan de un estado basal o de reposo a un estado reactivo en el que son incapaces de realizar sus funciones de soporte, dejando a las neuronas vulnerables a la acción de neurotoxinas como citocinas pro-inflamatorias o especies reactivas de oxígeno (Fuller et al., 2010). A β representa una señal de activación para los astrocitos, de tal manera que la exposición de células gliales cultivadas con A β agregado o a placas amiloides aisladas de cerebros humanos con EA desencadena la astrogliosis reactiva (Revisado de Heneka et al., 2010).

El péptido A β también induce cambios funcionales en los astrocitos *in vitro* como la despolarización mitocondrial y el estrés oxidativo. Los astrocitos *in vitro* pueden fagocitar péptidos A β (Revisado de Heneka et al., 2010), además se ha reportado que en incubación con A β los astrocitos responden mediante el receptor TLR4 (Hughes et al., 2020). Sin embargo, en un estudio *in vivo*, los astrocitos endógenos que rodean las placas de A β no pudieron acumular o eliminar A β (Revisado de Heneka et al., 2010).

Se ha demostrado que el A β_{42} agregado es absorbido por los astrocitos y causa alteraciones metabólicas y producción de peróxido de hidrógeno (Allaman et al., 2010). Los astrocitos pre-tratados con A β fueron tóxicos para las neuronas en los co-cultivos. Al igual que la microglía, los astrocitos liberan citocinas, NO y otras moléculas potencialmente citotóxicas después de la exposición a A β , lo que exacerba la respuesta neuroinflamatoria. La liberación de especies reactivas de oxígeno de los astrocitos estresados provoca la muerte neuronal (Revisado de Heneka et al., 2010; Revisado de Ahmad et al., 2018).

Además, es conocido que existe una correlación entre el grado de astrogliosis y el deterioro cognitivo (Revisado de Heneka et al., 2010; Revisado de Ahmad et al., 2018). Este deterioro puede explicarse con que, en condiciones patológicas, las interacciones astrocito-neurona pueden sufrir cambios drásticos, con un fuerte impacto en los circuitos cerebrales que respaldan la formación de la memoria y la función cognitiva (Santello et al., 2019). Asimismo, A β activa excesivamente ciertos receptores en los astrocitos, como receptores nicotínicos Ach $\alpha 7$, receptores mGlu5, receptores P2Y1 y receptores de adenosina A2A (Hamby et al., 2012). La activación de estos receptores crea una señalización aberrante, lo que también impacta negativamente a los circuitos relacionados con la memoria (Santello et al., 2019).

Se ha reportado que con el envejecimiento la expresión de GFAP aumenta y existe un cambio morfológico, de procesos largos y delgados en individuos jóvenes a procesos cortos y gruesos en individuos mayores (Jyothi et al., 2015; David et al., 1997). Estos cambios en los astrocitos son

considerados parte de la inflamación crónica relacionada a la edad, lo que genera una susceptibilidad en el cerebro a lesiones o neurodegeneración (Edler et al., 2021).

4.3.3 Proteína translocadora (TSPO)

La TSPO es una proteína que se encuentra en la membrana externa mitocondrial (Jaremko et al., 2015; Papadopoulos et al., 2006) y que está involucrada en varios procesos fisiológicos como la síntesis de esteroides, la inflamación, producción de energía, apoptosis y procesos de reducción y oxidación (REDOX). La función más estudiada de esta proteína es la biosíntesis de esteroides ya que se une al colesterol con gran afinidad para internalizarlo en la mitocondria y llevar a cabo la síntesis de esteroides como la pregnenolona. De hecho, es debido a su función translocadora que se cambió su nombre a TSPO, ya que previamente se conocía como receptor de benzodiazepinas de tipo periférico (PBR) por su reconocido sitio de unión de las benzodiazepinas (Figura 3) (Papadopoulos et al., 2006).

La función principal de TSPO es el transporte de colesterol desde la membrana externa mitocondrial hacia la membrana interna. TSPO es capaz de unirse al colesterol ya que en su estructura contiene una secuencia de consenso de aminoácidos de reconocimiento de colesterol (CRAC) en el C-terminal de la proteína; la secuencia genera conformación helicoidal debido a los residuos de aminoácidos de la posición 144 a la posición 1595 (Zhang et al., 2020).

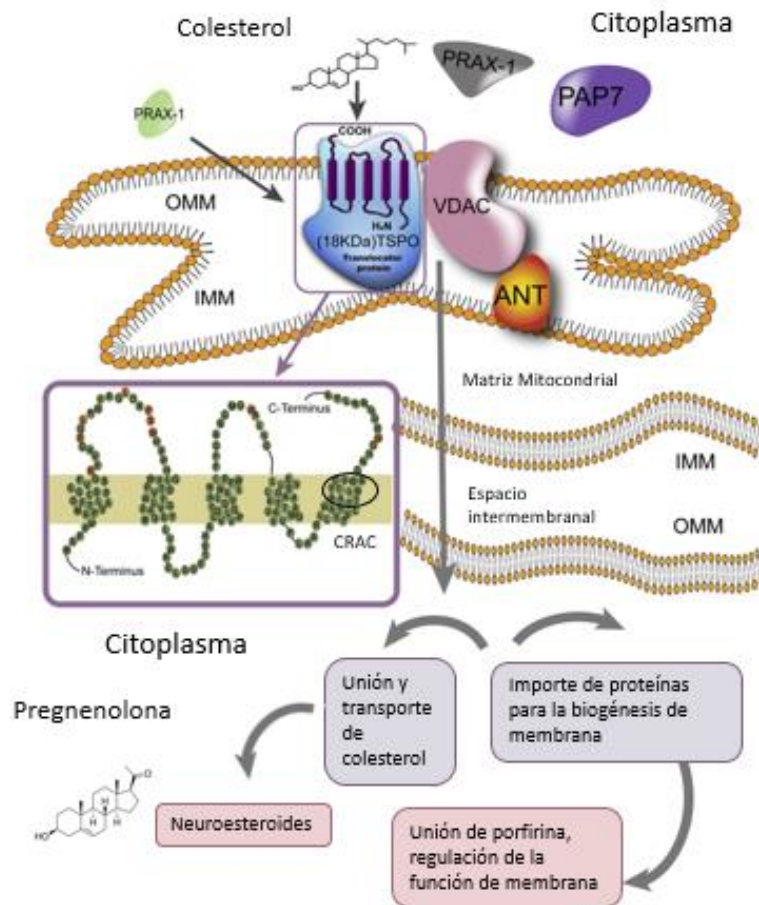


Figura 3 Estructura y Función de TSPO. Proteína translocadora 18kDa (TSPO) forma un complejo al interactuar con el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) y el translocador de nucleótidos de adenina (ANT) en los sitios de contacto de la membrana externa. La secuencia de consenso de aminoácidos de reconocimiento de colesterol (CRAC) es la responsable de unir al colesterol para que pueda entrar a la mitocondria, dando como resultado la producción de neuroesteroides como la Pregnenolona. Proteína 1 asociada a PBR (PRAX-1), proteína quinasa A (PKA), subunidad reguladora de proteína asociada a Riα (PAP7), Membrana mitocondrial interna (IMM), membrana mitocondrial externa (OMM). Modificado de Zhang et al., 2020.

Otra función atribuida a TSPO es la regulación de la apertura de mPTP (poro de transición de permeabilidad mitocondrial). El mPTP está formado por el ensamblaje de componentes clave, como el canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC) y el transportador de nucleótidos de adenina (ANT). La apertura de mPTP interrumpe la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP, lo que da como resultado el agotamiento de la energía, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, la generación de ROS mitocondriales y la liberación de proteínas pro-apoptóticas. En última instancia, estos procesos contribuyen a la muerte celular programada (Lee et al., 2020). De igual manera, TSPO juega un papel importante en los procesos de respiración de la célula, alterando el estado REDOX y regulando el flujo de Ca^{2+} . La sobre-expresión de TSPO impide la captación de Ca^{2+} por la molécula VDCA, derivando en la generación de ROS. El exceso de glutamato desencadena este mecanismo con la participación de TSPO conduciendo a una posible muerte neuronal (Gatliff et al., 2017).

Originalmente, se pensaba que la expresión de TSPO en el cerebro era específica de células del sistema inmune, como microglía activada y macrófagos infiltrantes. Sin embargo, ahora está bien establecido que los astrocitos reactivos también expresan TSPO, aunque con un perfil espaciotemporal diferente; también se encuentra en ciertas neuronas del SNC (Rupprecht et al., 2010). TSPO ha sido fuertemente implicada tanto en desordenes psiquiátricos como en enfermedades neurodegenerativas.

La expresión de TSPO en microglía está directamente relacionada con la extensión de la lesión y las mitocondrias deficientes de TSPO carecen de energía, por lo que la expresión de TSPO es esencial para la actividad y activación de la microglía (Yao et al., 2020). Incluso, se ha observado que algunos ligandos de TSPO disminuyen la neuroinflamación como 1-(2-clorofenil)-N-metil-N-(1-metilpropil)-3-isoquinolinacarboxamida (PK11195), 7-cloro-5-(4-clorofenil)-1,3-dihidro-1-metil-2H -1,4-benzodiazepin-2-one (Ro5-4864), XBD173 y etifoxina (Lee et al., 2020; Rupprecht et al., 2010).

Los ligandos de TSPO también se han utilizado en la tomografía de emisión de positrones (PET). En parte el impacto de TSPO comenzó por la facilidad de generar ligandos de TSPO de manera sintética PK11195 y Ro5-4864 son los ligandos sintéticos clásicos de TSPO, ampliamente utilizados para la caracterización e identificación de neuroinflamación en el tejido cerebral (Revisado de Cagnin et al., 2007, Lee et al., 2016).

4.3.3.1 TSPO en la EA y la AAC

La expresión de TSPO es de particular interés en enfermedades neurodegenerativas, lesiones cerebrales y cáncer cerebral, así como respuestas al estrés y posiblemente también trastornos de ansiedad. Estudios en modelos animales de EA y en pacientes humanos han determinado que las células cerebrales que tienen una sobre-expresión de TSPO son la microglía, astrocitos y células endoteliales (Tournier et al., 2020).

El aumento de TSPO en células de la glía en enfermedades y daño cerebral puede ser parte de un mecanismo de adaptación del organismo, debido a su participación en el transporte de colesterol a la mitocondria. El colesterol dentro de la mitocondria se convierte en pregnenolona, lo que es beneficioso para el cerebro ya que se ha demostrado que sus derivados tienen efectos neuroprotectores.

Por otra parte, la presencia de TSPO en cerebros de pacientes con EA se ha asociado con un incremento en la síntesis de esteroides neuroprotectores como la pregnenolona, decrecimiento en la neuroinflamación y reducción de ROS. Como consecuencia disminuye la actividad neurotóxica de A β mejorando la cognición y la memoria (Jung et al., 2020).

Algunos estudios incluso sugieren que primero hay un aumento de TSPO en astrocitos antes que en microglía. En un estudio en ratas TSPO se expresó en astrocitos meses antes que en la microglía, también perpetuando la idea de que en un inicio la microglía tiene un fenotipo M2. (Tournier et al.,

2020). En particular, los roles funcionales de TSPO en la eliminación de glutamato y la esteroidogénesis sugieren que TSPO está implicado en procesos clave de la EA.

4.3.4 Otros mecanismos de neuroinflamación

Además de las células de la glía, también se requiere la presencia de otras células que asisten en interpretar y propagar las señales inflamatorias dentro del SNC como las células endoteliales, que permiten la diapédesis de algunas células del Sistema Inmune Periférico (SIP) así como la producción de algunas citocinas, y los macrófagos asociados a cerebro (BAM) (DiSabato et al., 2016), algunas veces se considera BAM a las células de origen mieloide, además de la microglía, incluyendo a macrófagos y monocitos (Revisado de Gopinath et al., 2020).

Las células endoteliales responden a la acumulación endotelial de A β polarizándose hacia un estado proinflamatorio, lo que, en consecuencia, genera células en apoptosis y un deterioro en el ciclo celular (Deng et al., 2022). Las células endoteliales cerebrales expresan receptores como TLR2, TLR3, TLR4 y TLR6, así como receptores de quimiocinas y TNFR. Al expresar estos PRR, las células endoteliales producen citocinas inflamatorias como y también regulan el reclutamiento de leucocitos mediante la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 e ICAM-1 (Wu et al., 2017). Además, las células endoteliales cerebrales liberan TNF- α y regulan la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) que interviene en el daño tisular (García-Bonilla et al., 2014).

Existe una cercana comunicación entre el SIP y las células de la glía del SNC. Se ha propuesto que incluso en homeostasis, las células CD4+ pueden ser necesarias para la maduración de la microglía y se han descrito como residentes del cerebro de humano y de ratón (Pasciuto et al., 2020). De manera importante y debido a que las células del SIP pueden alcanzar el SNC, tras estar en contacto con la glía, pueden participar diferencialmente en la modulación de las tasas de progresión de la enfermedad, dependiendo de su fenotipo (Garfias et al., 2019).

Los BAM residen en las leptomeninges, los espacios perivasculares a lo largo de la vasculatura y en los plexos coroides. (Drieu et al., 2022). Los BAM están constantemente en contacto directo con el LCR y son capaces de regular su dinámica de flujo. Estudios previos han sugerido un papel perjudicial para estos macrófagos en la hipertensión crónica, la EA, los accidentes cerebrovasculares y la encefalomiелitis autoinmune experimental (Drieu et al., 2022). En situaciones patológicas se infiltran a parénquima y es probable que cambien la lectura de algunos marcadores mieloides que son también usados para identificar a la microglía.

Es importante resaltar las diferencias entre machos y hembras en este contexto, ya que la EA es más prevalente en mujeres. En general, tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa son más robustas en hembras que en machos, en diversas especies (Revisado de Klein & Flanagan, 2016). Del mismo modo, en la neuroinflamación, se observan diferencias en la respuesta de los astrocitos y la microglía a un estímulo inflamatorio, siendo más pronunciada en hembras (Villa et al., 2018). Además, tras la administración de un estímulo inflamatorio, se ha observado un aumento en la expresión de TSPO en hembras (Santos Galindo et al., 2011). Una de las explicaciones de estas

diferencias radica en que durante la menopausia, los niveles de estrógeno, una hormona con funciones neuroprotectoras en el cerebro de las mujeres, experimentan una disminución significativa, lo que aumenta la activación de astrocitos y microglía, así como la expresión de marcadores inflamatorios como TSPO (Rapp et al., 2003).

4.4 MODELOS ANIMALES CON PATOLOGÍA TIPO ALZHEIMER Y AAC

Se ha descrito la aparición de EA en pocas especies no humanas. Algunos mamíferos, incluidos perros y primates, expresan naturalmente una secuencia A β idéntica a la de los humanos (Revisado de Cotman y Head, 2008; Revisado de Walker y Jucker, 2017).

Ciertos aspectos de la EA como la edad de aparición, y el desarrollo de la patología son muy variables entre pacientes y la presencia y cantidad de las diferentes especies de A β son factores que influyen en la progresión del deterioro cognitivo (Drummond et al., 2017; Huang, et al., 2020). La utilización de modelos animales permite observar distintos rasgos patológicos y manipulación de condiciones para su observación.

Para el estudio de la EA se han desarrollado alrededor de 100 líneas de ratones transgénicos (Janowsky et al., 2017), lo que ha permitido que haya informes sobre la acumulación de A β , la cognición y la neuroinflamación. En los primeros modelos que se desarrollaron se enfocaron en reproducir la patología amiloidea a través de la producción de APP (Games et al., 1995). Desde este primer estudio a la fecha se utilizan por lo menos 50 modelos que sobre-expresan APP (Kitasawa et al., 2012).

La mayoría de los modelos animales de EA (Tg2576, APPSwe/PSEN1E9, APP23, APPSwe \times PS1 y 3xTg-AD) reproducen la misma especificidad de la acumulación de A β , observando mayor deposición en hembras. Además, los modelos animales mostraron un desempeño conductual más pobre en comparación con animales control (Lee JY et al., 2002; Halford et al., 2002; Revisado de Sturchler-Pierrat et al., 2009; Anderson et al., 2000; Carroll et al., 2003; Mitsuru et al., 2010).

Por su parte, AAC ocurre naturalmente en una gran variedad de animales, incluidos primates no humanos, gatos y perros. El desarrollo espontáneo de AAC promueve el uso de estos modelos, ya que se asemejan a AAC esporádicos en humanos de edad avanzada (Jäkel et al., 2017). Sin embargo, su longevidad y la edad relativamente tardía del inicio de AAC, los altos costos, entre otros aspectos restringen su uso. Los modelos de ratones transgénicos varían en el grado de AAC y el grado de coexistencia de placas parenquimatosas, pero brindan algunos conocimientos clave, como el hecho de que el A β vascular es principalmente de origen neuronal, ya que en la mayoría de los animales la expresión del transgén es impulsada por un promotor neuronal. Igualmente, los estudios con animales ayudaron a determinar que la AAC se debe a una eliminación alterada de A β por el drenaje perivascular, y que la relación A β_{40} /A β_{42} determina en gran medida si el péptido se acumula en el parénquima cerebral o en las paredes de los vasos (Jäkel et al., 2017).

4.4.1 PATOLOGÍA CEREBRAL EN RATONES Tg-SwDI

Uno de los modelos murinos para los estudios de la patología conjunta tipo Alzheimer y AAC es la cepa llamada Tg-SwDI. Estos ratones expresan el transgén APP humano de la isoforma 770, que contiene las mutaciones Swedish (K670N / M671L), Dutch (E693Q) e Iowa (D694N). En la mutación Swedish (KM670/671NL), hay un cambio en dos aminoácidos, lo que conduce a una mayor escisión de APP por la β -secretasa, aumentando los niveles totales de $A\beta$. Específicamente, hay una mayor producción y secreción de $A\beta_{40}$ y $A\beta_{42}$ (LaFerla et al., 2007; Miao et al., 2005; Van Vickle et al., 2008).

Las mutaciones de APP Dutch e Iowa ocurren en las posiciones 22 y 23 del péptido $A\beta$, respectivamente. La mutación Dutch da como resultado la acumulación de $A\beta$ en las paredes de los vasos cerebrales. Y la mutación Iowa afecta la estructura del péptido, lo que resulta en la formación de un giro en lugar de un motivo de curvatura y genera una molécula más hidrofóbica. Estas mutaciones producen independientemente un fenotipo en el que prevalece la acumulación de especies $A\beta_{40}$. La acumulación masiva de $A\beta$ en la cerebrovasculatura de pacientes portadores de las mutaciones Dutch e Iowa da como resultado fragilidad vascular con hemorragias cerebrales y demencia (Miao et al., 2005; Van Vickle et al., 2008).

Una característica importante de los ratones Tg-SwDI es que el amiloide detectable comienza a acumularse a los 2 o 3 meses de edad en el subículo. La deposición inicial ocurre con depósito $A\beta$ difuso en el parénquima cerebral a los 3 meses (Miao et al., 2005). A esta edad, los ratones Tg-SwDI exhiben un aprendizaje espacial y una memoria deteriorados lo que coincide con el desarrollo de amiloide microvascular subicular, así como con un mayor número de astrocitos y microglía reactivos. La acumulación de $A\beta$ microvascular a los 6 meses ya es apreciable y los depósitos son extensos a los 12 meses de edad. En ciertas regiones del cerebro, como el tálamo y el subículo, el depósito $A\beta$ microvascular se vuelve muy extenso y afecta al 90% de los microvasos a los 2 años (Miao et al., 2005; Van Vickle et al., 2008; Jäkel et al., 2017). Todos estos hallazgos se sintetizan a continuación en la Figura 4.

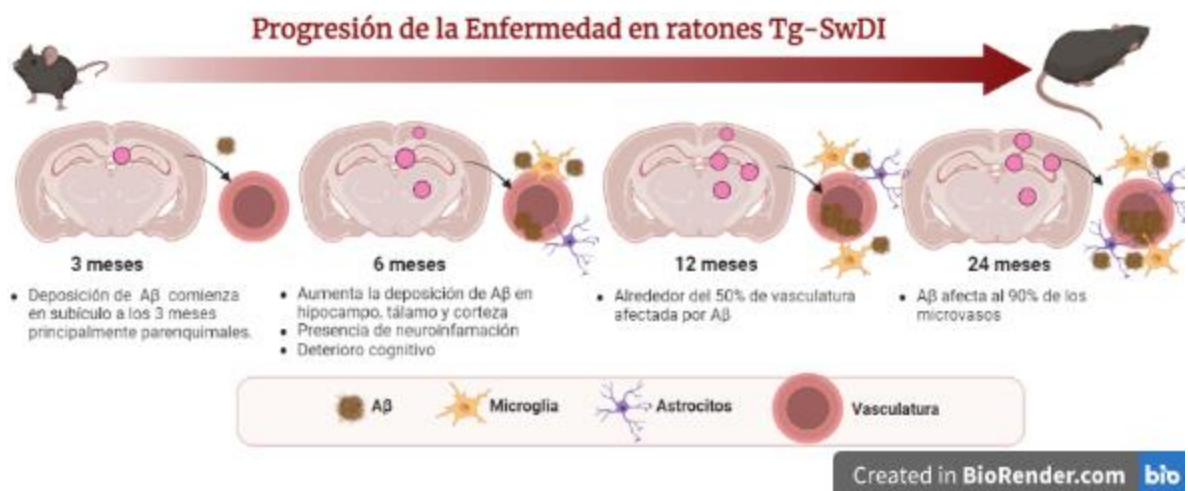


Figura 4 Representación esquemática de la progresión de la patología en ratones Tg-SwDI. Hecho en BioRender.com

En regiones cerebrales con acumulación extensa de A β vascular, como lo son tálamo y subículo, hay disminución significativa en las densidades vasculares, degeneración del pericito microvascular, presencia de células vasculares apoptóticas y pérdida de células de músculo liso de la pared vascular. Estos cambios indican los efectos degenerativos del amiloide vascular en ratones Tg-SwDI. La eliminación ineficaz de A β mutante Dutch/Iowa desde el cerebro a través de la BHE capilar hacia la circulación probablemente conduce a la formación extensa de depósito A β microvascular cerebral que penetra en el parénquima circundante. Este efecto es también conocido como angiopatía disórica en ratones Tg-SwDI (Miao et al., 2005). Se comprobó que la deficiente eliminación de A β en esta cepa es debido a las mutaciones Dutch e Iowa (Davis et al., 2006). Por otro lado, se observó que, si se introduce una mutación humana a APOE, hay menor presencia de A β vascular y mayor presencia de A β parenquimal (Xu et al., 2008).

El depósito de A β microvascular cerebral está acompañado por un aumento en el número de astrocitos reactivos y microglía activada, así como por niveles cerebrales elevados de las citocinas proinflamatorias IL-1 e IL-6 (Miao et al., 2005). En los ratones Tg-SwDI el aumento pronunciado en el número de astrocitos y microglía sucede desde los 6 meses de edad, especialmente en el tálamo y el subículo, y en menor medida en la corteza (Van Vickle et al., 2008). Está bien caracterizado que el número de astrocitos en el tálamo incrementa con la edad; además, en esta cepa se ha demostrado que algunos astrocitos pueden ser capaces de aumentar la producción de A β (Van Vickle et al., 2008).

La diferencia de los efectos de la patología entre machos y hembras en esta cepa es muy notoria, sobre todo en pruebas de daño cognitivo, en específico en tareas conductuales de memoria de trabajo tanto espacial como contextual y en microhemorragias, siendo todos estos más frecuentes en hembras (Maniskas et al., 2021). Un estudio más reciente encontró expresión aumentada de GFAP en hembras en comparación con machos, así como una disminución de la vasculatura en hembras (Setti et al., 2021).

Los ratones Tg-SwDI constituyen un modelo único e invaluable para investigar el depósito de A β vascular cerebral y parenquimal, así como sus efectos sobre la degeneración de la pared de los vasos y la neuroinflamación inducida por amiloide vascular (Miao et al., 2005; Van Vickle et al., 2008).

5 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las estrategias dirigidas al tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas se centran en encontrar el diagnóstico lo más temprano posible. Debido a que la neuroinflamación es un componente importante de las enfermedades neurodegenerativas, es de crucial importancia entender su desarrollo e influencia en la patogénesis y el deterioro cognitivo en la EA y la AAC. Anteriormente, se ha observado que el amplio depósito de A β vascular y parenquimal de inicio temprano en el modelo murino Tg-SwDI provoca una reacción inflamatoria grave caracterizada por microgliosis y astrocitosis que empieza desde los 6 meses. En este trabajo se busca responder a la pregunta ¿Cómo cambia la presencia y activación de la microglía, los astrocitos y la expresión de TSPO en el contexto de la EA y la AAC en relación con la presencia de A β vascular y parenquimal?

Al comprender mejor la secuencia de eventos relacionados con la neuroinflamación en estas enfermedades, podemos arrojar luz sobre posibles puntos de intervención terapéutica y, en última instancia, mejorar la calidad de vida de los pacientes.

6 HIPÓTESIS

Durante la acumulación de agregados amiloides en el modelo de patología conjunta tipo Alzheimer y AAC, la expresión de TSPO se incrementará con la edad en la microglía y astrocitos, así como la activación de microglia y astrocitos en el cerebro de ratones Tg-SwDI.

7 OBJETIVOS

7.1 Objetivo General

Evaluar la neuroinflamación en cerebros de ratones Tg-SwDI con patología conjunta tipo Alzheimer y AAC.

7.2 Objetivos Particulares

1. Evaluar la activación de astrocitos en cerebros de ratones Tg-SwDI de diferentes edades.
2. Evaluar la activación de microglía en cerebros de ratones Tg-SwDI de diferentes edades.
3. Evaluar la expresión de TSPO en cerebros de ratones Tg-SwDI de diferentes edades.
4. Analizar si existe una correlación entre la activación de astrocitos y microglía y la acumulación de agregados amiloides.
5. Evaluar si existe diferencia entre machos y hembras.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Animales

Los experimentos se realizaron siguiendo los protocolos aprobados por el Comité de Uso y Cuidado de Animales de nuestra Universidad (Protocolo ID: 209) y de conformidad con las pautas de los NIH para el uso de animales de experimentación. En el presente estudio utilizamos ratones macho y hembra de la cepa C57BL/6 y ratones transgénicos homocigotos que tienen la isoforma 770 humana de APP con las mutaciones Swedish K670N/M671L, Dutch E693Q e Iowa D694N (Tg-SwDI). Ambas cepas fueron adquiridas en The Jackson Laboratory, (USA) y se mantuvieron en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Las cajas de los animales se resguardaron bajo condiciones controladas de temperatura, humedad, períodos de luz/obscuridad de 12/12 horas y acceso de agua y comida *ad libitum*.

Se dividieron a los ratones por 5 grupos de edad, con base en el desarrollo de la patología en la cepa Tg-SwDI. Las edades analizadas de la cepa transgénica y silvestre se muestran en la Tabla 1. Se incluyeron tanto machos como hembras.

Tabla 1 Edad de los ratones Tg-SwDI y C57BL/6 utilizados en el estudio.

Ratones Tg-SwDI		Ratones C57BL/6	
Hembras n=6	Machos n=6	Hembras n=3	Machos n=3
15-16 meses	15-16 meses	15-16 meses	15-16 meses
12 meses	12 meses		
9 meses	9 meses		
6 meses	6 meses		
3 meses	3 meses		

El inventario de anticuerpos utilizados para el análisis por inmunofluorescencia se presenta a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2. Lista de anticuerpos utilizados

Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo Secundario	Dilución
Ratón anti-A β (6E10) (BioLegend)	1:1000	Cabra anti-IgG1de ratón Alexa Fluor 488	1:250
Conejo anti-Iba-1 (Wako labs, USA)	1:800	Cabra anti-IgG de conejo Alexa Fluor 594	1:500
Ratón anti-GFAP (Invitrogen CA, USA)	1:1500	Cabra anti IgG1de ratón Alexa Fluor 594	1:500
		Cabra anti IgG1de ratón Alexa Fluor 488	1:250
Conejo anti-GFAP (Invitrogen MD, USA)	1:250	Cabra anti IgG de conejo Alexa Fluor 594	1:500
Conejo anti-TSPO (Abcam, MA USA)	1:400	Cabra anti-IgG de conejo Alexa Fluor 594	1:500
		Cabra anti-IgG de conejo Alexa Fluor 488	1:250
Rata anti-Iba-1 (Invitrogen CA USA)	1:500	Cabra anti-IgG2a de rata Alexa Fluor 594	1:500

8.2 Preparación de tejidos

Se anestesió a los ratones por inhalación de Sevoflurano (Abbot Lab), rápidamente se les realizó una perfusión cardíaca ventricular con una solución amortiguadora de fosfatos con glucosa (GKN) a 4°C y se extrajo el cerebro.

8.3 Inmunofluorescencia

Un hemisferio del cerebro de cada ratón se fijó en una solución de paraformaldehído al 4% por 24 h a 4°C. Posteriormente se deshidrataron en una solución de sacarosa al 10%, 20% y 30% en PBS por 24 horas respectivamente. Una vez deshidratados, los tejidos se mantuvieron en TissuePlus (Fisher HealthCare) y se cortaron en congelación en un crióstato (Kedee, KD2850) en cortes coronales de 30 μ m de grosor entre -1.6 mm y 1.2 mm de bregma. Se incubó cada corte de tejido individualmente en agitación en 500 μ L de solución salina amortiguadora de Tris (Tris 50 mM/NaCl 150 mM/pH 7.2) (TBS1x) a temperatura ambiente por 5 min, luego se realizó la exposición de epítomos con 500 μ L de amortiguador de citratos (ácido cítrico 0.1 M/Tween 20 al 0.05%/ pH 6.0) durante 30 min a 60°C. Posteriormente se lavaron los tejidos en agitación con 500 μ L TBS 1x por 5 min a temperatura ambiente, a continuación se permeabilizaron en agitación con 500 μ L TBS A (TBS 1x/Tritón x-100 0.1%) por 15 min, se llevó a cabo el bloqueo en agitación con 500 μ L TBS B (TBS A/BSA 2%) por 20 min y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes: anticuerpo monoclonal 6E10 (anti-A β 42); anticuerpo de conejo anti-Iba-1 (Wako labs, USA, 1:100); anticuerpo de ratón anti-GFAP

(Invitrogen CA, USA, 1:500) o anticuerpo de conejo anti-TSPO (Abcam, MA, USA, 1:400) en 100 μ L de diluyente de anticuerpos (TBS A/Suero Normal de Cabra 5%), toda la noche en agitación a 4°C. Al día siguiente, los cortes se lavaron con 500 μ L de TBS 1x, TBS A y TBS B, por 5 min en agitación, respectivamente. Se agregaron los anticuerpos secundarios correspondientes: anti-IgG de conejo AF 594 (Invitrogen CA USA, 1:500), anti-IgG1 de ratón AF 488 (Invitrogen CA, USA, 1:500) o anti-IgG de conejo AF 488 (Invitrogen CA, USA, 1:250) en 100 μ L de diluyente de anticuerpos, se incubaron 1 h en agitación a temperatura ambiente y se lavaron igual que antes. Finalmente, el tejido se inmovilizó sobre un portaobjetos, se agregó medio de montaje VectaShield (Vector Labs) y se colocó un cubreobjetos. Las observaciones se realizaron en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse Ci) equipado con una cámara (Olympus DP17) para capturar las imágenes de las muestras.

8.4 Cuantificación de Intensidad de Fluorescencia utilizando ROIs (Regions of Interest).

Se utilizó el programa ImageJ (versión 1.53 k. Software público, NIH, USA). Se fijó la escala en milímetros utilizando la barra de escala. Se modificó la imagen a 8-bit para generar una imagen en tonos de grises, se duplicó la imagen y se estableció el valor umbral (Threshold) para reconstruir la imagen original con el fin de seleccionar las regiones de interés (ROI). Posteriormente se aplicaron las ROIs en la imagen de tono de grises. Finalmente se realizó la cuantificación de la densidad integrada de fluorescencia (Int Den).

8.5 Análisis estadístico.

Se graficaron los datos normalizados de Int Den con respecto a 3 meses para todos los análisis realizados. Los datos obtenidos se compararon mediante ANOVA de dos vías seguido de una prueba de Tukey post-hoc para comparar más de dos grupos experimentales y la prueba t de Student para comparar dos grupos experimentales; los datos aberrantes fueron eliminados mediante la prueba ROUT.

Para considerar diferencia significativa tomamos los datos $p < 0.05$ y consideramos los valores de significancia estadística como $p < 0.05$ (*/#), $p < 0.01$ (**/##), $p < 0.001$ (***/###) y $p < 0.0001$ (****/####). Los análisis estadísticos se realizaron con el software GraphPad Prism 8.0.2.

9. RESULTADOS

9.1 Delimitación de las regiones del hipocampo y del tálamo

Para realizar la cuantificación de la expresión de las moléculas analizadas, se tomaron las fotografías de las tinciones de inmunofluorescencia con el objetivo de 4x, de manera que se pudiera observar completamente las regiones de nuestro interés: el hipocampo y el tálamo. Debido a la diferencia en las regiones del hipocampo, se cuantificó por separado la región de CA1 y GD, delimitándolas como se muestra en la Figura 5-A. De modo que se analizaron por separado las tres regiones del cerebro, como se indica en la Tabla 3.

Tabla 3. Regiones del cerebro analizadas en Inmunofluorescencia

Región
CA1
Giro Dentado
Tálamo

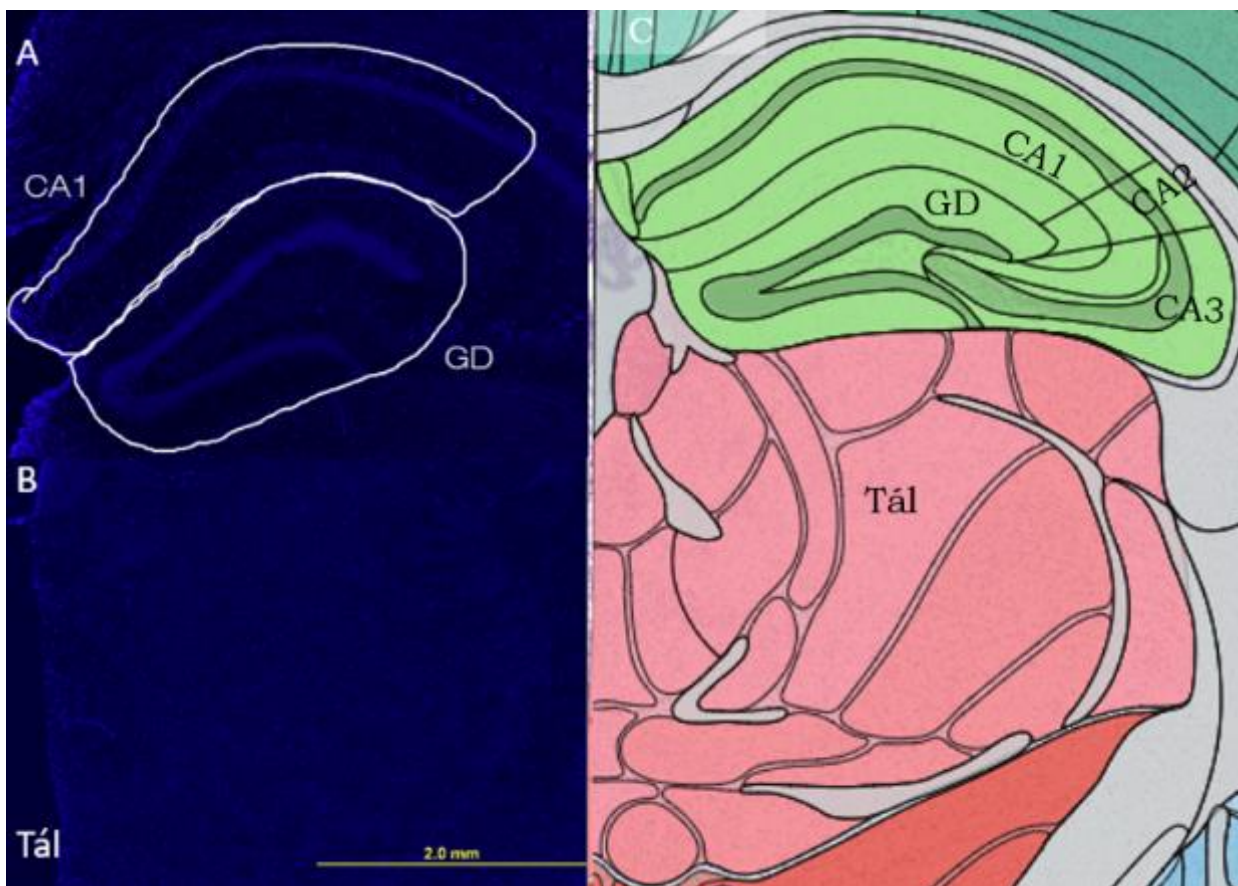


Figura 5. Selección de áreas para la cuantificación en corte coronal a -1.655 mm de Bregma. A. Definición de las áreas del hipocampo: CA1 y GD B.Tálamo. Núcelos teñidos con DAPI. Escala de 2 mm C. Anotaciones anatómicas del Allen Mouse Brain Atlas y Allen Reference Atlas - Mouse Brain. CA *Cornu amonnis*, GD Giro Dentado y Tál Tálamo.

9.2. Caracterización de microglía en ratones Tg-SwDI con patología conjunta tipo EA y AAC

Se determinó la presencia y activación de microglía. Para este fin se buscó detectar Iba-1 mediante inmunofluorescencia. Se utilizó el valor de Densidad Integrada de Fluorescencia (Int Den) para tomar en cuenta tanto el área como la intensidad de fluorescencia.

En CA1 de ratones hembra se observó un aumento de la expresión de Iba-1, con respecto a los 3 meses, en animales de 12 y 15 meses. En el GD y en el tálamo, encontramos que la expresión de Iba-1 aumenta a los 6 meses y, en adelante, todas las edades presentan diferencia con respecto a los ratones de 3 meses (Figura 6-A).

En las imágenes representativas (Figura 6-B), se observa un aumento de la expresión de Iba-1, con respecto a los 3 meses, en las regiones CA1, GD y tálamo. De manera interesante, en tálamo se observan cúmulos de microglía a los 6 meses únicamente, a los 9 meses se disipan y en edades posteriores ya no se observan.

En comparación con los ratones Tg-SwDI, la expresión de Iba-1 es muy baja en todas las regiones de los ratones C57BL/6. Se compararon ratones C57BL/6 y Tg-SwDI de 15-16 meses y se encontraron diferencias en todas las regiones analizadas, siendo más notorio en GD.

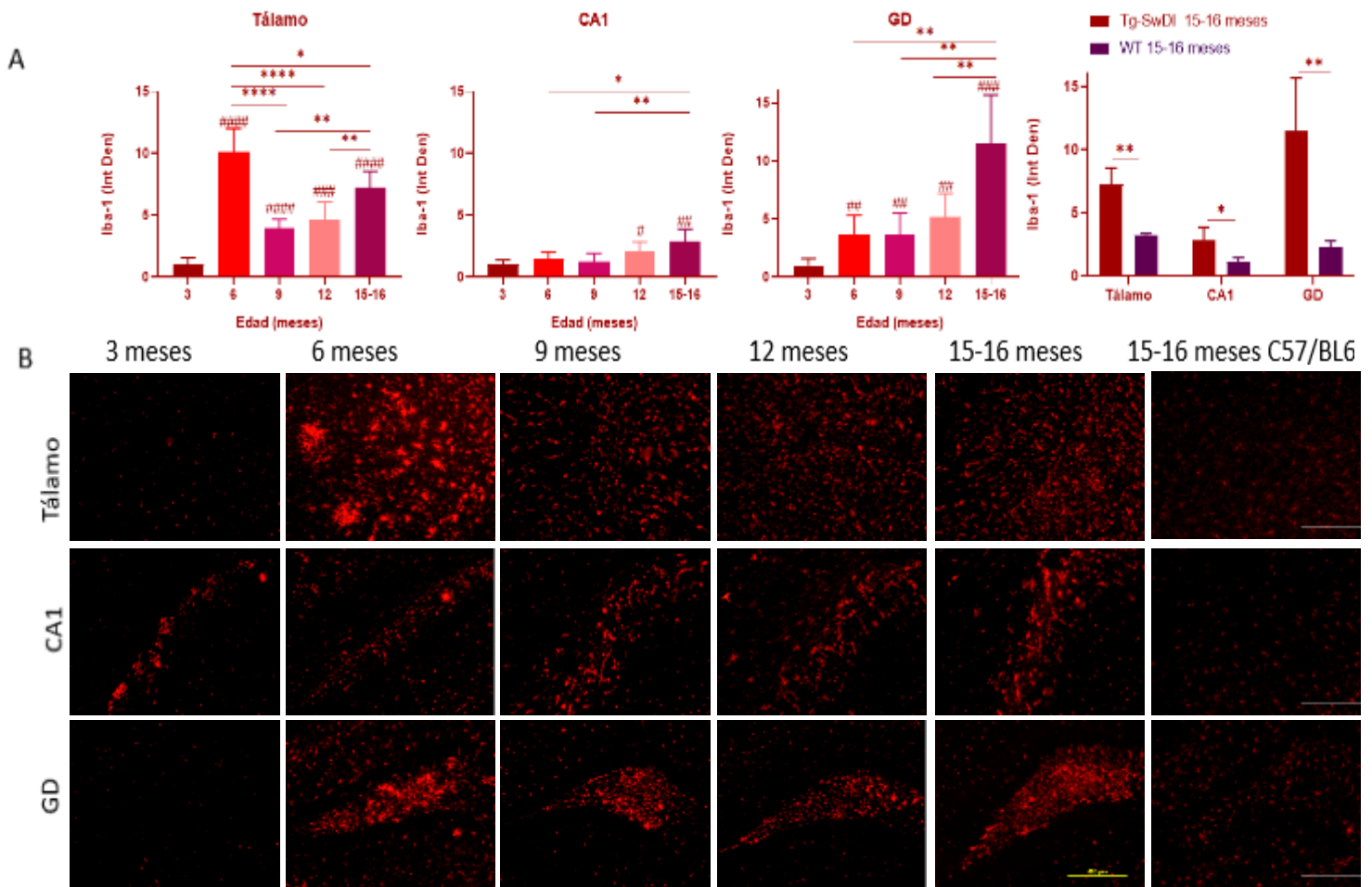


Figura 6. Cambios relacionados con la edad de la presencia de microglía en ratones Tg-SwDI hembra de 3, 6, 9, 12 y 15 meses. (A) Gráficas de cuantificación de la expresión de Iba-1 en Tálamo, CA1 y Giro dentado (GD), se muestra Densidad Integrada (Int Den). Los * indican * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$ Los símbolos # son para denotar diferencia significativa ($p < 0.05$) entre grupos de edad y 3 meses (B) Imágenes representativas de Inmunofluorescencia de la expresión de Iba-1 en Tálamo, CA1 y Giro dentado (GD), respectivamente. Los cerebros fueron cortados en cortes coronales y fueron incubados toda la noche a 4°C con anticuerpo policlonal de conejo anti-Iba-1. Se usó un anticuerpo secundario hecho en cabra Alexa Fluor 594 anti-IgG de conejo. Escala de $500\ \mu\text{m}$.

En cuanto a los ratones macho, encontramos que en el tálamo la expresión de Iba-1 aumenta a los 6 meses, se mantiene a los 9 meses y aumenta a los 15 meses. Por otro lado, en CA1 encontramos un aumento con respecto a los 3 meses en animales de 15 meses. En GD, observamos un aumento en la expresión de Iba-1 a los 6 meses, seguido de un aumento a los 9 meses y nuevamente a los 15 meses.

Las imágenes representativas (Figura 7-B), ratifican la información de las gráficas, donde observamos que a los 3 meses hay muy poca expresión de Iba-1. Posteriormente, a los 6 meses comienza el

aumento de la expresión de Iba-1, como pasa con las hembras, algunos ratones macho presentan cúmulos de microglía en tálamo y desde los 9 meses en adelante la microglía se distribuye en toda la región del tálamo. A medida que avanza la edad, las células de la microglía abarcan toda la región de CA1 y GD.

Los ratones C57BL/6 expresan menos Iba-1 con respecto a los ratones Tg-SwDI en todas las regiones y, al igual que en las hembras, la morfología de la microglía es de un cuerpo celular reducido.

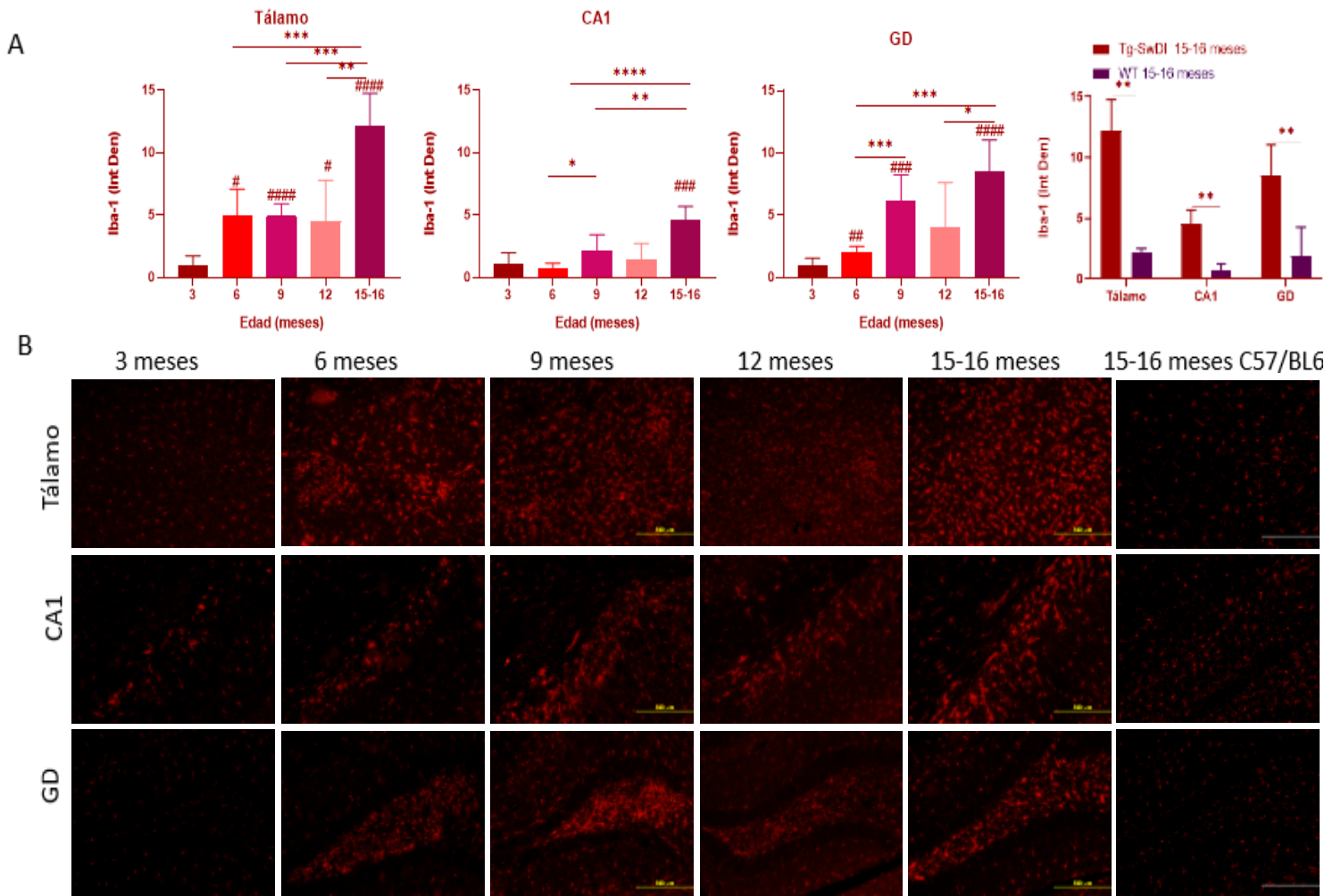


Figura 7. Cambios relacionados con la edad de la presencia de microglía en ratones Tg-SwDI macho de 3, 6, 9, 12 y 15 meses. (A) Gráficas de cuantificación de la expresión de Iba-1 en Tálamo, CA1 y Giro dentado (GD), se muestra Densidad Integrada (Int Den). Los * indican * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$ Los símbolos # son para denotar diferencia significativa ($p < 0.05$) entre grupos de edad y 3 meses (B) Imágenes representativas de Inmunofluorescencia de la expresión de Iba-1 en Tálamo, CA1 y Giro dentado (GD), respectivamente. Los cerebros fueron cortados en cortes coronales y fueron incubados toda la noche a 4°C con anticuerpo policlonal de conejo anti-Iba-1. Se usó un anticuerpo secundario hecho en cabra Alexa Fluor594.anti-IgG de conejo. Escala de $500\ \mu\text{m}$.

Para localizar la microglía con respecto a la presencia de A β se realizó una doble tinción: la microglía fue marcada con un anticuerpo primario anti-Iba-1 y un anticuerpo secundario AF594 (rojo), y para A β se usó un anticuerpo primario anti-A β y un anticuerpo secundario AF488 (verde). Se analizaron tejidos de 3, 6 y 15-16 meses.

Observamos la deposición de A β en la capa piramidal de CA1 desde los 3 meses, lo que comienza a activar algunas células de microglía; a los 6 meses se extiende a otras regiones de CA1 como el *stratum oriens* y el *stratum radiatum*, en esta edad la microglía se observa con una morfología con un soma más ancho y proyecciones más cortas. A los 15 meses hay más acumulación de A β así como más expresión de Iba-1 (Figura 8).

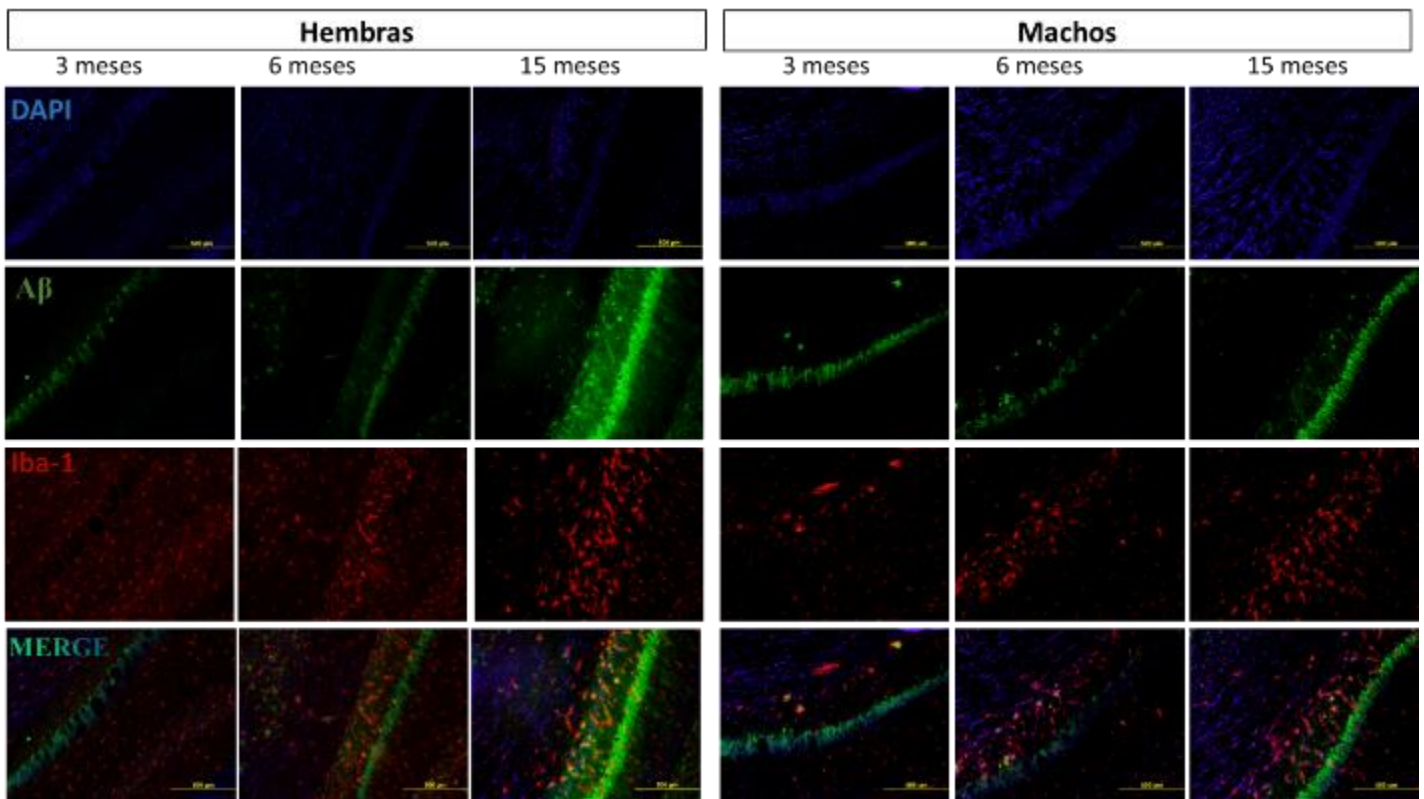


Figura 8. Respuesta de la microglía a la presencia de A β en CA1 de ratones Tg-SwDI. Imágenes representativas de la localización de microglía (Iba-1, rojo) con A β (verde) de CA1 de ratones Tg-SwDI de 3, 6 y 15 meses. Núcleos teñidos con DAPI. Los cerebros fueron cortados en cortes coronales y fueron incubados toda la noche a 4°C con anticuerpo policlonal de conejo anti-Iba-1 y anticuerpo monoclonal de ratón anti-A β . Se usó un anticuerpo secundario hecho en cabra Alexa Fluor 594 anti-IgG de conejo y un anticuerpo secundario hecho en cabra Alexa Fluor 488 anti-IgG1 de ratón. Escala de 200 μ m.

En GD encontramos activación de microglía hasta los 6 meses, adyacente a la deposición de A β presente, como se puede observar tanto en machos como en hembras. A los 15 meses la deposición de A β se encuentra en todo el GD y la microglía se encuentra activada alrededor (Figura 9).

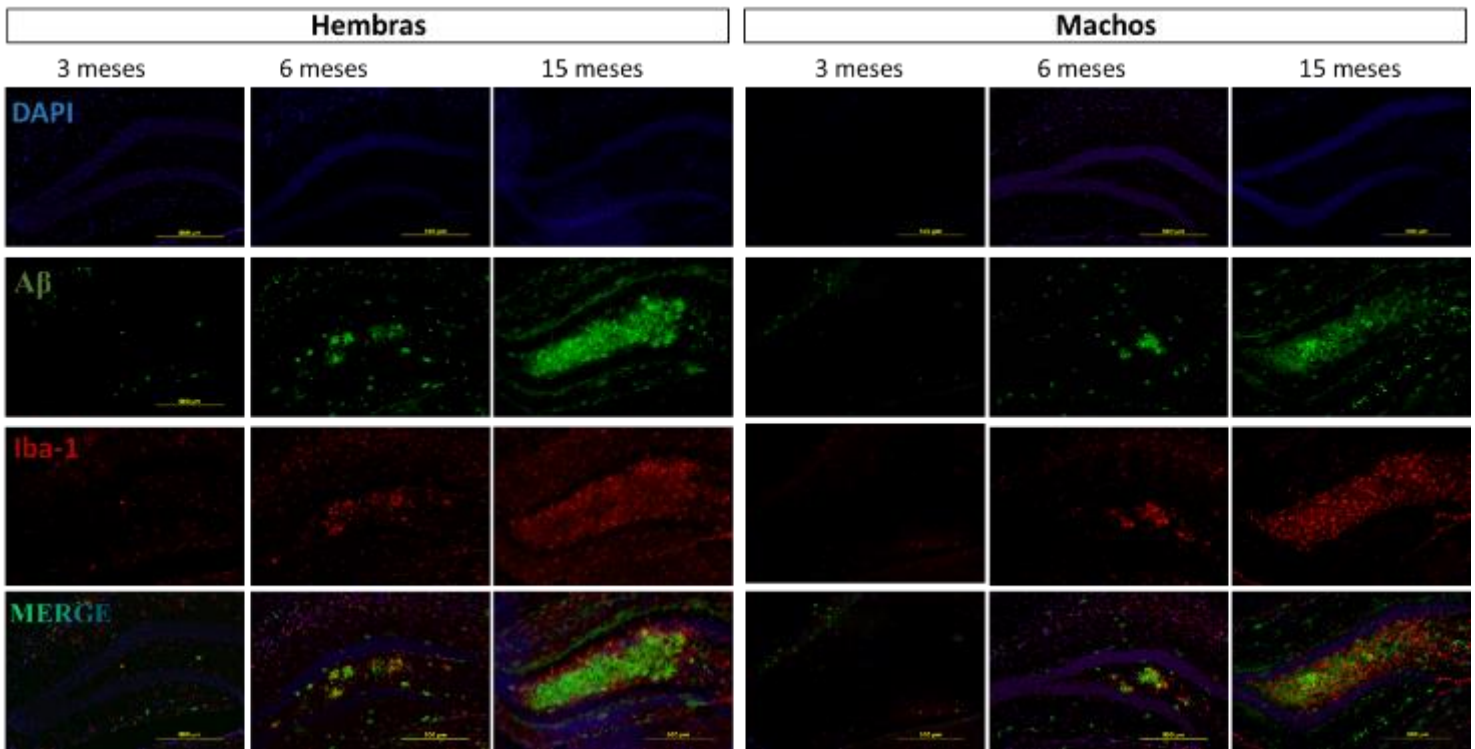


Figura 9. Respuesta de la microglía a la presencia de A β en Giro Dentado de ratones Tg-SwDI. Imágenes representativas de la localización de microglía (Iba-1, rojo) con A β (verde) del Giro Dentado de ratones Tg-SwDI de 3, 6 y 15 meses. Núcleos teñidos con DAPI. Los cerebros fueron cortados en cortes coronales y fueron incubados toda la noche a 4°C con anticuerpo policlonal de conejo anti-Iba-1 y anticuerpo monoclonal de ratón anti- A β . Se usó un anticuerpo secundario hecho en cabra Alexa Fluor 594 anti-IgG de conejo y un anticuerpo secundario hecho en cabra Alexa Fluor 488 anti-IgG1 de ratón. Escala de 200 μ m.

En el tálamo (Figura 10), a los 3 meses se observa muy poca presencia de A β , a su vez, la microglía presente se encuentra ramificada, con soma pequeño y con muy poca expresión de Iba-1. A los 6 meses se observan acumulaciones de células de la microglía más brillantes y con las proyecciones más cortas rodeando la deposición de A β ; estos cúmulos son más comunes en hembras. A los 15 meses A β se ha extendido por todo el tálamo, al igual que la presencia de la microglía, pero sin formar cúmulos tanto en hembras como en machos.

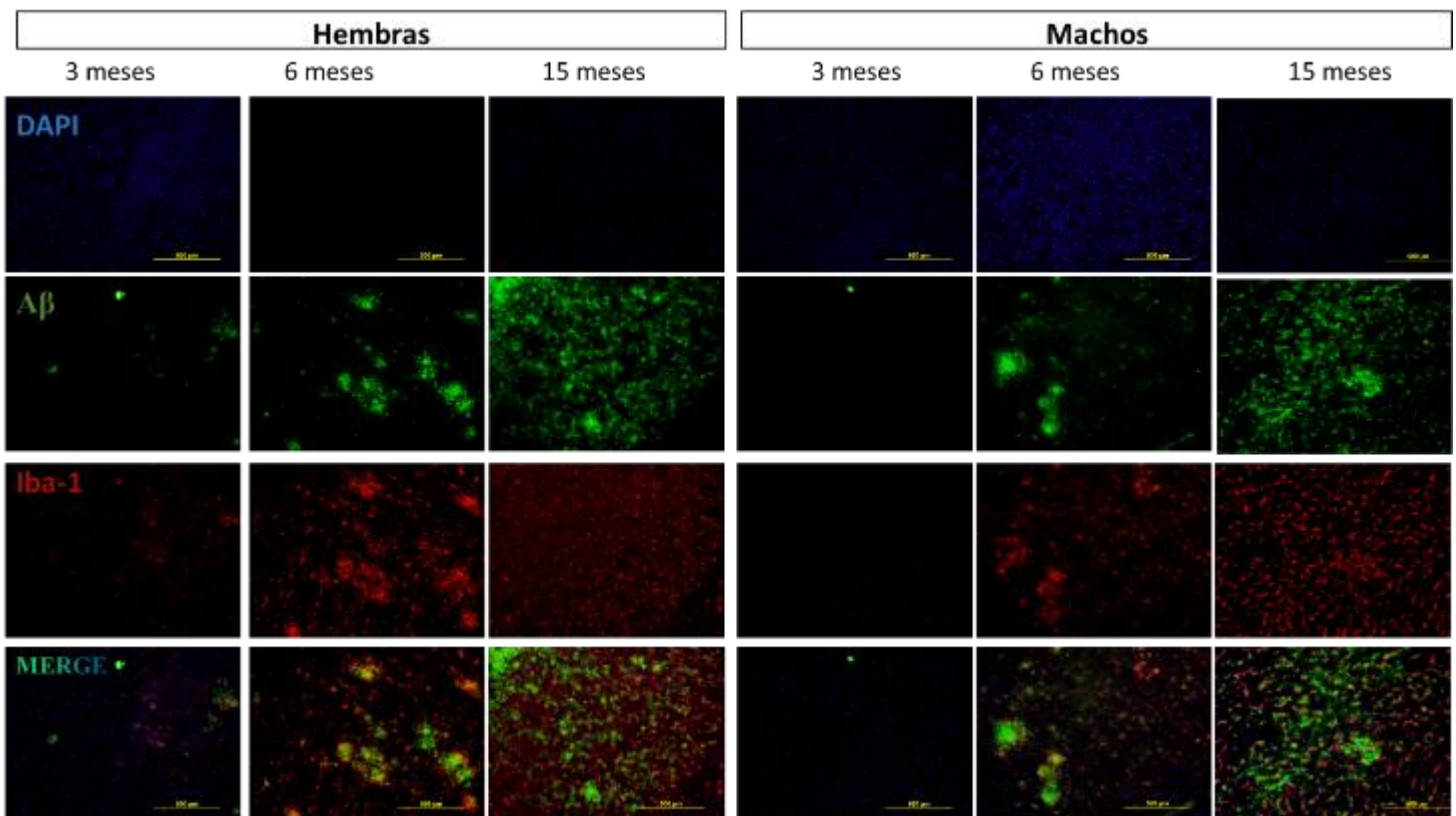


Figura 10. Respuesta de la microglía a la presencia de A β en Tálamo de ratones Tg-SwDI. Imágenes representativas de la localización de microglía (Iba-1, rojo) con A β (verde) del tálamo de ratones Tg-SwDI de 3, 6 y 15 meses. Núcleos teñidos con DAPI. Los cerebros fueron cortados en cortes coronales y fueron incubados toda la noche a 4°C con anticuerpo policlonal de conejo anti-Iba-1 y anticuerpo monoclonal de ratón anti- A β . Se usó un anticuerpo secundario hecho en cabra Alexa Fluor 594 anti-IgG de conejo y un anticuerpo secundario hecho en cabra Alexa Fluor 488 anti-IgG1 de ratón. Escala de 200 μ m.

Como se aprecia en la Figura 11, en un aumento mayor de la imagen del tálamo, las células de microglía se encuentran rodeando los agregados amiloides formando varios cúmulos. Dentro de los conglomerados observados, resaltados con las flechas blancas, se observa que las células de la microglía son ligeramente más redondas y sin tantas proyecciones en comparación con las células que no se encuentran en contacto con el péptido.

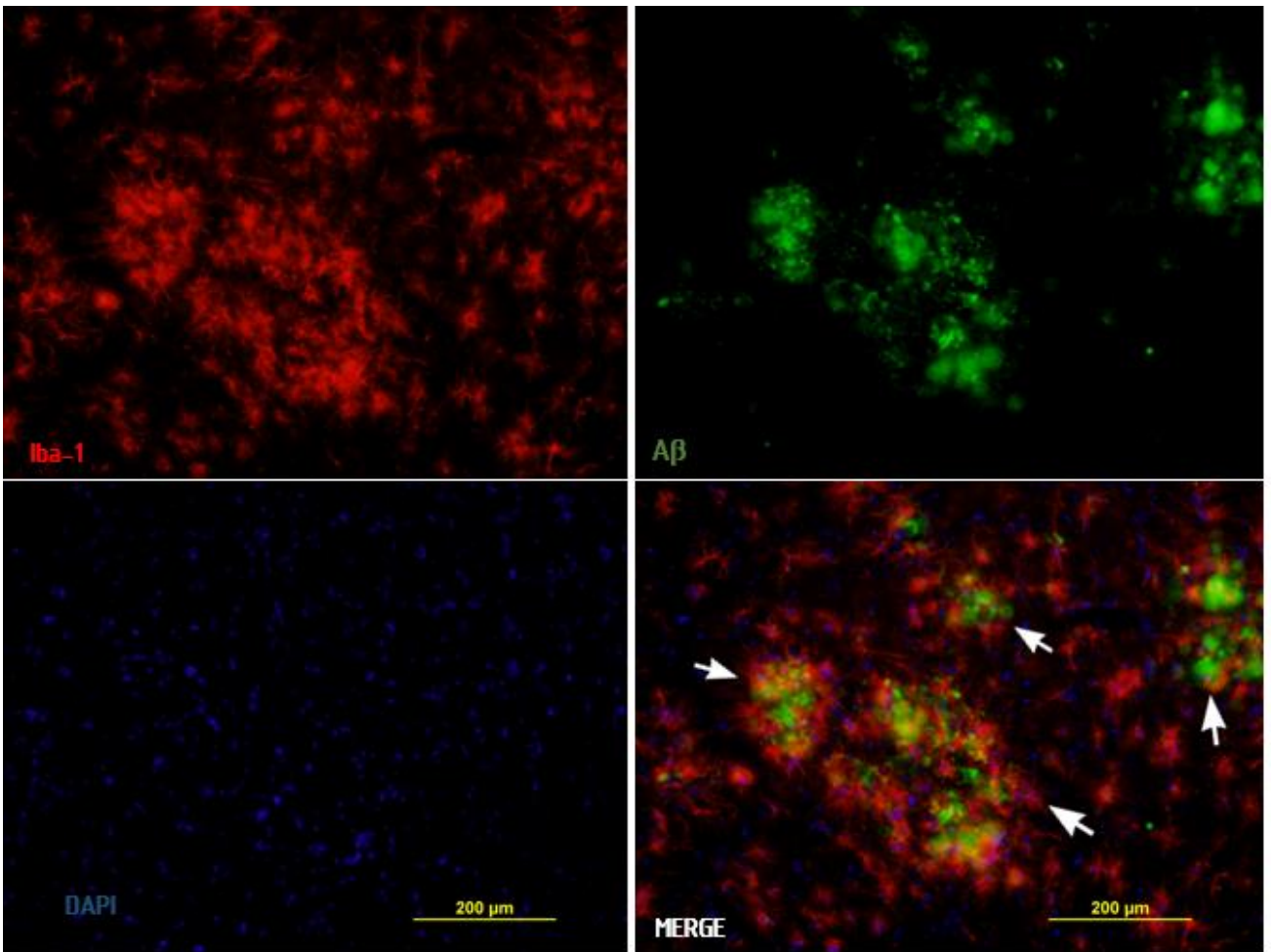


Figura 11. Conglomerados de microglía rodeando placas A β . Imágenes representativas de la localización de microglía (Iba-1, rojo) con A β (verde) del tálamo de ratones Tg-SwDI de 6 meses. Núcleos teñidos con DAPI. Los cerebros fueron cortados en cortes coronales y fueron incubados toda la noche a 4°C con anticuerpo policlonal de conejo anti-Iba-1 y anticuerpo monoclonal de ratón anti-A β . Se usó un anticuerpo secundario hecho en cabra Alexa Fluor 594 anti-IgG de conejo y un anticuerpo secundario hecho en cabra Alexa Fluor 488 anti-IgG1 de ratón. Escala de 200 μ m.

Se eligió la región del tálamo con la finalidad de llevar a cabo una comparación más centrada en la morfología (Figura 12). La microglía de los ratones viejos Tg-SwDI tiene el soma muy redondeado y

no se aprecian claramente sus procesos. Por otro lado, por su localización, da la impresión de que siguen el trayecto de los vasos sanguíneos, a diferencia de la microglía de ratones jóvenes Tg-SwDI, tanto las células que se encuentran en el conglomerado como las que se encuentran alejadas de los conglomerados, su soma es muy brillante y tienen pocas proyecciones. En cambio, la microglía de los ratones viejos C57BL/6 tiene el soma más alargado, en forma de esferoide y se siguen observando sus ramificaciones.

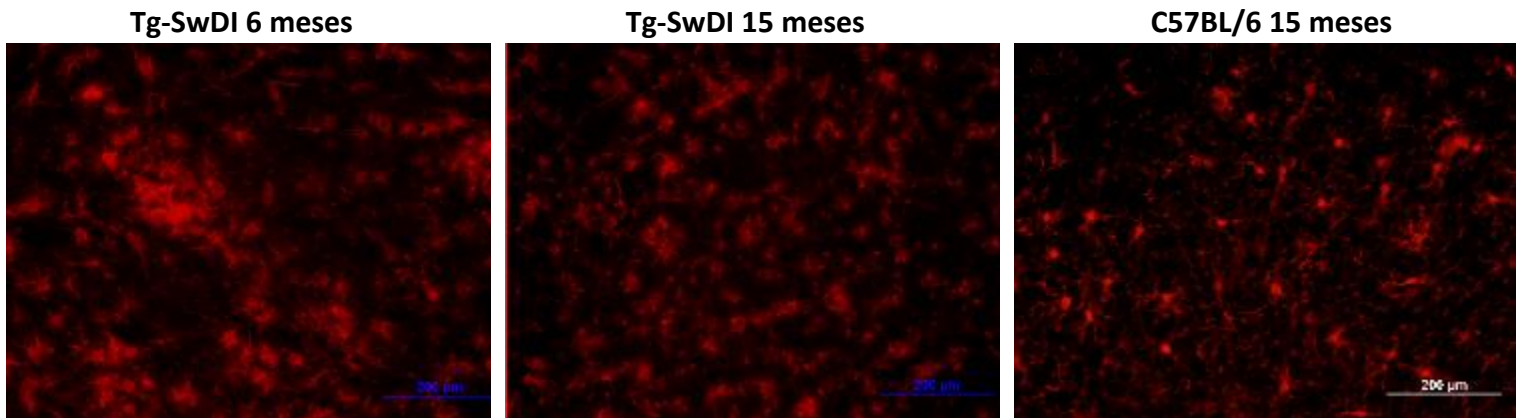


Figura 12 . Diferencias entre microglía de ratones viejos y jóvenes. Imágenes representativas de la expresión de Iba-1 en ratones Tg-SwDI viejos (15 meses) y jóvenes (6 meses) y ratones C57BL/6 viejos. Los cerebros fueron cortados en cortes coronales y fueron incubados toda la noche a 4°C con anticuerpo policlonal de conejo anti-Iba-1. Se usó un anticuerpo secundario hecho en cabra Alexa Fluor 594.anti-IgG de conejo. Escala de 200 µm.

Además, se realizó un análisis comparativo de sexos con los datos obtenidos de machos y hembras. Únicamente encontramos diferencia en la región del tálamo: a los 6 meses la expresión de Iba-1 en hembras es mayor que en machos. Y posteriormente a los 15 meses la expresión de Iba-1 es mayor en machos que en hembras (Figura 13).

En las otras regiones no encontramos diferencias, lo que puede indicar que la respuesta de la microglía a A β es similar en ambos sexos en el hipocampo de estos ratones, lo que no se ha reportado en la literatura (Gallagher et al., 2013).

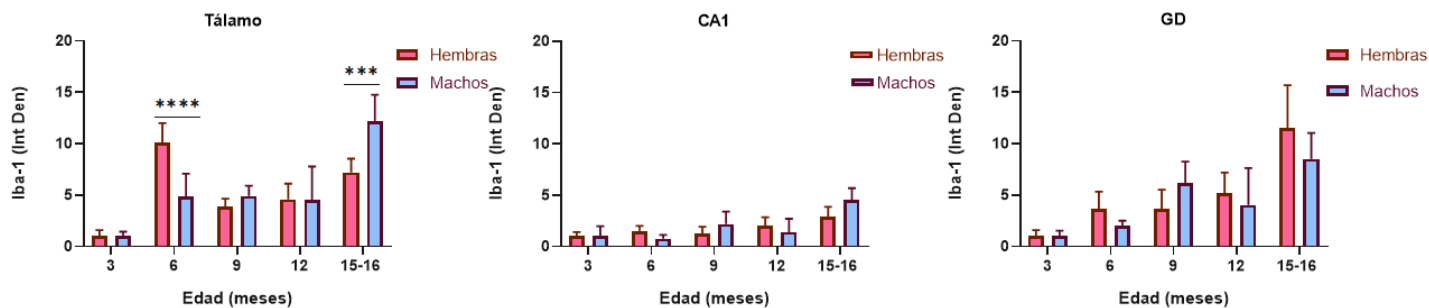


Figura 13 Comparación entre machos y hembras de la expresión de Iba-1. Gráficas de cuantificación de la expresión de GFAP en Tálamo, CA1 y Giro dentado (GD), se muestra Densidad Integrada (Int Den). Los * indican * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$. Cuantificación hecha en una escala de 2 mm. La significancia estadística se evaluó mediante una prueba T de Student.

9.3 Caracterización de astrocitos en ratones Tg-SwDI con patología conjunta tipo EA y AAC

Para caracterizar la presencia y activación de astrocitos se realizó la detección de GFAP. Esta proteína estructural se expresa únicamente en astrocitos y células de Schwann (en la periferia), lo que nos permite identificar a los astrocitos.

En los resultados del análisis cuantitativo (Figura 13-A) se puede observar que la expresión de GFAP en hembras aumenta con la edad en todas las regiones analizadas. Específicamente, en el tálamo registramos una mayor expresión de GFAP a los 12 meses.

Para descartar que la sobre-expresión de GFAP en los astrocitos de los ratones transgénicos se debiera al envejecimiento de los animales, se realizaron tinciones en tejidos de ratones C57BL/6. En el tálamo de los ratones hembra C57BL/6, hay muy poca cantidad de GFAP mientras que en el GD es donde hay mayor expresión de GFAP. Por otra parte, los astrocitos de los ratones Tg-SwDI son más gruesos y recubren toda la estructura.

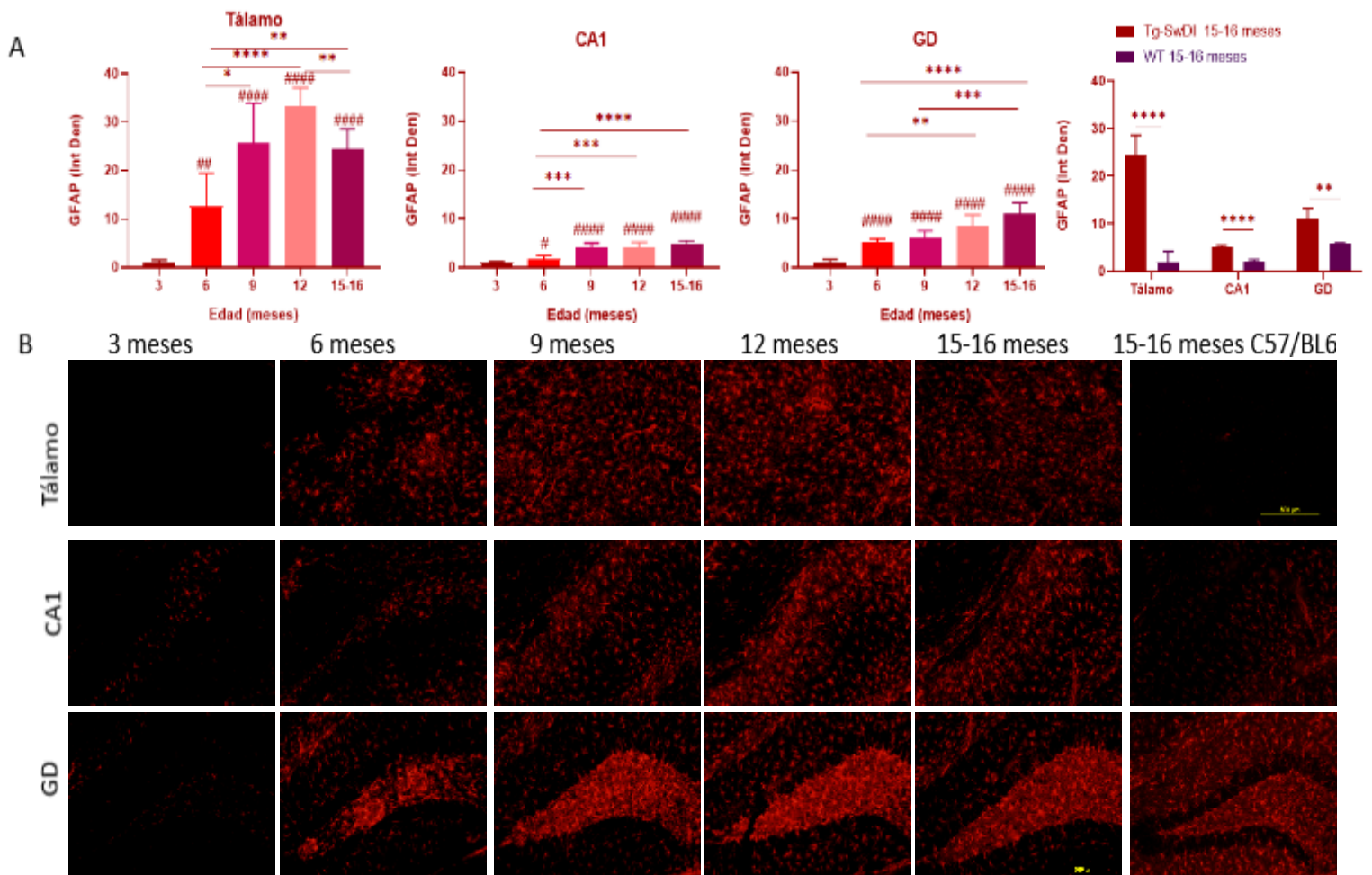


Figura 14. Cambios relacionados con la edad de la presencia de astrocitos en ratones Tg-SwDI hembra de 3, 6, 9, 12 y 15 meses. (A) Gráficas de cuantificación de la expresión de GFAP en Tálamo, CA1 y Giro dentado (GD), se muestra Densidad Integrada (Int Den). Los * indican * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$ Los símbolos # son para denotar diferencia significativa ($p < 0.05$) entre grupos de edad y 3 meses (B) Imágenes representativas de Inmunofluorescencia de la expresión de Iba-1 en Tálamo, CA1 y Giro dentado (GD), respectivamente. Los cerebros fueron cortados en cortes coronales y fueron incubados toda la noche a 4°C con anticuerpo monoclonal de ratón anti-GFAP. Se usó un anticuerpo secundario hecho en cabra Alexa Fluor 594.anti-IgG1 de ratón. Escala de 500 μm .

En machos se percibe que la expresión de GFAP aumenta con la edad en todas las regiones (Figura 15). Análogo a las hembras, desde los 6 meses hay un aumento brusco en todas las regiones con respecto a los 3 meses, a los 15 meses la expresión de GFAP es la más alta.

En la comparación de los ratones C57BL/6 viejos (15-16 meses), en los Tg-SwDI de la misma edad se observaron diferencias en todas las regiones analizadas.

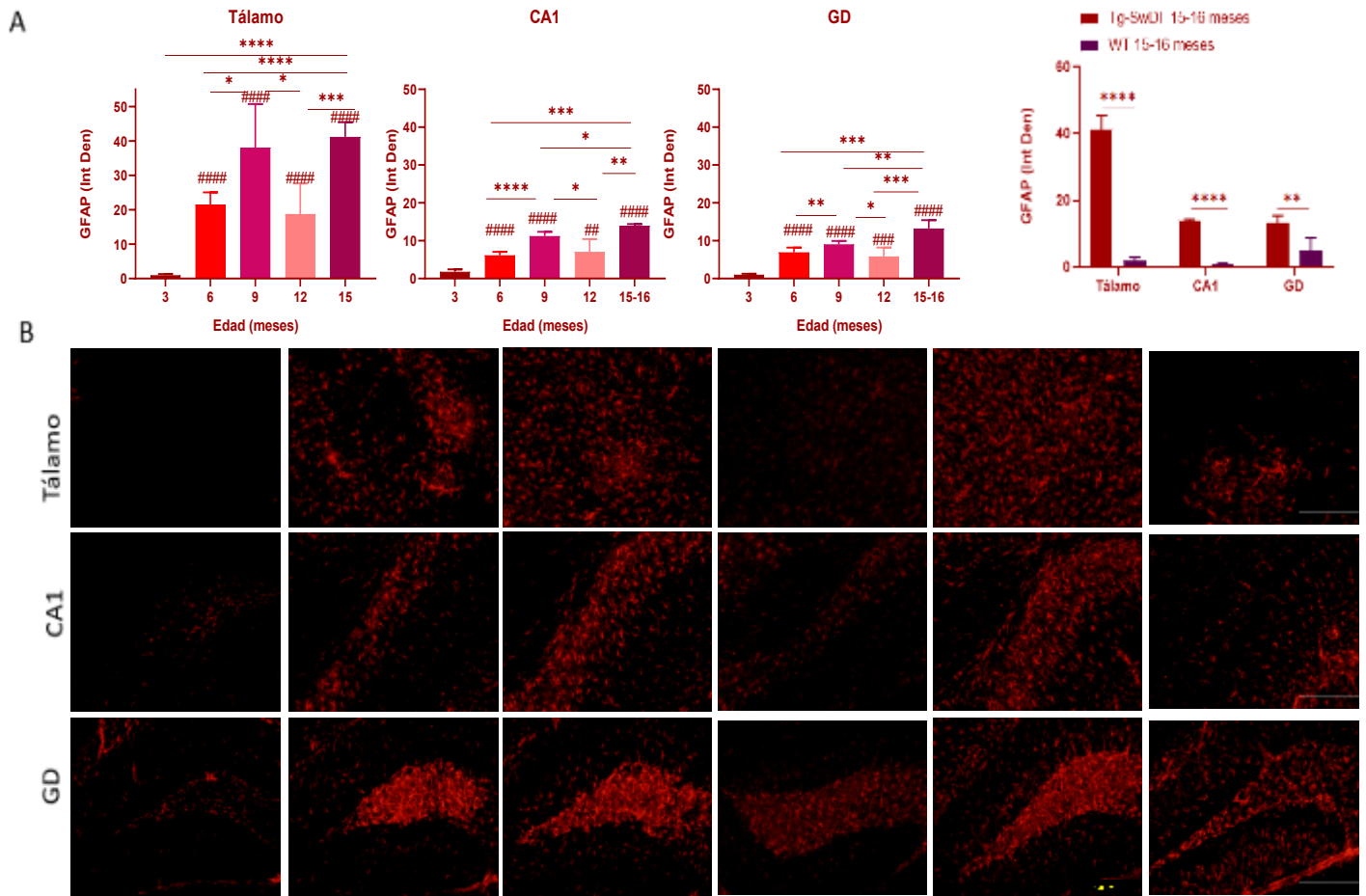


Figura 15. Cambios relacionados con la edad de la presencia de astrocitos en ratones Tg-SwDI macho de 3, 6, 9, 12 y 15 meses. (A) Gráficas de cuantificación de la expresión de GFAP en Tálamo, CA1 y Giro dentado (GD), se muestra Densidad Integrada (Int Den). Los * indican * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$. Los símbolos # son para denotar diferencia significativa ($p < 0.05$) entre grupos de edad y 3 meses. (B) Imágenes representativas de Inmunofluorescencia de la expresión de Iba-1 en Tálamo, CA1 y Giro dentado (GD), respectivamente. Los cerebros fueron cortados en cortes coronales y fueron incubados toda la noche a 4°C con anticuerpo monoclonal de ratón anti-GFAP. Se usó un anticuerpo secundario hecho en cabra Alexa Fluor 594 anti-IgG1 de ratón. Escala de $500\ \mu\text{m}$.

Con el fin de documentar si los astrocitos se encuentran en las regiones de deposición de A β , se realizó una doble tinción de astrocitos marcados con un anticuerpo primario anti-GFAP y un anticuerpo secundario AF594 (rojo), y para A β se usó un anticuerpo primario anti-A β y un anticuerpo secundario AF488 (verde). Se analizaron tejidos de 3, 6 y 15-16 meses.

En CA1 a los 3 meses se puede encontrar deposición de A β y alrededor algunos astrocitos. A los 6 meses hay más A β y más astrocitos alrededor, posteriormente a los 15 meses la deposición de A β cubre todas las capas de CA1, y como consecuencia el área de los astrocitos activados reviste toda la región (Figura 16).

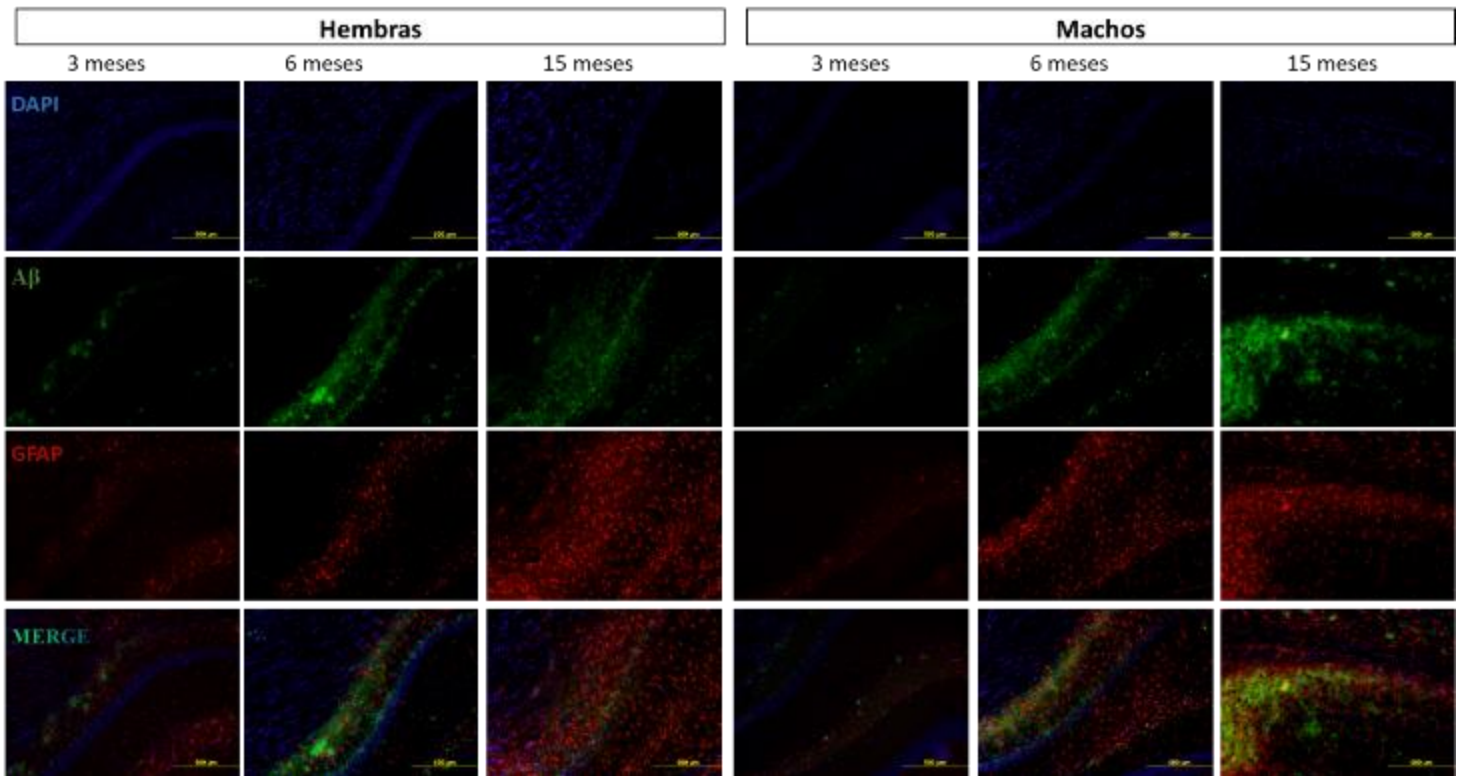


Figura 16. Respuesta de los astrocitos a la presencia de A β en CA1 de ratones Tg-SwDI. Imágenes representativas de la localización de astrocitos (GFAP, rojo) con A β (verde) de CA1 de ratones Tg-SwDI de 3, 6 y 15 meses. Núcleos teñidos con DAPI. Los cerebros fueron cortados en cortes coronales y fueron incubados toda la noche a 4°C con anticuerpo policlonal de conejo anti-GFAP y anticuerpo monoclonal de ratón anti-A β . Se usó un anticuerpo secundario hecho en cabra Alexa Fluor 594 anti-IgG de conejo y un anticuerpo secundario hecho en cabra Alexa Fluor 488 anti-IgG1 de ratón. Escala de 200 μ m.

En GD (Figura 17) a los 3 meses se puede encontrar deposición de A β en hembras, a un costado de la deposición se observan algunos astrocitos. A los 6 meses hay mayor presencia de A β y más astrocitos alrededor, posteriormente a los 15 meses la deposición de A β cubre todo el GD, y como consecuencia el área de los astrocitos activados reviste todo el GD.

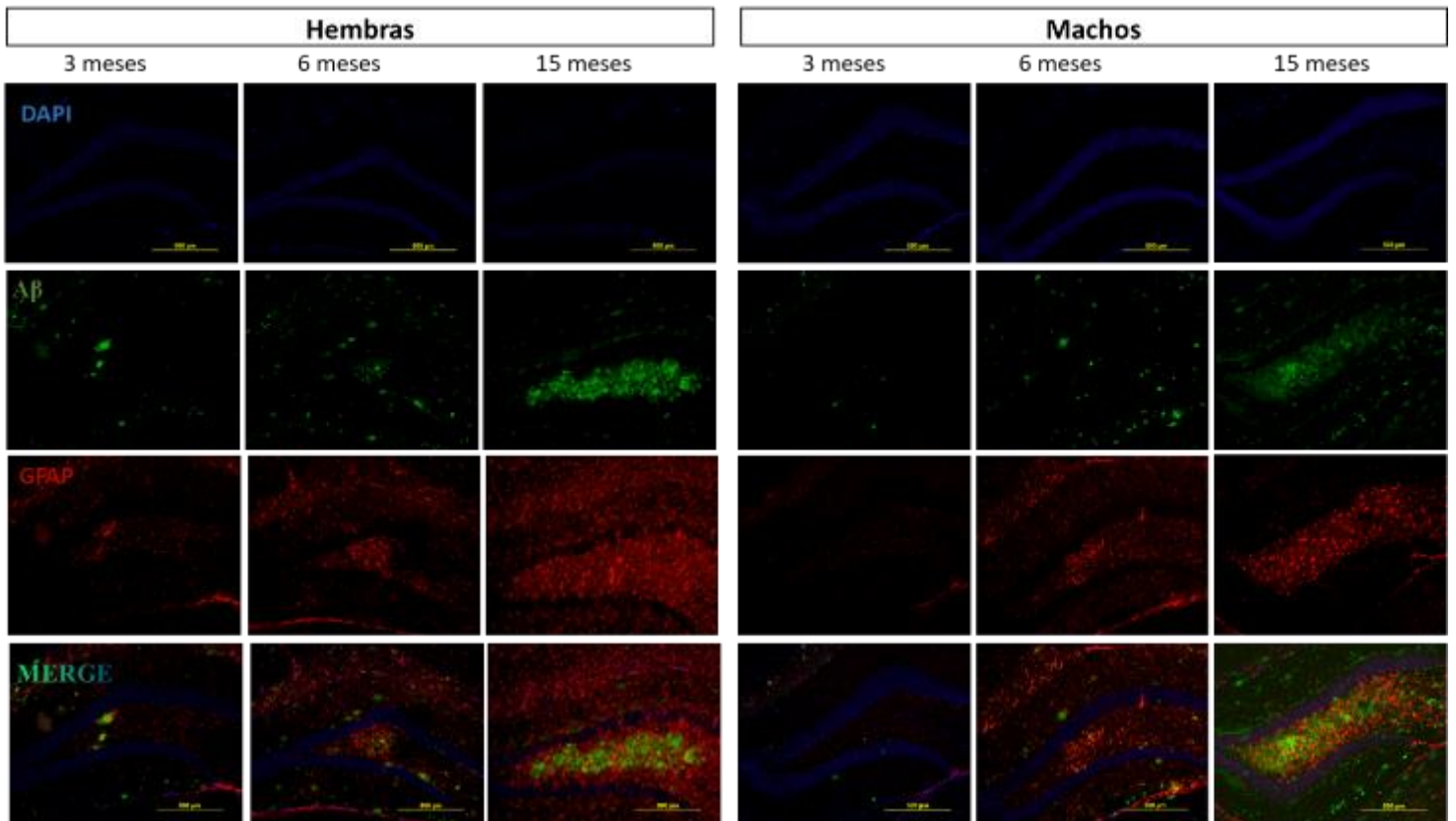


Figura 17. Respuesta de los astrocitos a la presencia de A β en GD de ratones Tg-SwDI. Imágenes representativas de la localización de astrocitos (GFAP, rojo) con A β (verde) de GD de ratones Tg-SwDI de 3, 6 y 15 meses. Núcleos teñidos con DAPI. Los cerebros fueron cortados en cortes coronales y fueron incubados toda la noche a 4°C con anticuerpo policlonal de conejo anti-GFAP y anticuerpo monoclonal de ratón anti-A β . Se usó un anticuerpo secundario hecho en cabra Alexa Fluor 594 anti-IgG de conejo y un anticuerpo secundario hecho en cabra Alexa Fluor 488 anti-IgG1 de ratón. Escala de 200 μ m.

En el tálamo de los ratones Tg-SwDI la presencia de los astrocitos incrementa con la edad y en función a la deposición de A β , de manera que a los 15 meses los ratones presentan recubrimiento en toda la región tanto de A β como de astrocitos (Figura 18).

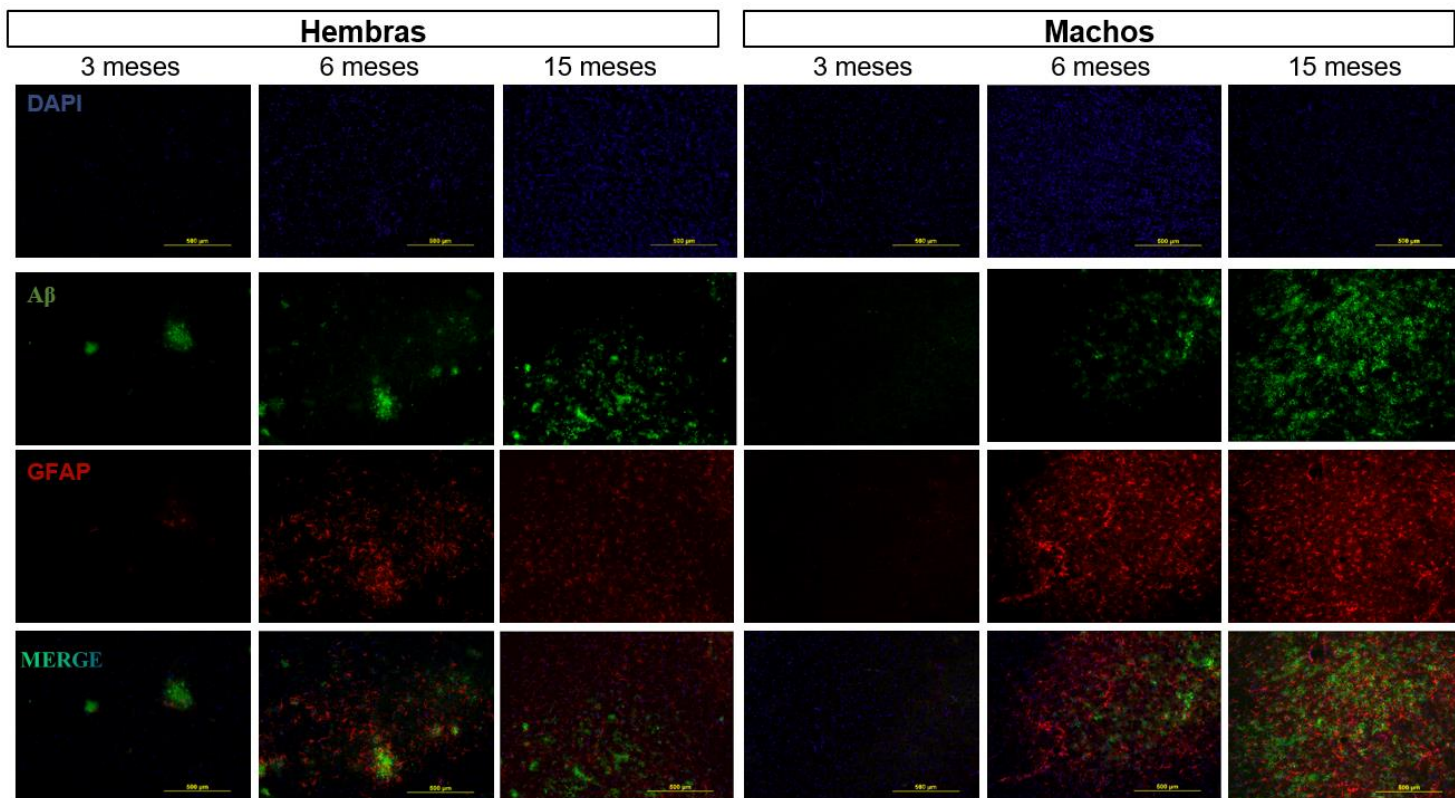


Figura 18. Respuesta de los astrocitos a la presencia de A β en GD de ratones Tg-SwDI. Imágenes representativas de la localización de astrocitos (GFAP, rojo) con A β (verde) de GD de ratones Tg-SwDI de 3, 6 y 15 meses. Núcleos teñidos con DAPI. Los cerebros fueron cortados en cortes coronales y fueron incubados toda la noche a 4°C con anticuerpo policlonal de conejo anti-GFAP y anticuerpo monoclonal de ratón anti-A β . Se usó un anticuerpo secundario hecho en cabra Alexa Fluor 594 anti-IgG de conejo y un anticuerpo secundario hecho en cabra Alexa Fluor 488 anti-IgG1 de ratón. Escala de 200 μ m.

Para observar más a detalle la morfología que presentan los astrocitos entre ratones jóvenes y viejos elegimos la región de GD del hipocampo, ya que es la región donde encontramos más expresión de GFAP en ratones C57BL/6. Los astrocitos de los ratones C57BL/6 se distribuyen a lo largo del GD, presentan morfología característicamente estrellada y procesos finos, en cambio, en los ratones Tg-SwDI desde los 6 meses notamos un aumento en el número, grosor y longitud de los procesos celulares, estas características se ven aumentadas a los 15 meses (Figura 19).

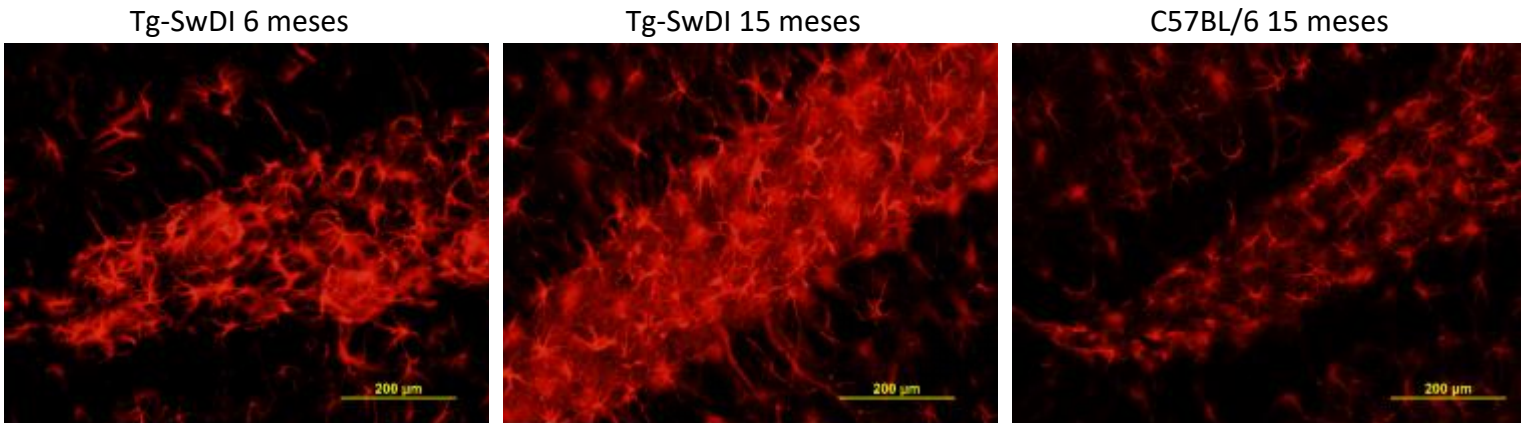


Figura 19 . Diferencias entre microglía de ratones viejos y jóvenes. Imágenes representativas de la expresión de Iba-1 en ratones Tg-SwDI viejos (15 meses) y jóvenes (6 meses) y ratones C57BL/6 viejos. Los cerebros fueron cortados en cortes coronales y fueron incubados toda la noche a 4°C con anticuerpo monoclonal de ratón anti-GFAP. Se usó un anticuerpo secundario hecho en cabra Alexa Fluor 594.anti-IgG1 de ratón. Escala de 200 µm.

Al realizar la comparación de la expresión de GFAP entre machos y hembras (Figura 20) observamos que en tálamo hay diferencia a los 12 meses, siendo mayor la expresión en hembras y a los 15-16 meses es mayor la expresión en machos. En GD, solo existe diferencia a los 9 meses de edad, donde la expresión es mayor en machos.

Encontramos diferencias significativas en la región de CA1 a los 6 meses, 9 meses y 15-16 meses en donde la expresión de GFAP es mayor en machos con respecto a las hembras.

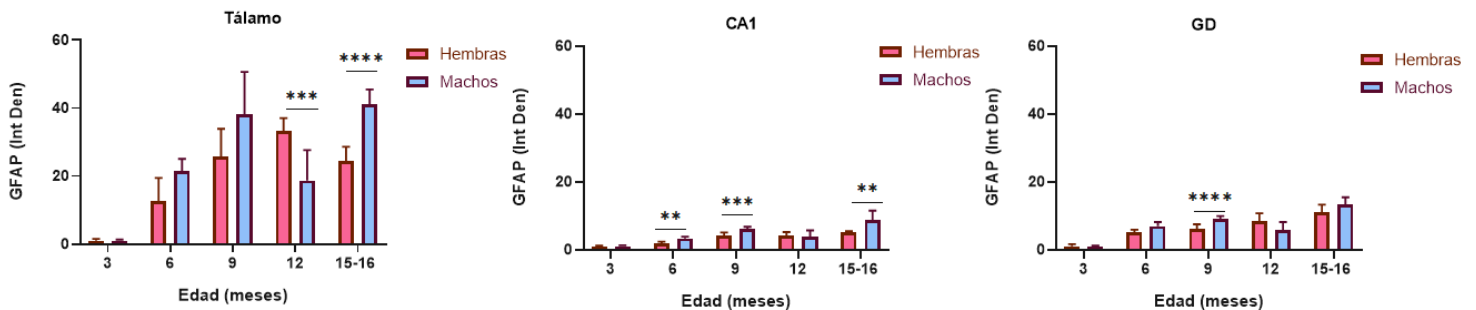


Figura 20 . Comparación entre machos y hembras de la expresión de GFAP. Gráficas de cuantificación de la expresión de GFAP en Tálamo, CA1 y Giro dentado (GD), se muestra Densidad Integrada (Int Den). Los * indican * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 y **** p<0.0001. Cuantificación hecha en una escala de 2 mm. La significancia estadística se evaluó mediante una prueba T de Student.

Al encontrar un aumento de la activación de las dos células de la glía, relacionado a $A\beta$, en las mismas regiones, surgió la pregunta de si la microglía y los astrocitos se encontraban en cercanía. En tálamo de 6 meses los cúmulos de microglía son rodeados por los astrocitos. La microglía se encuentra activada y son varias células juntas, mientras que los astrocitos se observan en menor cantidad y aunque se trata de células más grandes, no parece que su soma y sus procesos sean tan gruesos como los de la microglía, sobre todo los de aquellos astrocitos que se encuentran más alejados del cúmulo central (Figura 21). Lo anterior sugiere que la microglía llega primero a formar conglomerados que rodean las placas $A\beta$ y posteriormente llegan los astrocitos.

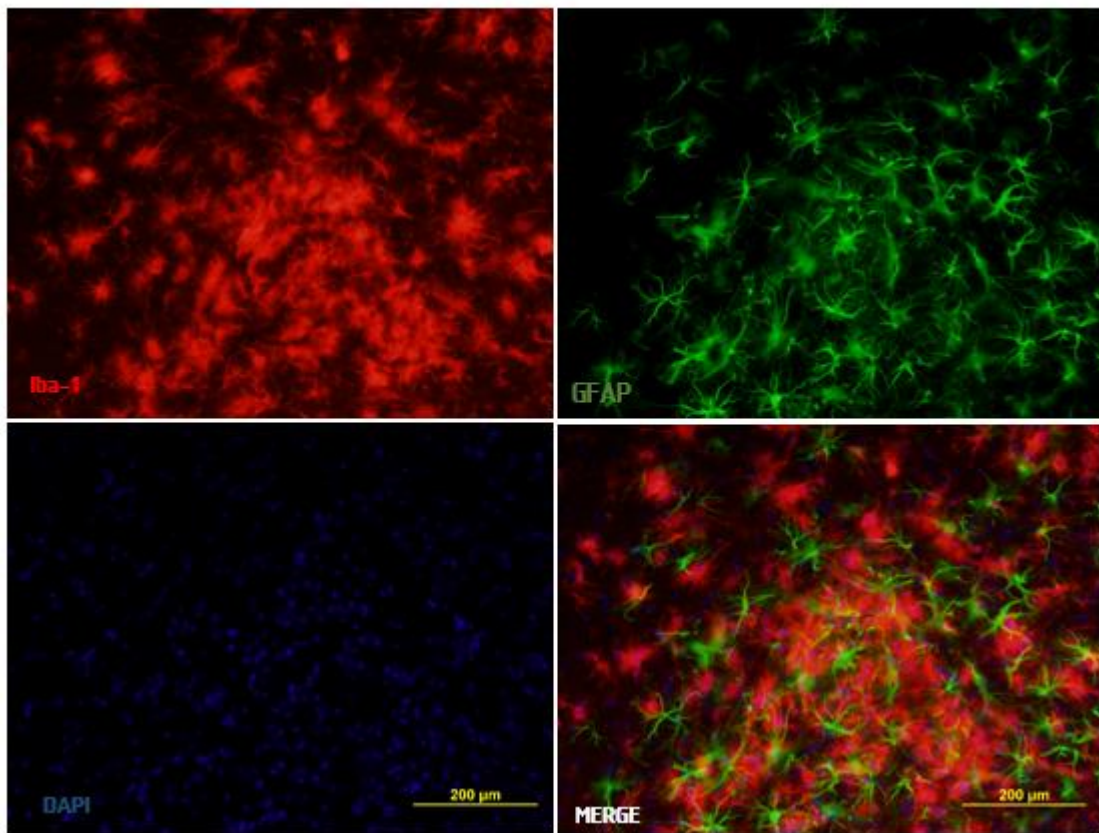


Figura 21. Astrocitos rodeando a la microglía. Imágenes representativas de la localización de microglía (Iba-1, rojo) con astrocitos (GFAP, verde) del tálamo de ratones Tg-SwDI de 6 meses. Núcleos teñidos con DAPI. Los cerebros fueron cortados en cortes coronales y fueron incubados toda la noche a 4°C con anticuerpo policlonal de conejo anti-Iba-1 y anticuerpo monoclonal de ratón anti-GFAP. Se usó un anticuerpo secundario hecho en cabra Alexa Fluor 594 anti-IgG de conejo y un anticuerpo secundario hecho en cabra Alexa Fluor 488 anti-IgG1 de ratón. Escala de 200 μm.

9.4 Caracterización de TSPO en ratones Tg-SwDI con patología conjunta tipo EA y AAC

Debido al papel de la proteína mitocondrial TSPO como biomarcador de neuroinflamación, posiblemente polarizado hacia un perfil proinflamatorio (Pozzo et al., 2019), decidimos analizar la expresión de TSPO en los mismos tejidos cerebrales utilizados en la evaluación de microglía y astrocitos.

La expresión de TSPO en ratones hembra sigue una tendencia de aparición conforme al envejecimiento de los animales (Figura 22). A los 6 meses, detectamos que la expresión de TSPO se asemeja a los cúmulos de microglía observados con Iba-1 en tálamo. En cuanto a las regiones del hipocampo, en CA1 la expresión de TSPO aumenta desde los 12 meses, en comparación con 3 meses, y en GD aumenta desde los 6 meses. A los 15 meses se alcanza la expresión máxima de TSPO en todas las regiones. En ratones C57BL/6, la expresión de TSPO fue tan baja que no fue posible realizar la cuantificación.

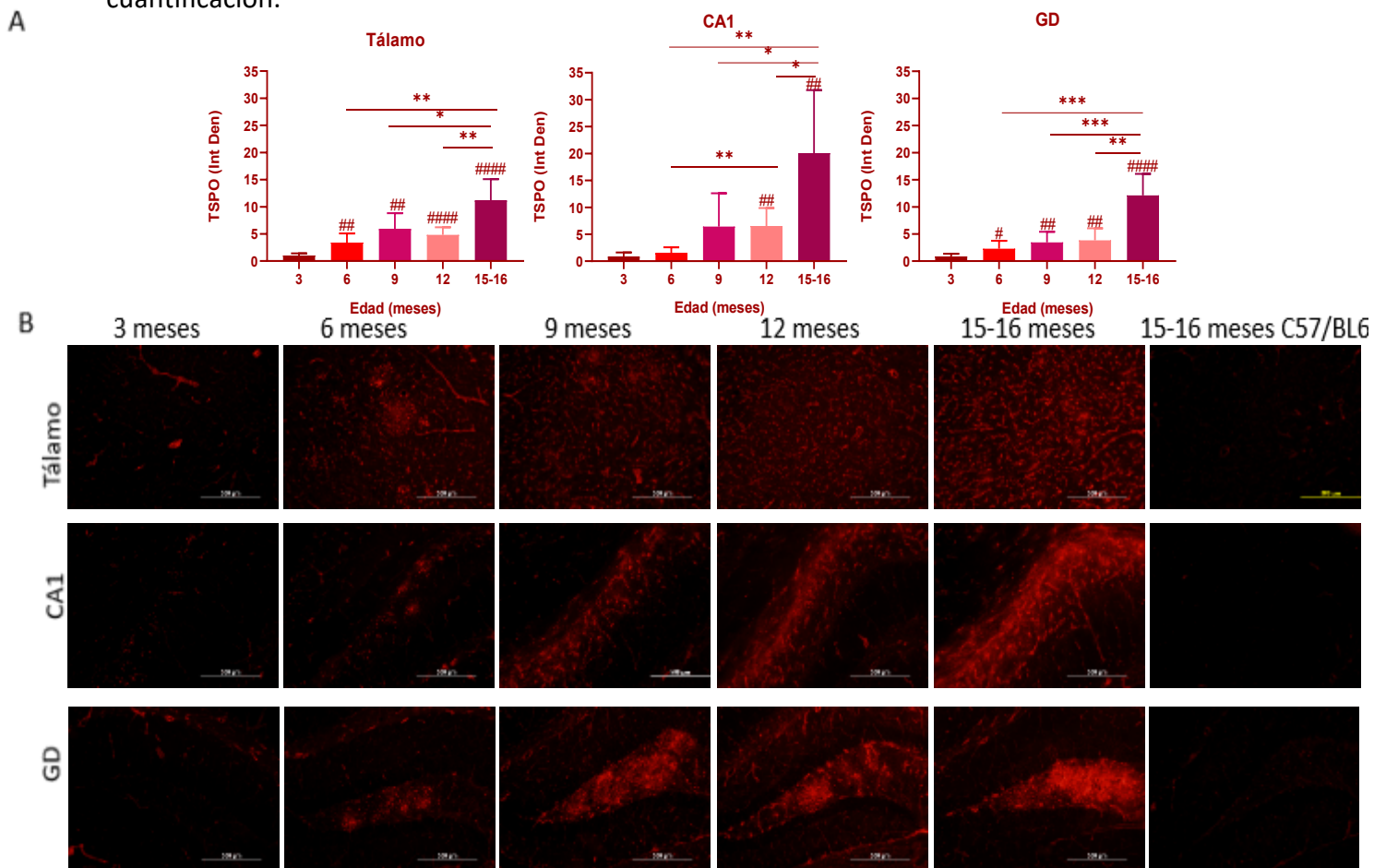


Figura 22. Cambios relacionados con la edad en la expresión de TSPO en ratones Tg-SwDI hembra de 3, 6, 9, 12 y 15 meses. (A) Gráficas de cuantificación de la expresión de TSPO en Tálamo, CA1 y Giro dentado (GD), se muestra Densidad Integrada (Int Den). Los * indican * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$. Los símbolos # son para denotar diferencia significativa ($p < 0.05$) entre grupos de edad y 3 meses (B) Imágenes representativas de Inmunofluorescencia de la expresión de Iba-1 en Tálamo, CA1 y Giro dentado (GD), respectivamente. Los cerebros fueron cortados en cortes coronales y fueron incubados toda la noche a 4°C con anticuerpo policlonal de conejo anti-TSPO. Se usó un anticuerpo secundario hecho en cabra Alexa Fluor594.anti-IgG de conejo. Escala de 500 μm .

En ratones macho la expresión de TSPO también aumenta con la edad. En todas las regiones, desde los 6 meses aumenta en comparación con los 3 meses e, igualmente, la edad donde hay mayor expresión es a los 15 meses (Figura 23).

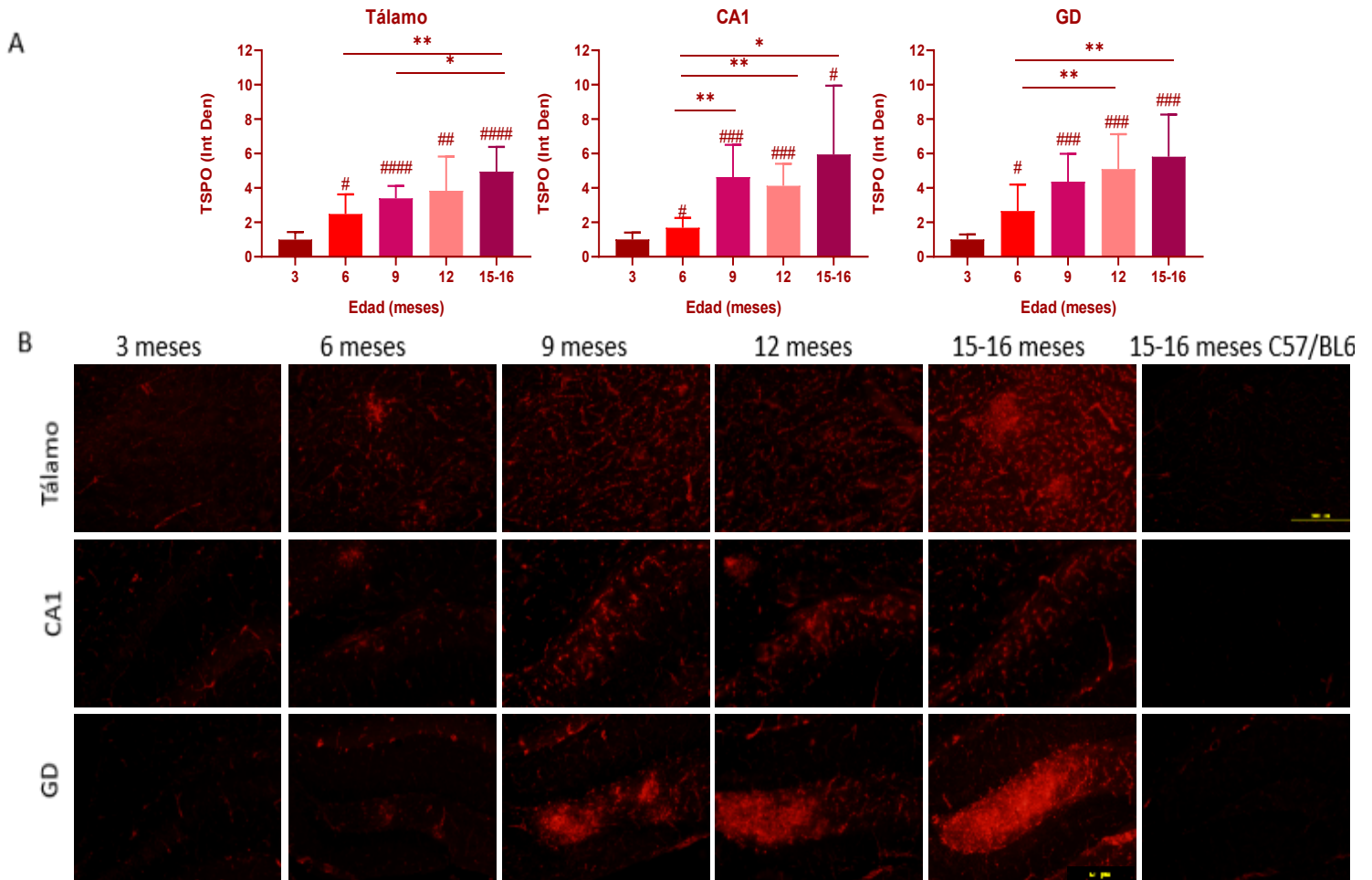


Figura 23. Cambios relacionados con la edad en la expresión de TSPO en ratones Tg-SwDI macho de 3, 6, 9, 12 y 15 meses. (A) Gráficas de cuantificación de la expresión de TSPO en Talamo, CA1 y Giro dentado (GD), se muestra Densidad Integrada (Int Den). Los * indican * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$. Los símbolos # son para denotar diferencia significativa ($p < 0.05$) entre grupos de edad y 3 meses (B) Imágenes representativas de Inmunofluorescencia de la expresión de Iba-1 en Talamo, CA1 y Giro dentado (GD), respectivamente. Los cerebros fueron cortados en cortes coronales y fueron incubados toda la noche a 4°C con anticuerpo policlonal de conejo anti-TSPO. Se usó un anticuerpo secundario hecho en cabra Alexa Fluor594.anti-IgG de conejo. Escala de $500\ \mu\text{m}$.

Se realizó la comparación de la expresión de TSPO entre machos y hembras (Figura 24). De 3 a 12 meses la expresión de TSPO aumenta de manera similar en machos y hembras. La edad donde se presenta mayor expresión de TSPO es a los 15 meses, donde encontramos diferencia entre machos y hembras en tálamo y GD, siendo mayor en hembras.

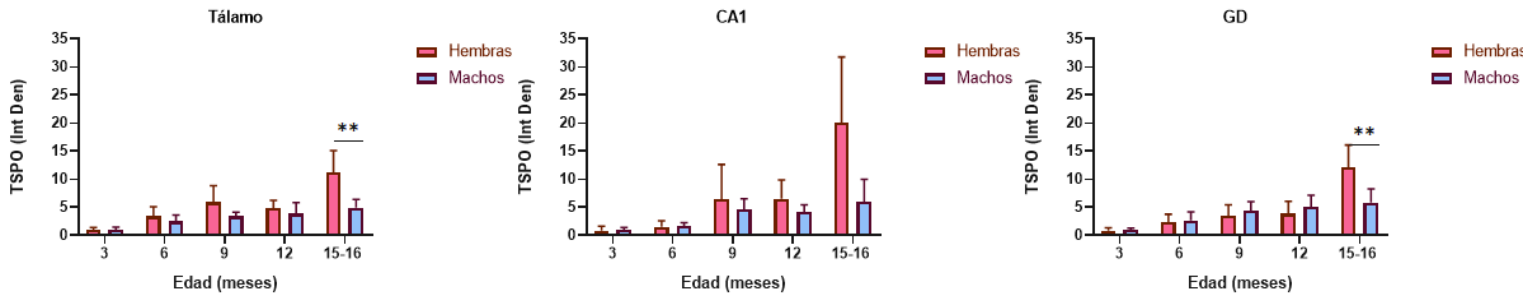


Figura 24 Comparación entre machos y hembras de la expresión de TSPO. Gráficas de cuantificación de la expresión de TSPO en Tálamo, CA1 y Giro dentado (GD), se muestra Densidad Integrada (Int Den). Los * indican * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$. Cuantificación hecha en una escala de 2 mm. La significancia estadística se evaluó mediante una prueba T de Student.

9.5.1 Expresión de TSPO en células de la glía de ratones Tg-SwDI

La alta expresión de TSPO en eventos inflamatorios se ha observado principalmente en microglía y astrocitos (Rupprecht et al., 2010). Con el fin de identificar en que células se encuentra expresado TSPO en este modelo, se realizaron co-tinciones con los marcadores de microglía y astrocitos, respectivamente.

Para la primera co-tinción que se realizó, se utilizó un anticuerpo anti-Iba-1 y un anticuerpo anti-TSPO. Se utilizaron cortes cerebrales de ratones Tg-SwDI de 6 y 15 meses. Encontramos una robusta co-localización de Iba-1 y TSPO tanto en ratones jóvenes de 6 meses, como en ratones viejos de 15 meses. Como se observa en la figura 25, en los ratones de 6 meses la microglía que conforma los conglomerados ubicados en el tálamo se co-localiza con TSPO, incluso en las células alejadas del conglomerado encontramos expresión de TSPO. En ratones de 15 meses la co-localización de TSPO con microglía también es evidente.

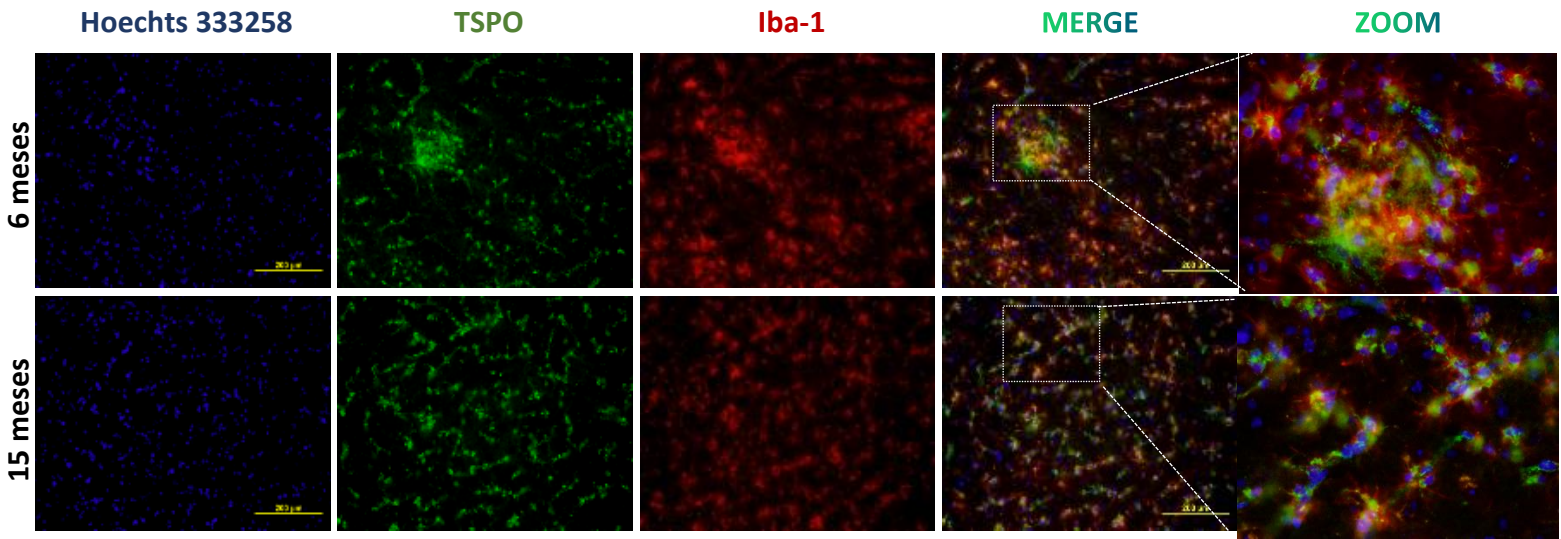


Figura 25. Expresión de TSPO en microglía de ratones Tg-SwDI. Imágenes representativas de la expresión de TSPO (verde) en microglía (Iba-1, rojo) del tálamo de ratones Tg-SwDI viejos (15 meses) y jóvenes (6 meses). Núcleos teñidos con Hoechts 333258. La última imagen corresponde al zoom digital hecho en el merge de canales. Los cerebros fueron cortados en cortes coronales y fueron incubados toda la noche a 4°C con anticuerpo monoclonal de rata anti-Iba-1 y anticuerpo policlonal de conejo anti-TSPO. Se usó un anticuerpo secundario hecho en cabra Alexa Fluor 594 anti-IgG2a de rata y un anticuerpo secundario hecho en cabra Alexa Fluor 488 anti-IgG de conejo. Escala de 200 μ m.

En la segunda co-tinción que realizamos de TSPO, utilizamos anticuerpos anti-GFAP y anti-TSPO en las muestras de ratones Tg-SwDI de 6 y 15 meses. Como se muestra en las imágenes representativas de la Figura 26, no se encontró co-localización de GFAP con TSPO en el tálamo de ratones de 6 y 15 meses. Se observa que los astrocitos tanto en ratones viejos como en jóvenes rodean otro tipo celular que sí expresa TSPO.

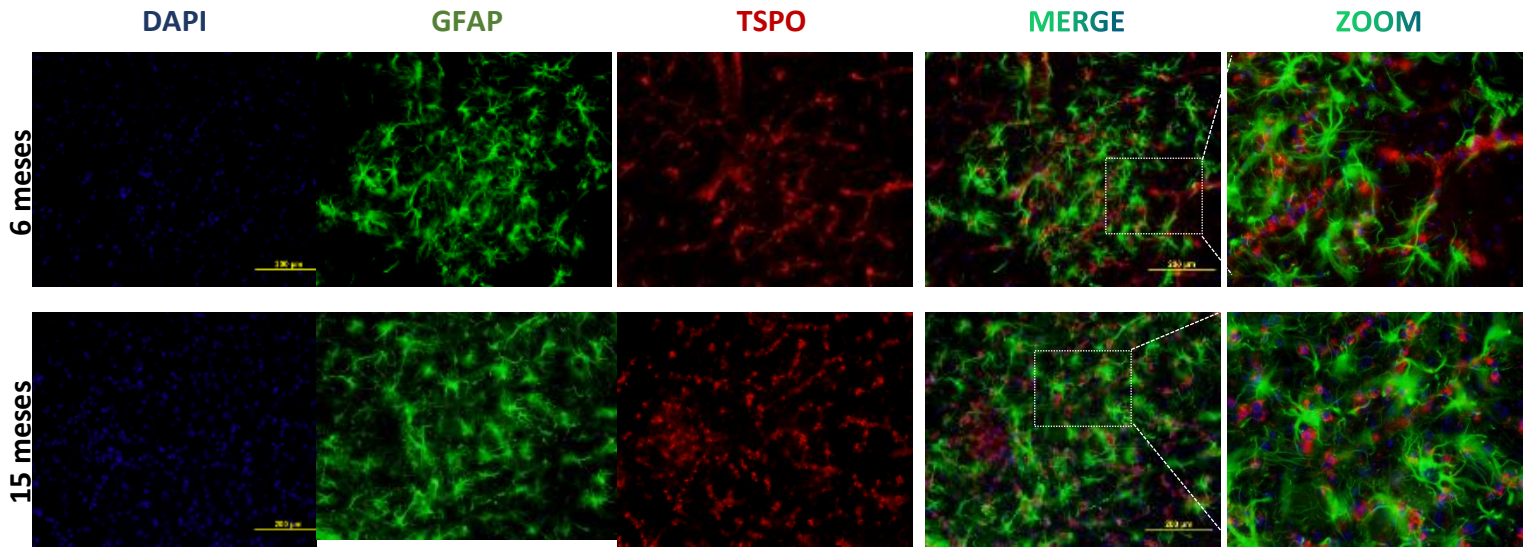


Figura 26. Expresión de TSP0 en astrocitos. Imágenes representativas de la expresión de TSP0 (rojo) en astrocitos (GFAP, verde) del tálamo de ratones Tg-SwDI viejos (15 meses) y jóvenes (6 meses). Núcleos teñidos con Hoechts 333258. La última imagen corresponde al zoom digital hecho en el merge de canales. Los cerebros fueron cortados en cortes coronales y fueron incubados toda la noche a 4°C con anticuerpo monoclonal de ratón anti-GFAP y anticuerpo policlonal de conejo anti-TSP0. Se usó un anticuerpo secundario hecho en cabra Alexa Fluor 488 anti-IgG1 de ratón y un anticuerpo secundario hecho en cabra Alexa Fluor 4594 anti-IgG de conejo. Escala de 200 μm .

10. DISCUSIÓN

La microglía y los astrocitos conforman a las células de la glía, que son tan importantes para el funcionamiento normal del SNC como las neuronas. Además de sus roles nodriza, las células de la glía constituyen la respuesta inmune del SNC. La neuroinflamación es uno de los componentes presentes en varias enfermedades neurodegenerativas, como esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, EA y AAC (Ghosh et al., 2021). Por el complejo papel que juega la neuroinflamación, se ha optado por estudiar el desarrollo de la patología con mayor profundidad en diversos modelos animales.

La caracterización detallada de las células gliales es esencial para comprender su función en la patología de la EA y otros procesos neurodegenerativos. Mediante técnicas de inmunohistoquímica y otros enfoques, es posible identificar y analizar la expresión de marcadores específicos de células gliales, como GFAP para astrocitos e Iba-1 para microglía. Estos marcadores permiten visualizar y cuantificar la activación y distribución de las células gliales en distintas regiones cerebrales. En el contexto del estudio de la EA las regiones que más frecuentemente presentan deposición de A β y atrofia son el hipocampo y el tálamo.

En estudios previos del modelo Tg-SwDI se ha encontrado un aumento en la expresión de marcadores microgliales en el hipocampo en ratones Tg-SwDI de 6, 12 y 24 meses de edad (Miao et al., 2005; Xu et al., 2014; Sweilem et al., 2020). Nuestras observaciones en el hipocampo de ratones hembra Tg-SwDI indican que, en el GD, desde los 6 meses ya existe diferencia en comparación con los 3 meses. En cambio, en la región de CA1 encontramos diferencia, con respecto a los 3 meses, solo hasta los 12 y 15 meses (Figura 5). Probablemente, en CA1 la expresión de Iba-1 ya está incrementada en los animales de 3 meses, antes que en GD y tálamo, y por eso no observamos diferencia entre los ratones de 3 meses y los ratones de 6 y 9 meses. La co-tinción con A β (Figura 7) revela que el inicio de la acumulación de A β comienza con deposiciones puntuales en la capa piramidal de CA1. En esta capa se encuentran alineados los somas de las células piramidales del hipocampo (Hamond et al., 2015). De igual manera, en un estudio de una cepa de ratones, TASTPM, se ha encontrado un incremento en la cantidad de microglía incluso antes de la aparición de placas, presumiblemente por la presencia de agregados amiloides intracelulares, más prominentemente en CA1 (Medawar et al., 2019), lo que coincide con nuestros resultados.

En el caso de GD de los ratones macho, la expresión de Iba-1 aumenta con la edad, disminuye a los 12 meses y posteriormente vuelve a aumentar a los 15 meses (Figura 6). De igual manera, en el modelo murino 3xTg-AD se ha observado una disminución en la expresión de Iba-1 a esa edad, lo que correlaciona con los niveles reducidos de mediadores inflamatorios tisulares a los 12 meses (Fernandes et al., 2022). El aumento que observamos a los 15 meses puede asociarse con la integridad de la BHE, que se ve severamente afectada en individuos viejos; las señales de daño y las células infiltradas pueden reflejarse en el aumento de Iba-1 (Sweilem et al., 2020).

Nuestros resultados muestran que en las primeras fases de la deposición de A β , la microglía adquiere una morfología reactiva y rodea los agregados (Figuras 9-11). Sin embargo, la deposición de A β continúa extendiéndose con la edad, por lo que posiblemente la microglía en ratones Tg-SwDI viejos se vuelva incapaz de fagocitar al péptido. Con el envejecimiento y particularmente en presencia de patología de EA, los macrófagos/microglía se vuelven senescentes, mostrando disminución de la migración, fagocitosis e incapacidad para restringir la patología de EA (Edler et al., 2021; Njie et al., 2012). Asimismo, existe evidencia de un cambio en el fenotipo de microglía reactiva M2, al comienzo de la patología A β , asociado a un perfil neuroprotector, a uno M1 en etapa avanzada de la enfermedad (Jimenez et al., 2008). Incluso en este modelo (Tg-SwDI) se ha descrito que a los 12 meses las citocinas proinflamatorias IL6 e IL1 β se encuentran elevadas con respecto a ratones silvestres (Miao et al., 2005).

La microglía es importante para la formación de las placas de A β . La activación que conduce a la muerte de las células microgliales contribuye a la formación y el crecimiento de la placa amiloide (Baik et al., 2016). En este contexto, es probable que en las edades donde detectamos un decaimiento en la expresión de Iba-1, 9 meses en caso de las hembras y 12 en el caso de los machos, exista muerte celular. Es necesario realizar estudios que determinen si este es el caso. Otra explicación a la fluctuación en los niveles de expresión de Iba-1 observados puede deberse a la interacción de la microglía con otras células, por ejemplo, las células T pueden infiltrarse en el parénquima en condiciones de inflamación crónica (Ransohoff et al., 2003). Igualmente, en otros modelos de la EA, se ha visto un aumento de la cantidad de células T reguladoras, lo que genera una supresión inmune (Baruch et al., 2015; Faridar et al., 2022). Este fenómeno puede darnos otra explicación de la disminución de Iba-1 que observamos en nuestro modelo.

En individuos sanos la alteración de la homeostasis del cerebro durante el envejecimiento puede conducir a la activación de la glía y al aumento en la densidad de la microglía reactiva para restaurar el equilibrio tisular (Włodarczyk, et al., 2017). Se sabe que en ratones sanos de la cepa C57BL/6 la microglía en homeostasis no expresa la misma proporción de Iba-1 y que existe un incremento en su expresión dependiente de la edad (Edler et al., 2021). Nosotros observamos que en todas las regiones analizadas de los cerebros de ratones Tg-SwDI hay un aumento en la expresión de Iba-1 en comparación con los ratones C57BL/6 viejos (15 meses), por lo que podemos concluir que tanto en machos como en hembras, el aumento no se debe únicamente a la edad.

En nuestro estudio encontramos que todos los ratones Tg-SwDI de 6 meses analizados experimentan un aumento brusco en la expresión de Iba-1 en el tálamo, respecto a los de 3 meses, y en el caso de las hembras la expresión también es mayor en los de 9 meses (Figura 5-A). Esta diferencia se debe a la aparición de conglomerados de células de microglía en el tálamo, exclusivamente a los 6 meses y que se encuentran rodeando a los depósitos de A β presente, su morfología se caracteriza por un soma más grande y redondeado, a comparación de 3 meses, con proyecciones más cortas (Figura 10). Esta morfología ameboide está asociada típicamente con un estado reactivo de la microglía (Leyh et al., 2021). Previamente se ha reportado un aumento de la cantidad de A β en el tálamo a los 6 meses, con respecto de los 3 meses, (Miao et al., 2005; Xu et al., 2014) así como una elevación

dramática de A β insoluble en este modelo (Davis et al., 200), lo que aumenta la activación de microglía.

En una de las cepas transgénicas de inicio temprano de la deposición de A β (TgCRND8) la activación de la microglía aparece simultáneamente con el depósito de A β . A las 13-14 semanas la microglía se agrupa alrededor de los depósitos de A β en la corteza cerebral y el hipocampo; los depósitos de A β son numerosos a las 20 semanas (Dudal et al., 2004). Este grupo concluye que la activación microglial es un evento temprano en respuesta a todos los tipos de depósitos extracelulares. En ratones TASTPM, la deposición de A β a los 6 meses está presente en hipocampo y tálamo, y también se encuentra rodeada de astrocitos y microglía (Anman et al., 2016). En un estudio de la interacción de A β con la microglía mediante imagen confocal de alta resolución y otros estudios *in vivo*, se describió que la microglía actúa como una barrera que restringe la expansión de las placas, al controlar su afinidad por el A β soluble. Este mecanismo le permite limitar la neurotoxicidad de A β ₄₂ y proteger a las neuronas de la toxicidad local asociada con la agregación en curso de A β (Condello et al., 2015).

Varios grupos han intentado explicar el mecanismo por el cual aparecen estos conglomerados de microglía alrededor de placas A β . Se ha observado que la proteína mecanosensora Piezo 1 se ve sobre-expresada en la microglía como respuesta a la rigidez del tejido, ocasionada por la formación de las placas compactas de A β (Hu J, et al., 2023).

Por otro lado, la expresión de la proteína TREM2, una de las moléculas más estudiadas en la microglía por su influencia en la EA, ha mostrado resultados alentadores. La deficiencia de TREM2 evita que la microglía se agrupe alrededor de A β , comprometiendo la supervivencia de la microglía (Wang et al., 2015). En otro estudio donde se administra un agonista de TREM2, se observó que los conglomerados de microglía se vuelven más grandes e incluso observaron una mejora en la sinaptogénesis (Zhao et al., 2022).

En este sentido cabe destacar que, incluso en condiciones no patológicas, el estado de la microglía muestra una alta heterogeneidad dependiente de las regiones del cerebro. El subtipo de microglía presente en el tálamo es más reactivo que el de otras regiones del cerebro, con más expresión de algunos marcadores asociados con activación como CD68, CD45, CX3CR1, CD11c y CD64 (Böttcher et al., 2019). Esta alza de la reactividad en la microglía en el tálamo podría explicar por qué observamos los aglomerados de células exclusivamente en esta zona.

Entre machos y hembras, encontramos diferencia en la expresión de Iba-1 solamente en la región del tálamo: a los 6 meses se observa una mayor expresión en hembras, mientras que a los 15 meses hay mayor expresión en machos (Figura 12). En trabajos previos se ha encontrado que en ratones APP/PS1 la deposición de A β , activación microglial y déficits cognitivos ocurren antes en hembras que en machos (Gallagher et al., 2013), y en un modelo de neuroinflamación murino agudo, la expresión de Iba-1 aumentó más en hembras viejas en comparación con hembras adultas y machos viejos (Murtaj et al., 2019). Además, en hembras, la microglía evidenció características neuroprotectoras en un modelo agudo de lesión isquémica (Villa et al., 2018). Esto es debido a que los niveles de estrógeno, que posee acciones neuroprotectoras en el cerebro de las hembras, al llegar

la menopausia se ven disminuidos, lo que puede aumentar la vulnerabilidad del cerebro femenino a la EA y otros trastornos (Rapp et al., 2003). En un estudio más reciente donde estudiaron a fondo la microglía en ratones APP/PS1 de 16 meses encontraron que los machos tenían mayor cantidad de microglía en forma ameboide e Iba 1+/CD68+, es decir, más microglía fagocítica que las hembras (Guillot-Sestier et al., 2021). Los autores relacionan la menor cantidad de microglía fagocítica encontrada en hembras con una neuroprotección reducida, mayor deterioro cognitivo y mayor progresión de la patología amiloide (Guillot-Sestier et al., 2021). Con lo anterior, podríamos entender por qué en nuestro modelo las células de microglía expresan más Iba-1 y forman conglomerados en hembras de 6 meses, mientras que a los 15 meses, las células de microglía en hembras muestran menor expresión de Iba-1 en los machos.

Una de las limitaciones del presente estudio es la falta de marcadores específicos de microglía. La proteína Iba-1 está también expresada en macrófagos infiltrantes y no hay manera de distinguirlos uno del otro tan solo con Iba-1. Teniendo en cuenta que la BHE se encuentra comprometida en animales viejos, como en todas las enfermedades neurodegenerativas, es probable que algunos macrófagos como BAMs o incluso monocitos se hayan infiltrado al cerebro (Hyun-Jung y Min-Soo, 2022).

En cuanto a la expresión de GFAP, que refleja la presencia y reactividad de los astrocitos, observamos un aumento dependiente de la edad. La expresión de GFAP sufre un dramático aumento de 3 a 6 meses en todas las áreas analizadas, posteriormente observamos que la expresión de GFAP continúa aumentando con la edad, hasta alcanzar la máxima expresión a los 15-16 meses (Figura 13A y 14A). En concordancia con nuestros resultados, el grupo de trabajo que introdujo y caracterizó el modelo Tg-SwDI, observó densidad astrocítica elevada asociada a A β vascular, que aumentó con la edad (Miao et al., 2005). En el trabajo de este grupo no se analizaron animales de 3 meses, sin embargo, a los 6 meses, reportaron un aumento considerable de la expresión de GFAP con respecto a los ratones silvestres. Morfológicamente, nosotros observamos un aumento en el grosor de los procesos y el número de astrocitos, evidente desde los 6 meses y que aumenta con la edad (Figuras 13-18). Este aumento en el número de astrocitos, grosor y longitud de los principales procesos celulares, que además presentan un mayor contenido de GFAP, se asocia con la hipertrofia astrocítica, característica de la gliosis reactiva (Wilhelmsson et al., 2006).

En eventos de lesión cerebral, se ha reportado que la astrogliosis reactiva es capaz de formar una cicatriz glial; aunque nosotros observamos que hay un elemento de astrogliosis evidente, en el contexto de EA y otras enfermedades neurodegenerativas, todavía no hay evidencia de la presencia de cicatriz glial. Para que pueda categorizarse como cicatriz glial se deben cumplir ciertos requisitos, los cambios que sufren los astrocitos reactivos varían con la naturaleza y severidad del daño a lo largo de un continuo de alteraciones progresivas en la expresión molecular, hipertrofia celular y, en casos graves, proliferación y formación de cicatrices (Sofroniew 2009).

En los tejidos analizados, a partir de 9 meses (Figura 15, 16 y 17) es claro que algunos astrocitos se distribuyen de manera lineal a lo largo del tálamo y las regiones del hipocampo. En otro modelo específico de AAC, la astrogliosis robusta es una respuesta primaria al depósito de amiloide vascular

independiente de la activación inmunitaria microglial (Taylor et al., 2020). En este sentido, se ha tratado de dar una explicación a la elevada astrogliosis asociada a modelos de AAC; esta elevación podría deberse al papel central de los astrocitos en la unidad neurovascular, en el mantenimiento de la integridad de la BHE y la regulación del flujo sanguíneo cerebral en condiciones fisiológicas y patológicas (Taylor et al., 2020; Xie et al., 2020).

Usualmente, en el cerebro sano del ratón, los astrocitos del hipocampo tienen un contenido de GFAP mayor que los astrocitos corticales, talámicos o estriados, aunque esto indica que los astrocitos del hipocampo sean más reactivos (Revisado de Khakh y Sofroniew 2015). En los ratones C57BL/6 que analizamos, ese es el caso: encontramos que en el GD es donde hay más expresión de GFAP y en el tálamo la expresión de GFAP es muy poca (Figuras 13-14 y 18); sin embargo, en ratones Tg-SwDI donde hay más expresión de GFAP es en el tálamo. Estos astrocitos al estar en contacto con los agregados de A β acumulados y la microglía reactiva posiblemente se encuentren reactivos e incluso puede ser que se encuentren polarizados a un perfil pro-inflamatorio (A1) (Taylor et al., 2020; Xie et al., 2020). Los astrocitos A1 sufren una pérdida de función en la que no pueden mantener las sinapsis o las desensamblan activamente (Taylor et al., 2020; Xie et al., 2020). Para compensar este fenómeno se ha observado que los astrocitos forman aglomeraciones con los oligodendrocitos, también llamado red acoplada panglial, la cual solo se ha observado en el tálamo. Esta asociación mantiene la actividad sináptica mediante la entrega de metabolitos a las neuronas (Philippot et al., 2021). Son necesarios más estudios para confirmar este fenómeno en nuestro modelo, por ejemplo, evaluar más marcadores astrocíticos y su relación con los oligodendrocitos.

Encontramos diferencias en la expresión de GFAP entre machos y hembras. En la región de CA1 hay mayor expresión de GFAP en machos a los 6, 9 y 15-16 meses, en tálamo a los 15 meses y en GD a los 9 meses. Solamente observamos mayor expresión de GFAP en hembras en el tálamo a los 12 meses (Figura 19). Otro grupo reportó un aumento de GFAP en hembras Tg-SwDI a los 12 meses en hipocampo (Setti et al., 2022). Nuestros resultados no son distintos de los obtenidos por Setti y colaboradores, sin embargo, la tendencia que observamos en hipocampo indica que hay mayor expresión de GFAP en astrocitos de ratones macho. Sin embargo, otros estudios indican una elevación mayor de GFAP en hembras, ya sea en un modelo agudo de neuroinflamación (Murtaj et al., 2019) o en un modelo tipo EA (Kamphuis et al., 2014). La variabilidad de los resultados puede deberse al ambiente hormonal, ya que se ha informado que los estrógenos también tienen un papel neuroprotector en los astrocitos. Igualmente, se observó en un modelo murino de isquemia, que los estrógenos pueden modular la reactividad de los astrocitos (Wang et al., 2020).

La activación de ambas células gliales analizadas comienza a la misma edad y continúa aumentando conforme al envejecimiento de los animales, es por esta razón que nos preguntamos si se encontraban en cercanía. Al analizar la co-localización de GFAP con Iba-1 se observa que ambas células se encuentran muy cerca a los 6 meses en tálamo (Figuras 20). Una explicación es que la microglía es capaz de atraer a los astrocitos hacia el lugar de la deposición de A β mediante quimiotaxis; los astrocitos liberan quimiocinas como CL2, CXCL1 y CXCL12, y la microglía expresa ciertos receptores de quimiocinas coincidentes, como CCL2 y CXCL12. Además, los astrocitos liberan

el factor del complemento C3 que se une al receptor C3a (C3aR) en la microglia (Revisado de Wu et al., 2023). Se sabe que la microglía, incluso en estudios *in vitro*, es capaz de polarizar a los astrocitos ya sea a un perfil pro-inflamatorio o a un perfil anti-inflamatorio (Xie et al., 2020). En el modelo de inicio de deposición temprana de A β (TgCRND8) la astrogliosis robusta comienza un poco más tarde que la microgliosis, con grupos de astrocitos GFAP positivos que aparecen alrededor de las placas a las 13-14 semanas (Dudal et al., 2004). Por el contrario, en otro modelo de AAC (Tg-FDD), en etapas tempranas se describió primero la astrogliosis con un perfil pro-inflamatorio, A1, y no se describieron cambios en la microglía en esta etapa. Los autores sugieren que por la cercanía y el trabajo de los astrocitos con los vasos, estos reaccionaron primero y posteriormente polarizaron a la microglía a un fenotipo neurotóxico, mediante la liberación de múltiples componentes del complemento, (Taylor et al., 2020).

En nuestro modelo ocurre primero la deposición de A β parenquimal, y posteriormente la deposición vascular (Davis et al., 2004). Es probable que por esa razón la microglía adquiriera un fenotipo reactivo primero, intentando contener a A β . Posteriormente, la astrogliosis es mayor, ya que a partir de los 12 meses la deposición de A β es mayoritariamente en los vasos (Davis et al., 2004). Esto sugiere que la respuesta glial está condicionada a la manera en la que se acumula A β . Hasta ahora no podemos decir hacia qué perfil se polarizan las células de la glía, sin embargo, tomando como referencia algunos estudios hechos en este modelo, podemos inferir que, a partir de los 12 meses, donde se encontraron más citocinas proinflamatorias, las células de la glía están polarizadas hacia un perfil pro-inflamatorio que podría ser perjudicial (Miao et al., 2005).

Con la finalidad de ampliar la caracterización de la neuroinflamación en el modelo Tg-SwDI, decidimos evaluar la expresión de TSPO. Esta proteína mitocondrial se expresa en muchos órganos, los niveles más altos se encuentran en los tejidos que contienen células sintetizadoras de esteroides, como las células suprarrenales, las gónadas y el cerebro. En el cerebro, TSPO se ha utilizado ampliamente como biomarcador de lesión e inflamación, de hecho, se sobre-expresa en varias enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas (Rupprecht et al., 2010).

Documentamos por primera vez que la expresión de TSPO aumenta con la edad en ratones Tg-SwDI. En el tálamo de estos ratones existe un aumento desde los seis meses, lo que coincide con la activación de astrocitos y microglía y la aparición de A β . En cambio, en los ratones C57BL/6 la cantidad de TSPO no fue cuantificable (Figura 23-24). De manera similar, existe un estudio longitudinal realizado en pacientes con EA y en controles, en el que se encontró que TSPO aumentaba con la progresión de la EA, pero no en el envejecimiento saludable. Además, en dicho estudio correlacionaron el deterioro cognitivo con la aparición de TSPO mediante PET (Kreisl et al., 2016). Igualmente, en estudios realizados previamente en nuestro laboratorio, en los ratones transgénicos de la cepa transgénica 3x-TgAD, modelo murino de patología tipo EA, se observó que la expresión de TSPO aumenta con la edad (Zúñiga A., 2021).

Al comparar los machos y hembras Tg-SwDI, nosotros encontramos que de 3 a 12 meses la expresión de TSPO aumenta de manera similar en ambos sexos, pero a los 15-16 meses, la expresión de TSPO es mayor en hembras en tálamo y en GD (Figura 25). En ratones 3xTg-AD también se registró la

expresión de TSPO más pronunciada en hembras (Zúñiga A., 2021). Otros estudios de TSPO mediante PET en individuos humanos sanos no indican diferencia entre hombres y mujeres (Paul et al., 2019), sin embargo, en un estudio más reciente se ha encontrado que solo las mujeres tenían una expresión de TSPO correlacionada con la edad dentro del hipotálamo y parte del tálamo (Butler et al., 2022).

Nuestros ensayos de co-localización de TSPO con GFAP e Iba-1 sugieren que TSPO no se expresa en astrocitos (Figura 25), aunque parece que los astrocitos se encuentran rodeando a otro tipo celular que expresa TSPO, que por su forma lineal parecen ser células endoteliales. Ni siquiera en la edad donde encontramos más expresión de GFAP, 15 meses, existe co-localización con TSPO, lo que sugiere que los astrocitos en este modelo no expresan TSPO incluso en el ambiente pro-inflamatorio generado por A β . De igual manera, en el modelo murino 3x-TgAD, se observó que los astrocitos tampoco expresan TSPO (Zúñiga A., 2021), aunque en la literatura los resultados son contradictorios: hay informes que mencionan que los astrocitos expresan TSPO en función de astrogliosis (Chechneva et al., 2016; Lavisse et al., 2012).

No obstante, la proteína Iba-1 presenta una abundante co-localización con TSPO, sobre todo en la microglía que por su morfología parece ser reactiva (Figura 24). Se ha observado que mayoritariamente la expresión de TSPO es vascular y microglial (Zhang et al., 2014). En un estudio hecho en ratones con neurodegeneración inducida por priones, la expresión de TSPO disminuyó tras inhibir la proliferación de la microglía (Vicente-Rodriguez et al., 2023). En nuestro laboratorio previamente se observó que en la cepa 3xTg-AD, Iba-1 sí co-localiza con TSPO (Zúñiga A., 2021).

El papel de TSPO en la activación de la microglía es fundamental ya sea para un perfil M1 o M2. La fagocitosis por la microglía requiere una gran cantidad de energía y la deficiencia de TSPO ha demostrado ir en detrimento de la función metabólica y mitocondrial de la microglía, impidiéndole activarse y llevar a cabo la fagocitosis (Yao et al., 2020). En ratones se ha demostrado que el aumento de TSPO tiene que ver con el perfil pro-inflamatorio M1: en un estudio se describió un aumento de la expresión de TSPO después de tratar un cultivo celular con LPS, pero no hubo cambio en la expresión al administrar IL-4 (Beckers et al., 2018). De igual manera, al tratar ratones con IL-4 decrece la expresión de TSPO durante la polarización hacia un perfil neuroprotector M2, y se cree que TSPO puede participar en la polarización hacia M1 (Zhou et al., 2020). Adicionalmente, en un modelo *in vitro* en células de microglía (BV2), las células knockout (KO) para TSPO y la administración del ligando PK11195 suprimen el fenotipo M2 (Xue et al., 2022). Sin embargo, es importante aclarar que en humanos esto ha sido motivo de debate. Estudios en la microglía humana *in vitro* y mediante PET sugieren que la expresión de TSPO en la microglía es inespecífica y podría reflejar la activación de fenotipo M2 (Pozzo et al., 2022), así como M1 (Nutma et al., 2021; Revisado de Betlazar et al., 2020).

Por otra parte, la expresión de TSPO contribuye al ambiente pro-inflamatorio con la activación del inflammasoma NLRP3, crítico en la respuesta a patógenos en macrófagos (Sharma et al., 2016). Los niveles de TSPO y VDAC se correlacionan positivamente con NLRP3 y proteínas relacionadas como ASC, caspasa-1, IL-1 β e IL-18. El aumento de estas proteínas conduce a un aumento en los niveles de ROS y una limitación en la producción de ATP mitocondrial, lo que posteriormente inhibe la mitofagia y aumenta la apoptosis (Scaini et al., 2019; Gatliff et al., 2014). Las células apoptóticas liberan DAMP

adicionales que son percibidos por la microglía y estimulan aún más la maquinaria proinflamatoria, lo que lleva a la autorrenovación de ROS. Además, el estrés oxidativo conduce a una mayor producción de A β a través de la modulación de las vías de procesamiento de APP (Edler et al., 2021).

Investigaciones posteriores de la proteína TSPO y sus vías de señalización podrán esclarecer su función en la microglía y si puede ser considerada un blanco terapéutico. Algunos estudios ya han seleccionado terapias dirigidas a TSPO, tanto en periferia como en SNC. En cardiomiocitos, la disminución en la expresión de TSPO redujo la producción de ROS y en consecuencia la apoptosis (Meng et al., 2020). En SNC se ha estudiado su efecto ansiolítico. El ligando tioxina revirtió los efectos conductuales de la exposición al estrés, otro ligando de TSPO (XBD173) ejerció efectos ansiolíticos agudos (Wang et al., 2017; Verleye et al., 2003;). Estos efectos ansiolíticos pueden funcionar en pacientes con EA, ya que muchos cursan con síntomas de depresión y ansiedad (Martín-Sánchez et al., 2021).

Pocos estudios en modelos murinos mencionan la deposición de A β en el tálamo, la activación glial y la expresión de TSPO en tálamo; ya que muchas cepas no presentan deposición de A β en esta zona. En ratones TASTPM, la deposición de A β a los 6 meses está presente en hipocampo y tálamo, y también se encuentra rodeada de astrocitos y microglía (Anman et al., 2016). En el modelo 5xFAD, además de encontrar acumulación de A β en el tálamo también encontraron una reducción del volumen cerebral, específicamente clústeres de materia gris reducida (Yoo et al., 2023). Nuestros resultados robustecen la idea de usar estudios de PET de TSPO como una forma de estudiar *in vivo*, los cambios en la microglía durante la patología. De igual manera se puede apuntar a realizar más estudios de TSPO en el tálamo, los cuales no han sido descritos.

En este trabajo utilizamos ratones de diferentes edades (Figura 26), formando un estudio longitudinal, y evaluamos las diferencias entre ambos sexos. La mayoría de los estudios en pacientes se centran en una edad específica para caracterizar las células de la glía, incluso también en estudios con modelos animales. Las diferencias que encontramos con la edad y entre machos y hembras resaltan la importancia de analizar varias edades, lo que nos permite obtener una visión más completa y detallada de los cambios y la función de las células de la glía a lo largo del desarrollo de la patología, aproximándonos a una descripción más detallada de la EA.

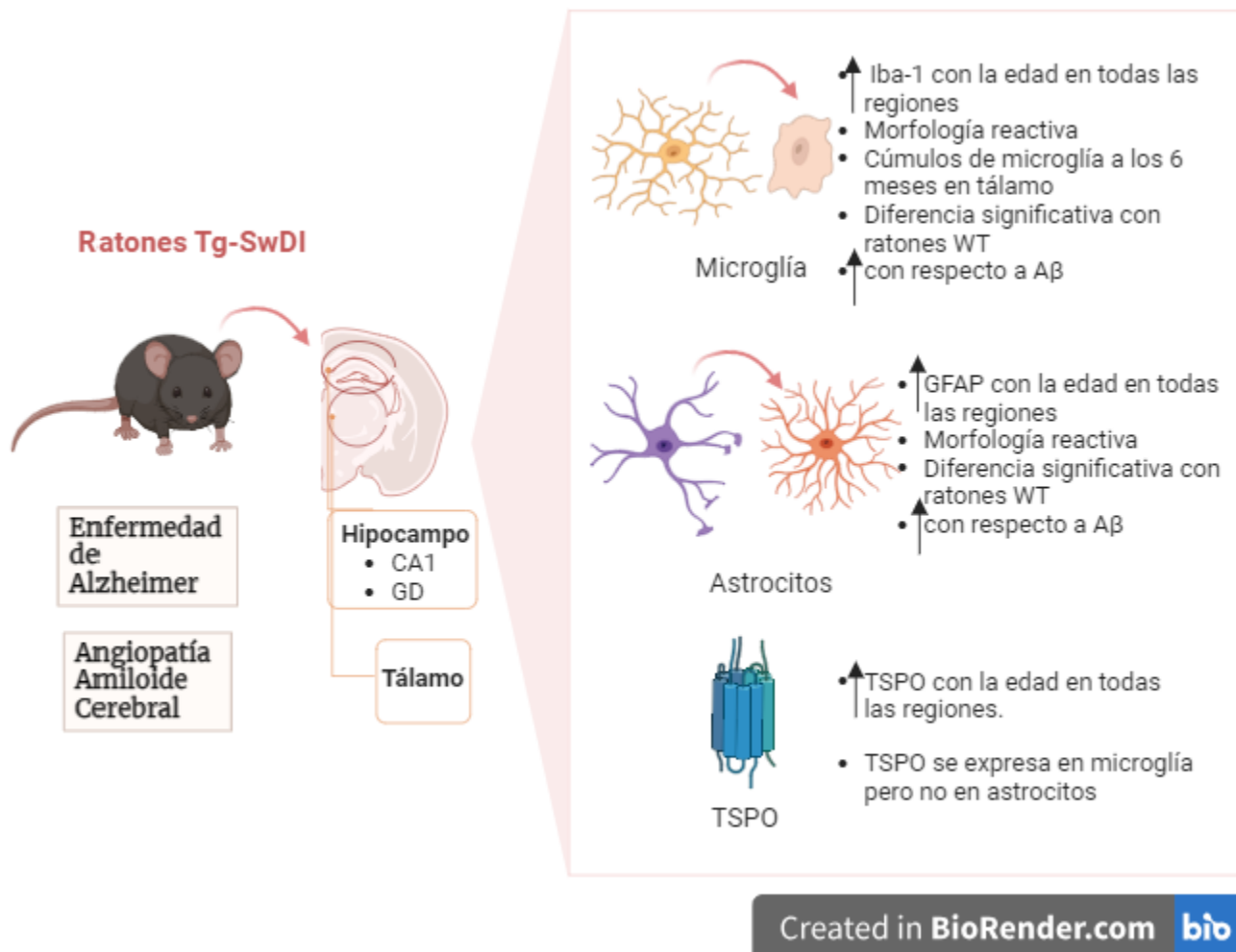


Figura 27 Neuroinflamación en el modelo murino Tg-SwDI. La cepa Tg-SwDI es un modelo de la Enfermedad de Alzheimer y la Angiopatia Amiloide Cerebral. Analizamos la región del tálamo y la región del hipocampo dividida en CA1 y Giro Dentado (GD). En resumen, hallamos que la expresión de Iba-1 aumenta con la edad, notablemente hay un aumento brusco en la expresión de Iba-1 a los 6 meses, que se acompaña de cúmulos de microglía, que probablemente estén formando una barrera protectora alrededor de las placas amiloides. La diferencia entre los ratones WT también indica que la expresión de Iba-1 aumenta con respecto a A β . GFAP también aumenta con respecto a la edad en todas las regiones, igualmente, su morfología cambia a una relacionada con un fenotipo reactivo. La expresión de GFAP en ratones Tg-SwDI es mayor que en ratones WT. Finalmente, la expresión de TSPO aumenta con la edad en todas las regiones. Nuestros análisis revelaron que TSPO se expresa en la microglía y no en astrocitos. GD Giro Dentado, Iba-1 Molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1, GFAP Proteína Ácida Fibrilar Glial, TSPO Proteína Traslocadora, WT Wild-Type, ↑ aumento.

Debido a que la neuroinflamación forma parte de las enfermedades neurodegenerativas desde etapas tempranas, es posible que se puedan refinar los métodos de detección de moléculas producidas por astrocitos y microglía para un diagnóstico temprano. Igualmente, debido a la naturaleza del desequilibrio en la eliminación y producción de A β , modular las células de la glía puede ayudar a alcanzar un estado de homeostasis y evitar el daño provocado por la neurodegeneración.

Establecer la línea temporal de la neuroinflamación durante la neurodegeneración, como se realizó en este estudio longitudinal puede ayudar a identificar un punto clave de tiempo para iniciar un tratamiento preventivo. Sin duda, un enfoque multitratamiento es esencial para reducir el riesgo de la patología. Por lo tanto, estudios como el presente ayudarán a saber en qué etapa de la patología es la adecuada para administrar medicamentos contra la neuroinflamación para mejorar la vida de los pacientes.

11. CONCLUSIONES

11.1 Conclusión General

Los ratones Tg-SwDI con patología conjunta tipo Alzheimer y AAC presentan neuroinflamación en función con la aparición de la acumulación de A β , caracterizada por la sobre-expresión de GFAP en astrocitos, Iba-1 en microglía y TSPO en microglía.

11.2 Conclusiones Particulares

- En las regiones de GD y CA1 en ratones macho y hembra del modelo Tg-SwDI, se observa un aumento en la presencia y activación de la microglía con el aumento de los agregados amiloides. El aumento no se debe únicamente a la edad ya que en los ratones C57BL/6 esto no ocurre.
- En etapas tempranas, la microglía rodea los depósitos amiloides formando un cúmulo de células en el tálamo de ratones Tg-SwDI de 6 meses, posiblemente para evitar la expansión de los agregados amiloides.
- La presencia y activación de astrocitos en ratones macho y hembra del modelo Tg-SwDI, aumenta con respecto a la presencia de A β . El aumento no se debe únicamente a la edad ya que la expresión de GFAP es mayor que en los ratones C57BL/6 de la misma edad.
- La expresión de TSPO en los ratones Tg-SwDI aumenta con la edad, pero no está presente en ratones C57BL/6, por lo que se relaciona a la patología A β .
- La TSPO es expresado por la microglía tanto en ratones Tg-SwDI jóvenes como en ratones viejos en el tálamo, mientras que los astrocitos no expresan TSPO.

12. PERSPECTIVAS

- ❖ Caracterizar los subtipos de microglía presentes en el cerebro del modelo murino Tg-SwDI en todas las edades analizadas.
- ❖ Determinar las moléculas que participen en la formación de conglomerados de microglía en el tálamo de ratones de 6 meses Tg-SwDI.
- ❖ Determinar el contenido de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias cerebrales en todas las edades del modelo murino Tg-SwDI.
- ❖ Evaluar la expresión de más marcadores astrocíticos en ratones Tg-SwDI.
- ❖ Determinar qué moléculas tanto en microglía como en astrocitos participan en la interacción entre ambas células.
- ❖ Evaluar si existe muerte celular de microglía y astrocitos en el modelo murino Tg-SwDI.
- ❖ Determinar el daño en el tálamo y el hipocampo de los ratones del modelo Tg-SwDI y correlacionarlo con la activación de astrocitos y microglía.
- ❖ Correlacionar la activación de microglía y astrocitos con pruebas conductuales en el modelo Tg-SwDI

13. REFERENCIAS

- 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>
- Allaman, I., Gavillet, M., Bélanger, M., Laroche, T., Viertl, D., Lashuel, H. A., & Magistretti, P. J. (2010). Amyloid-beta aggregates cause alterations of astrocytic metabolic phenotype: impact on neuronal viability. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(9), 3326–3338. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5098-09.2010>
- Allen, G., Barnard, H., McColl, R., Hester, A. L., Fields, J. A., Weiner, M. F., ...Cullum, C. M. (2007). Reduced Hippocampal Functional Connectivity in Alzheimer Disease. *Archives of Neurology*, 64(10), 1482. <https://doi:10.1001/archneur.64.10.1482>
- Alzheimer Association (2020), Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association.*, 16: 391-460. <https://doi.org/10.1002/alz.12068>
- Alzheimer Association (2021), 2021 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 17: 327-406. <https://doi.org/10.1002/alz.12328>
- Alzheimer Association (2022), 2022 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* 2022 Apr;18(4):700-789. doi: 10.1002/alz.12638. Epub 2022 Mar 14. PMID: 35289055.
- Aman, Y., Pitcher, T., Simeoli, R., Ballard, C., & Malcangio, M. (2016). Reduced thermal sensitivity and increased opioidergic tone in the TASTPM mouse model of Alzheimer's disease. *Pain*, 157(10), 2285–2296. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000644>
- Anderson, G. L., Manson, J., Wallace, R., Lund, B., Hall, D., Davis, S., Shumaker, S., Wang, C. Y., Stein, E., & Prentice, R. L. (2003). Implementation of the Women's Health Initiative study design. *Annals of epidemiology*, 13(9 Suppl), S5–S17. [https://doi.org/10.1016/s1047-2797\(03\)00043-7](https://doi.org/10.1016/s1047-2797(03)00043-7) .
- Attems, J., Lintner, F., & Jellinger, K. A. (2004). Amyloid beta peptide 1-42 highly correlates with capillary cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease pathology. *Acta neuropathologica*, 107(4), 283–291. <https://doi.org/10.1007/s00401-004-0822-6> .
- Baik, S. H., Kang, S., Son, S. M., & Mook-Jung, I. (2016). Microglía contributes to plaque growth by cell death due to uptake of amyloid β in the brain of Alzheimer's disease mouse model. *Glia*, 64(12), 2274–2290. <https://doi:10.1002/glia.23074>
- Barnes, L. L., Wilson, R. S., Bienias, J. L., Schneider, J. A., Evans, D. A., & Bennett, D. A. (2005). Sex differences in the clinical manifestations of Alzheimer disease pathology. *Archives of general psychiatry*, 62(6), 685–691. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.62.6.685>

- Barthélemy, N. R., Li, Y., Joseph-Mathurin, N., Gordon, B. A., Hassenstab, J., ... McDade, E. (2020). A soluble phosphorylated tau signature links tau, amyloid, and the evolution of stages of dominantly inherited Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 26(3), 398–407. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0781-z>
- Baruch, K., Rosenzweig, N., Kertser, A., Deczkowska, A., Sharif, A. M., Spinrad, A., Tsitsou-Kampeli, A., Sarel, A., Cahalon, L., & Schwartz, M. (2015). Breaking immune tolerance by targeting Foxp3(+) regulatory T cells mitigates Alzheimer's disease pathology. *Nature communications*, 6, 7967. <https://doi.org/10.1038/ncomms8967>
- Beckers, L., Ory, D., Geric, I., Declercq, L., Koole, M., Kassiou, M., Bormans, G., & Baes, M. (2018). Increased Expression of Translocator Protein (TSPO) Marks Pro-inflammatory Microglia but Does Not Predict Neurodegeneration. *Molecular imaging and biology*, 20(1), 94–102. <https://doi.org/10.1007/s11307-017-1099-1>
- Bernier, L. P., York, E. M., Kamyabi, A., Choi, H. B., Weiling, N. L., & MacVicar, B. A. (2020). Microglial metabolic flexibility supports immune surveillance of the brain parenchyma. *Nature communications*, 11(1), 1559. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15267-z0>
- Betlazar, C., Middleton, R. J., Banati, R., & Liu, G. J. (2020). The Translocator Protein (TSPO) in Mitochondrial Bioenergetics and Immune Processes. *Cells*, 9(2), 512. <https://doi.org/10.3390/cells9020512>
- Bhuniya, S., Goyal, M., Chowdhury, N., & Mishra, P. (2022). Intermittent hypoxia and sleep disruption in obstructive sleep apnea increase serum tau and amyloid-beta levels. *Journal of sleep research*, 31(5), e13566. <https://doi.org/10.1111/jsr.13566>
- Blessed, G., Tomlinson, B. E., & Roth, M. (1968). The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *The British journal of psychiatry: the journal of mental science*, 114(512), 797–811. <https://doi.org/10.1192/bjp.114.512.797>
- Böttcher, C., Schlickeiser, S., Sneebouer, M. A. M., Kunkel, D., Knop, A., Paza, E., Fidzinski, P., Kraus, L., Snijders, G. J. L., Kahn, R. S., Schulz, A. R., Mei, H. E., NBB-Psy, Hol, E. M., Siegmund, B., Glauben, R., Spruth, E. J., de Witte, L. D., & Priller, J. (2019). Human microglia regional heterogeneity and phenotypes determined by multiplexed single-cell mass cytometry. *Nature neuroscience*, 22(1), 78–90. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0290-2>
- Borst, K., Dumas, A., Prinz, M., (2021), Microglia: Immune and non-immune functions, *Immunity*, Volume 54, Issue 10, Pp 2194-2208, ISSN 1074-7613, <https://doi.org/10.10>
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Alzheimer's disease affects limbic nuclei of the thalamus. *Acta neuropathologica*, 81(3), 261–268. <https://doi.org/10.1007/BF00305867>

- Brown, C. M., Choi, E., Xu, Q., Vitek, M. P., & Colton, C. A. (2008). The APOE4 genotype alters the response of microglia and macrophages to 17beta-estradiol. *Neurobiology of aging*, 29(12), 1783–1794. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.018>
- Burwell, R. D., & Agster, K. L. (2008). Anatomy of the Hippocampus and the Declarative Memory System. *Learning and Memory: A Comprehensive Reference*, 47–66. <https://doi:10.1016/b978-012370509-9.00117-0>
- Butler, T., Glodzik, L., Wang, X. H., Xi, K., Li, Y., Pan, H., Zhou, L., Chiang, G. C., Morim, S., Wickramasuriya, N., Tanzi, E., Maloney, T., Harvey, P., Mao, X., Razlighi, Q. R., Rusinek, H., Shungu, D. C., de Leon, M., Atwood, C. S., & Mozley, P. D. (2022). Positron Emission Tomography reveals age-associated hypothalamic microglial activation in women. *Scientific Reports*, 12(1), 13351. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17315-8>
- Cagnin, A., Kassiou, M., Meikle, S. R., & Banati, R. B. (2007). Positron emission tomography imaging of neuroinflammation. *Neurotherapeutics; the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 4(3), 443–452. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2007.04.006>
- Carroll, J. C., Rosario, E. R., Kreimer, S., Villamagna, A., Gentschein, E., Stanczyk, F. Z., & Pike, C. J. (2010). Sex differences in β -amyloid accumulation in 3xTg-AD mice: role of neonatal sex steroid hormone exposure. *Brain research*, 1366, 233–245. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.10.009>
- Cassé, F., Richetin, K., & Toni, N. (2018). Astrocytes' Contribution to Adult Neurogenesis in Physiology and Alzheimer's Disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 432. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00432>
- Castellani, R. J., Rolston, R. K., & Smith, M. A. (2010). Alzheimer disease. *Disease-a-month : DM*, 56(9), 484–546. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2010.06.001>
- Cataldo, J. K., Prochaska, J. J., & Glantz, S. A. (2010). Cigarette smoking is a risk factor for Alzheimer's Disease: an analysis controlling for tobacco industry affiliation. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 19(2), 465–480. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1240>
- Chen, G., Xu, T., Yan, Y., Zhou, Y., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2017). Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38(9), 1205–1235. <https://doi:10.1038/aps.2017.28>
- Choi, E. Y., Tian, L., Su, J. H., Radovan, M. T., Tourdias, T., Tran, T. T., Trelle, A. N., Mormino, E., Wagner, A. D., & Rutt, B. K. (2022). Thalamic nuclei atrophy at high and heterogenous rates during cognitively unimpaired human aging. *NeuroImage*, 262, 119584. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2022.119584>
- Collin, S. H. P., Milivojevic, B., & Doeller, C. F. (2015). Memory hierarchies map onto the hippocampal long axis in humans. *Nature Neuroscience*, 18(11), 1562–1564. <https://doi:10.1038/nn.4138>

- Condello, C., Yuan, P., Schain, A. et al. Microglía constitute a barrier that prevents neurotoxic protofibrillar A β 42 hotspots around plaques. *Nature communications* 6, 6176 (2015). <https://doi.org/10.1038/ncomms7176>
- Contestabile A. (2011). The history of the cholinergic hypothesis. *Behavioural brain research*, 221(2), 334–340. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.044>
- Cotman, C. W., & Head, E. (2008). The Canine (Dog) Model of Human Aging and Disease: Dietary, Environmental and Immunotherapy Approaches. *Journal of Alzheimer's Disease*, 15(4), 685–707. <https://doi:10.3233/jad-2008-15413>
- Cummings, B. J., & Cotman, C. W. (1995). Image analysis of beta-amyloid load in Alzheimer's disease and relation to dementia severity. *Lancet* (London, England), 346(8989), 1524–1528. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(95\)92053-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(95)92053-6)
- Custodio, Nilton, Montesinos, Rosa, & Alarcón, Jorge O. (2018). Historical evolution of the concept and new diagnostic criteria for Dementia. *Revista de Neuro-Psiquiatría*, 81(4), 235-249. <https://dx.doi.org/10.20453/rnp.v81i4.3438>
- David, J. P., Ghazali, F., Fallet-Bianco, C., Wattez, A., Delaine, S., Boniface, B., Di Menza, C., & Delacourte, A. (1997). Glial reaction in the hippocampal formation is highly correlated with aging in human brain. *Neuroscience letters*, 235(1-2), 53–56. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(97\)00708-8](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(97)00708-8)
- Davis, J., Xu, F., Miao, J., Previti, M. L., Romanov, G., Ziegler, K., & Van Nostrand, W. E. (2006). Deficient cerebral clearance of vasculotropic mutant Dutch/Iowa Double A beta in human A betaPP transgenic mice. *Neurobiology of aging*, 27(7), 946–954. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.05.031>
- Davis, K. L., Mohs, R. C., Marin, D., Purohit, D. P., Perl, D. P., Lantz, M., Austin, G., & Haroutunian, V. (1999). Cholinergic markers in elderly patients with early signs of Alzheimer disease. *JAMA*, 281(15), 1401–1406. <https://doi.org/10.1001/jama.281.15.1401> .
- DeSimone, C. V., Graff-Radford, J., El-Harasis, M. A., Rabinstein, A. A., Asirvatham, S. J., & Holmes, D. R., Jr (2017). Cerebral Amyloid Angiopathy: Diagnosis, Clinical Implications, and Management Strategies in Atrial Fibrillation. *Journal of the American College of Cardiology*, 70(9), 1173–1182. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.07.724>
- Deng, W., Guo, S., van Veluw, S. J., Yu, Z., Chan, S. J., Takase, H., Arai, K., Ning, M., Greenberg, S. M., Lo, E. H., & Bacskai, B. J. (2022). Effects of cerebral amyloid angiopathy on the brain vasculome. *Aging cell*, 21(8), e13503. <https://doi.org/10.1111/accel.13503>
- DiSabato, D. J., Quan, N., & Godbout, J. P. (2016). Neuroinflammation: the devil is in the details. *Journal of Neurochemistry*, 139, 136–153. <https://doi:10.1111/jnc.13607>

- Drieu, A., Du, S., Storck, S. E., Rustenhoven, J., Papadopoulos, Z., Dykstra, T., Zhong, F., Kim, K., Blackburn, S., Mamuladze, T., Harari, O., Karch, C. M., Bateman, R. J., Perrin, R., Farlow, M., Chhatwal, J., Dominantly Inherited Alzheimer Network, Hu, S., Randolph, G. J., Smirnov, I., ... Kipnis, J. (2022). Parenchymal border macrophages regulate the flow dynamics of the cerebrospinal fluid. *Nature*, 611(7936), 585–593. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05397-3>
- Drummond, E., & Wisniewski, T. (2016). Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathologica*, 133(2), 155–175. <https://doi:10.1007/s00401-016-1662-x>
- Dudal, S., Krzywkowski, P., Paquette, J., Morissette, C., Lacombe, D., Tremblay, P., & Gervais, F. (2004). Inflammation occurs early during the A β deposition process in TgCRND8 mice. *Neurobiology of Aging*, 25(7), 861–871. <https://doi:10.1016/j.neurobiolaging.2003.08.008>
- Edwards Iii, G. A., Gamez, N., Escobedo, G., Jr, Calderon, O., & Moreno-Gonzalez, I. (2019). Modifiable Risk Factors for Alzheimer's Disease. *Frontiers in aging neuroscience*, 11, 146. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00146>
- Eichenbaum, H. (2017). Prefrontal–hippocampal interactions in episodic memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(9), 547–558. <https://doi:10.1038/nrn.2017.74>
- Ellis, R. J., Olichney, J. M., Thal, L. J., Mirra, S. S., Morris, J. C., Beekly, D., & Heyman, A. (1996). Cerebral amyloid angiopathy in the brains of patients with Alzheimer's disease: The CERAD experience, part XV. *Neurology*, 46(6), 1592–1596. <https://doi:10.1212/wnl.46.6.1592>
- Escartin, C., Galea, E., Lakatos, A., O'Callaghan, J. P., Petzold, G. C., Serrano-Pozo, A., ... Agarwal, A. (2021). Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nature Neuroscience*, 24(3), 312–325. <https://doi:10.1038/s41593-020-00783-4>
- Fan, L. Y., Sun, Y., Lee, H. J., Yang, S. C., Chen, T. F., Lin, K. N., Lin, C. C., Wang, P. N., Tang, L. Y., & Chiu, M. J. (2015). Marital Status, Lifestyle and Dementia: A Nationwide Survey in Taiwan. *PloS one*, 10(9), e0139154. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139154>
- Faridar, A., Vasquez, M., Thome, A. D., Yin, Z., Xuan, H., Wang, J. H., Wen, S., Li, X., Thonhoff, J. R., Zhao, W., Zhao, H., Beers, D. R., Wong, S. T. C., Masdeu, J. C., & Appel, S. H. (2022). Ex vivo expanded human regulatory T cells modify neuroinflammation in a preclinical model of Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica communications*, 10(1), 144. <https://doi.org/10.1186/s40478-022-01447-z>
- Fernandes, A.; Caldeira, C.; Cunha, C.; Ferreiro, E.; Vaz, A.R.; Brites, D. (2022) Differences in Immune Related Genes Underlie Temporal and Regional Pathological Progression in 3xTg-AD Mice. *Cell*, 11, 137. <https://doi.org/10.3390/cells11010137>
- Fessel, J. (2017). Amyloid is essential but insufficient for Alzheimer causation: addition of subcellular cofactors is required for dementia. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 33(1), e14–e21. <https://doi:10.1002/gps.4730>

- Freudenberg-Hua, Y., Li, W., & Davies, P. (2018). The Role of Genetics in Advancing Precision Medicine for Alzheimer's Disease—A Narrative Review. *Frontiers in Medicine*, 5. <https://doi:10.3389/fmed.2018.00108>
- Gallagher, J. J., Minogue, A. M., & Lynch, M. A. (2013). Impaired Performance of Female APP/PS1 Mice in the Morris Water Maze Is Coupled with Increased A β Accumulation and Microglial Activation. *Neurodegenerative Diseases*, 11(1), 33–41. <https://doi:10.1159/000337458>
- Games, D., Adams, D., Alessandrini, R., Barbour, R., Berthelette, P., Blackwell, C., Carr, T., Clemens, J., Donaldson, T., & Gillespie, F. (1995). Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature*, 373(6514), 523–527. <https://doi.org/10.1038/373523a0>
- Garcia-Bonilla, L., Moore, J. M., Racchumi, G., Zhou, P., Butler, J. M., Iadecola, C., & Anrather, J. (2014). Inducible nitric oxide synthase in neutrophils and endothelium contributes to ischemic brain injury in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 193(5), 2531–2537. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400918>
- Garfias, S., Tamaya Domínguez, B., Toledo Rojas, A., Arroyo, M., Rodríguez, U., Boll, C., Sosa, A. L., Sciutto, E., Adalid-Peralta, L., Martínez López, Y., Fragosó, G., & Fleury, A. (2019). Peripheral blood lymphocyte phenotypes in Alzheimer and Parkinson's diseases. Fenotipos de linfocitos periféricos en las enfermedades de Alzheimer y Parkinson. *Neurologia*, S0213-4853(19)30013-1. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2018.10.004>
- Gatliff, J., East, D., Crosby, J., Abeti, R., Harvey, R., Craigen, W., Parker, P., & Campanella, M. (2014). TSPO interacts with VDAC1 and triggers a ROS-mediated inhibition of mitochondrial quality control. *Autophagy*, 10(12), 2279–2296. <https://doi.org/10.4161/15548627.2014.991665>
- Gatliff, J., East, D. A., Singh, A., Alvarez, M. S., Frison, M., Matic, I., ... Campanella, M. (2017). A role for TSPO in mitochondrial Ca²⁺ homeostasis and redox stress signaling. *Cell Death and Disease*, 8(6), e2896. <https://doi:10.1038/cddis.2017.186>
- Gehrmann, J., Banati, R. B., & Kreutzberg, G. W. (1993). Microglía in the immune surveillance of the brain: Human microglía constitutively express HLA-DR molecules. *Journal of Neuroimmunology*, 48(2), 189–198. [https://doi:10.1016/0165-5728\(93\)90191-z](https://doi:10.1016/0165-5728(93)90191-z)
- Gopinath, A., Collins, A., Khoshbouei, H., & Streit, W. J. (2020). Microglia and Other Myeloid Cells in Central Nervous System Health and Disease. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 375(1), 154–160. <https://doi.org/10.1124/jpet.120.265058>
- Greenberg, S. M., Bacskai, B. J., Hernandez-Guillamon, M., Pruzin, J., Sperling, R., & van Veluw, S. J. (2019). Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease — one peptide, two pathways. *Nature Reviews Neurology*. <https://doi:10.1038/s41582-019-0281-2>

- Greenberg, S. M., Rebeck, G. W., Vonsattel, J. P., Gomez-Isla, T., & Hyman, B. T. (1995). Apolipoprotein E epsilon 4 and cerebral hemorrhage associated with amyloid angiopathy. *Annals of neurology*, 38(2), 254–259. <https://doi.org/10.1002/ana.410380219>
- Grubman, A., Choo, X. Y., Chew, G., Ouyang, J. F., Sun, G., Croft, N. P., ... Polo, J. M. (2021). Transcriptional signature in microglia associated with A β plaque phagocytosis. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi:10.1038/s41467-021-23111-1>
- Guillot-Sestier, MV., Araiz, A.R., Mela, V. et al. Microglial metabolism is a pivotal factor in sexual dimorphism in Alzheimer's disease. *Commun Biol* 4, 711 (2021). <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02259-y>
- Gustavsson, A., Norton, N., Fast, T., Frölich, L., Georges, J., Holzappel, D., Kirabali, T., Krolak-Salmon, P., Rossini, P. M., Ferretti, M. T., Lanman, L., Chadha, A. S., & van der Flier, W. M. (2023). Global estimates on the number of persons across the Alzheimer's disease continuum. *Alzheimer's & dementia: the journal of the Alzheimer's Association*, 19(2), 658–670. <https://doi.org/10.1002/alz.12694>
- Håkansson, K., Rovio, S., Helkala, E. L., Vilksa, A. R., Winblad, B., Soininen, H., Nissinen, A., Mohammed, A. H., & Kivipelto, M. (2009). Association between mid-life marital status and cognitive function in later life: population based cohort study. *BMJ (Clinical research ed.)*, 339, b2462. <https://doi.org/10.1136/bmj.b2462>
- Halford, R. W., & Russell, D. W. (2009). Reduction of cholesterol synthesis in the mouse brain does not affect amyloid formation in Alzheimer's disease, but does extend lifespan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), 3502–3506. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813349106>
- Hamby, M. E., Coppola, G., Ao, Y., Geschwind, D. H., Khakh, B. S., & Sofroniew, M. V. (2012). Inflammatory mediators alter the astrocyte transcriptome and calcium signaling elicited by multiple G-protein-coupled receptors. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(42), 14489–14510. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1256-12.2012H>
- Hardy, J. (2002). The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science*, 297(5580), 353–356. <https://doi:10.1126/science.1072994>
- Heneka, M. T., O'Banion, M. K., Terwel, D., & Kummer, M. P. (2010). Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission*, 117(8), 919–947. <https://doi:10.1007/s00702-010-0438-z>
- Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S. G., Croteau, D. L., & Bohr, V. A. (2019). Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nature reviews. Neurology*, 15(10), 565–581. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0244-7>
- Hu, J., Chen, Q., Zhu, H., Hou, L., Liu, W., Yang, Q., Shen, H., Chai, G., Zhang, B., Chen, S., Cai, Z., Wu, C., Hong, F., Li, H., Chen, S., Xiao, N., Wang, Z. X., Zhang, X., Wang, B., Zhang, L., ... Mo, W. (2023).

- Microglial Piezo1 senses A β fibril stiffness to restrict Alzheimer's disease. *Neuron*, 111(1), 15–29.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.10.021>
- Huang, Y. R., & Liu, R. T. (2020). The Toxicity and Polymorphism of β -Amyloid Oligomers. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4477. <https://doi.org/10.3390/ijms21124477>
- Hughes, C., Choi, M. L., Yi, J. H., Kim, S. C., Drews, A., George-Hyslop, P. S., Bryant, C., Gandhi, S., Cho, K., & Klenerman, D. (2020). Beta amyloid aggregates induce sensitised TLR4 signalling causing long-term potentiation deficit and rat neuronal cell death. *Communications biology*, 3(1), 79. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0792-9>
- Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., & Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain research. Molecular brain research*, 57(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(98\)00040-0](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(98)00040-0)
- Jäkel, L., Van Nostrand, W. E., Nicoll, J. A. R., Werring, D. J., & Verbeek, M. M. (2017). Animal models of cerebral amyloid angiopathy. *Clinical Science*, 131(19), 2469–2488. <https://doi:10.1042/cs20170033>
- Jaremko, M., Jaremko, Ł., Jaipuria, G., Becker, S., & Zweckstetter, M. (2015). Structure of the mammalian TSPO/PBR protein. *Biochemical Society transactions*, 43(4), 566–571. <https://doi.org/10.1042/BST20150029>
- Jha, N. K., Jha, S. K., Kumar, D., Kejriwal, N., Sharma, R., Ambasta, R. K., & Kumar, P. (2015). Impact of Insulin Degrading Enzyme and Neprilysin in Alzheimer's Disease Biology: Characterization of Putative Cognates for Therapeutic Applications. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 48(4), 891–917. <https://doi.org/10.3233/JAD-150379>
- Jimenez, S., Baglietto-Vargas, D., Caballero, C., Moreno-Gonzalez, I., Torres, M., Sanchez-Varo, R., Ruano, D., Vizuete, M., Gutierrez, A., & Vitorica, J. (2008). Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(45), 11650–11661. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3024-08.2008>
- Jyothi, H. J., Vidyadhara, D. J., Mahadevan, A., Philip, M., Parmar, S. K., Manohari, S. G., Shankar, S. K., Raju, T. R., & Alladi, P. A. (2015). Aging causes morphological alterations in astrocytes and microglia in human substantia nigra pars compacta. *Neurobiology of aging*, 36(12), 3321–3333. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.08.024>
- Kametani, F., & Hasegawa, M. (2018). Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Frontiers in neuroscience*, 12, 25. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00025>
- Kamphuis, W., Middeldorp, J., Kooijman, L., Sluijs, J. A., Kooi, E. J., Moeton, M., Freriks, M., Mizee, M. R., & Hol, E. M. (2014). Glial fibrillary acidic protein isoform expression in plaque related astrogliosis in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 35(3), 492–510. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.035>

- Kapadia, M., Mian, M. F., Michalski, B., Azam, A. B., Ma, D., Salwierz, P., Christopher, A., Rosa, E., Zovkic, I. B., Forsythe, P., Fahnestock, M., & Sakic, B. (2018). Sex-Dependent Differences in Spontaneous Autoimmunity in Adult 3xTg-AD Mice. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 63(3), 1191–1205. <https://doi.org/10.3233/JAD-170779>
- Karran, E., & De Strooper, B. (2022). The amyloid hypothesis in Alzheimer disease: new insights from new therapeutics. *Nature reviews. Drug discovery*, 21(4), 306–318. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00391-w>
- 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>
- 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>
- Kiani Shabestari, S., Morabito, S., Danhash, E. P., McQuade, A., Sanchez, J. R., Miyoshi, E., Chadarevian, J. P., Claes, C., Coburn, M. A., Hasselmann, J., Hidalgo, J., Tran, K. N., Martini, A. C., Chang Rothermich, W., Pascual, J., Head, E., Hume, D. A., Pridans, C., Davtyan, H., ... Blurton-Jones, M. (2022). Absence of microglia promotes diverse pathologies and early lethality in alzheimer 's disease mice. *Cell Reports*, 39(11), 110961. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110961>
- Killin, L. O., Starr, J. M., Shiue, I. J., & Russ, T. C. (2016). Environmental risk factors for dementia: a systematic review. *BMC geriatrics*, 16(1), 175. <https://doi.org/10.1186/s12877-016-0342-y> 00
- Kitazawa, M., Medeiros, R., & Laferla, F. M. (2012). Transgenic mouse models of Alzheimer disease: developing a better model as a tool for therapeutic interventions. *Current pharmaceutical design*, 18(8), 1131–1147. <https://doi.org/10.2174/138161212799315786>
- Klein, S. L., & Flanagan, K. L. (2016). Sex differences in immune responses. *Nature reviews. Immunology*, 16(10), 626–638. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.90>
- Koenigsknecht, J., & Landreth, G. (2004). Microglial phagocytosis of fibrillar beta-amyloid through a beta1 integrin-dependent mechanism. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(44), 9838–9846. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2557-04.2004>
- Koenigsknecht-Talboo, J., Meyer-Luehmann, M., Parsadanian, M., Garcia-Alloza, M., Finn, M. B., Hyman, B. T., Bacskai, B. J., & Holtzman, D. M. (2008). Rapid microglial response around amyloid pathology after systemic anti-Abeta antibody administration in PDAPP mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(52), 14156–14164. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4147-08.2008>
- Kolarova, M., García-Sierra, F., Bartos, A., Ricny, J., & Ripova, D. (2012). Structure and Pathology of Tau Protein in Alzheimer Disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2012, 1–13. <https://doi:10.1155/2012/731526>

Kreisl, W. C., Lyoo, C. H., Liow, J. S., Wei, M., Snow, J., Page, E., Jenko, K. J., Morse, C. L., Zoghbi, S. S., Pike, V. W., Turner, R. S., & Innis, R. B. (2016). (11)C-PBR28 binding to translocator protein increases with progression of Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 44, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2016.04.011>

Kuhn J, Sharman T. Cerebral Amyloid Angiopathy. [Updated 2021 Sep 13]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK556105/>

Lanuti, P., Ciccocioppo, F., Bonanni, L., Marchisio, M., Lachmann, R., Tabet, N., Pierdomenico, L., Santavenere, E., Catinella, V., Iacone, A., Thomas, A., Gambi, D., Miscia, S., Onofrj, M., & Kern, F. (2012). Amyloid-specific T-cells differentiate Alzheimer's disease from Lewy body dementia. *Neurobiology of aging*, 33(11), 2599–2611. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.01.004>

Lee, Y., Park, Y., Nam, H., Lee, J. W., & Yu, S. W. (2020). Translocator protein (TSPO): the new story of the old protein in neuroinflammation. *BMB reports*, 53(1), 20–27. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2020.53.1.273>

Lee, J.-W., Kim, L. E., Shim, H.-J., Kim, E.-K., Hwang, W. C., Min, D. S., & Yu, S.-W. (2016). A translocator protein 18 kDa ligand, Ro5-4864, inhibits ATP-induced NLRP3 inflammasome activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 474(3), 587–593. <https://doi:10.1016/j.bbrc.2016.04.080>

Lee, J. Y., Cole, T. B., Palmiter, R. D., Suh, S. W., & Koh, J. Y. (2002). Contribution by synaptic zinc to the gender-disparate plaque formation in human Swedish mutant APP transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(11), 7705–7710. <https://doi.org/10.1073/pnas.092034699>

Leyh, J., Paeschke, S., Mages, B., Michalski, D., Nowicki, M., Bechmann, I., & Winter, K. (2021). Classification of Microglial Morphological Phenotypes Using Machine Learning. *Frontiers in cellular neuroscience*, 15, 701673. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.701673>

Liao, Y. F., Wang, B. J., Cheng, H. T., Kuo, L. H., & Wolfe, M. S. (2004). Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interferon-gamma stimulate gamma-secretase-mediated cleavage of amyloid precursor protein through a JNK-dependent MAPK pathway. *The Journal of biological chemistry*, 279(47), 49523–49532. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402034200> .

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

Lombardo, S., & Maskos, U. (2015). Role of the nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment. *Neuropharmacology*, 96(Pt B), 255–262. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.11.018>

Malek-Ahmadi, M., Chen, K., Perez, S. E., & Mufson, E. J. (2019). Cerebral Amyloid Angiopathy and Neuritic Plaque Pathology Correlate with Cognitive Decline in Elderly Non-Demented Individuals. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 67(1), 411–422. <https://doi.org/10.3233/JAD-180765>

- Makin S. (2018). The amyloid hypothesis on trial. *Nature*, 559(7715), S4–S7. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-05719-4>
- Maniskas, M. E., Mack, A. F., Morales-Scheihing, D., Finger, C., Zhu, L., Paulter, R., Urayama, A., McCullough, L. D., & Manwani, B. (2021). Sex differences in a murine model of Cerebral Amyloid Angiopathy. *Brain, behavior, & immunity - health*, 14, 100260. <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2021.100260>
- Martín-Sánchez, A., Piñero, J., Nonell, L., Arnal, M., Ribe, E. M., Nevado-Holgado, A. & Valverde, O. (2021). Comorbidity between Alzheimer's disease and major depression: a behavioural and transcriptomic characterization study in mice. *Alzheimer's Research & Therapy*, 13(1). <https://doi:10.1186/s13195-021-00810-x>
- McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (2013). The amyloid cascade-inflammatory hypothesis of Alzheimer disease: implications for therapy. *Acta Neuropathologica*, 126(4), 479–497. <https://doi:10.1007/s00401-013-1177-7>
- McQuade, A., Kang, Y. J., Hasselmann, J., Jairaman, A., Sotelo, A., Coburn, M., Shabestari, S. K., Chadarevian, J. P., Fote, G., Tu, C. H., Danhash, E., Silva, J., Martinez, E., Cotman, C., Prieto, G. A., Thompson, L. M., Steffan, J. S., Smith, I., Davtyan, H., Cahalan, M., ... Blurton-Jones, M. (2020). Gene expression and functional deficits underlie TREM2-knockout microglia responses in human models of Alzheimer's disease. *Nature communications*, 11(1), 5370. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19227-5>
- Meng, Y., Tian, M., Yin, S., Lai, S., Zhou, Y., Chen, J., He, M., & Liao, Z. (2020). Downregulation of TSPO expression inhibits oxidative stress and maintains mitochondrial homeostasis in cardiomyocytes subjected to anoxia/reoxygenation injury. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 121, 109588. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109588>
- Miao, J., Xu, F., Davis, J., Otte-Höller, I., Verbeek, M. M., & Van Nostrand, W. E. (2005). Cerebral Microvascular Amyloid β Protein Deposition Induces Vascular Degeneration and Neuroinflammation in Transgenic Mice Expressing Human Vasculotropic Mutant Amyloid β Precursor Protein. *The American Journal of Pathology*, 167(2), 505–515. [https://doi:10.1016/s0002-9440\(10\)62993-8](https://doi:10.1016/s0002-9440(10)62993-8)
- Minett, T., Classey, J., Matthews, F. E., Fahrenhold, M., Taga, M., Brayne, C., Ince, P. G., Nicoll, J. A., Boche, D., & MRC CFAS (2016). Microglial immunophenotype in dementia with Alzheimer's pathology. *Journal of neuroinflammation*, 13(1), 135. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0601-z>
- Monterey Michael D., Wei Haichao, Wu Xizi, Wu Jia Qian (2021), The Many Faces of Astrocytes in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neurology*, 12. <https://doi: 10.3389/fneur.2021.619626>
- Morales, I., Farías, G., Cortes, N., y Maccioni, R. (2016). Neuroinflammation and Neurodegeneration, Update on Dementia, Davide Vito Moretti, IntechOpen, doi: 10.5772/64545. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/51676>

Moreno-Castila P. y Tovar-y-Romo., (2012), "Aspectos moleculares del envejecimiento". Primera edición, México. Secretaria de Salud, Instituto de Geriatria. ISBN 978-607-460-281-4

Morris, G. P., Clark, I. A., & Vissel, B. (2014). Inconsistencies and controversies surrounding the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica communications*, 2, 135. <https://doi.org/10.1186/s40478-014-0135-5>

Murtaj, V., Belloli, S., Di Grigoli, G., Pannese, M., Ballarini, E., Rodriguez-Menendez, V., Marmioli, P., Cappelli, A., Masiello, V., Monterisi, C., Bellelli, G., Panina-Bordignon, P., & Moresco, R. M. (2019). Age and Sex Influence the Neuro-inflammatory Response to a Peripheral Acute LPS Challenge. *Frontiers in aging neuroscience*, 11, 299. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00299>

Nichols, E., Szeoke, C. E. I., Vollset, S. E., Abbasi, N., Abd-Allah, F., Abdela, J., ... Asgedom, S. W. (2019). Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology*. [https://doi:10.1016/s1474-4422\(18\)30403-4](https://doi:10.1016/s1474-4422(18)30403-4)

Njie, E. G., Boelen, E., Stassen, F. R., Steinbusch, H. W., Borchelt, D. R., & Streit, W. J. (2012). Ex vivo cultures of microglia from young and aged rodent brain reveal age-related changes in microglial function. *Neurobiology of aging*, 33(1), 195.e1–195.12. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2010.05.008>

Nutma, E., Ceyzeriat, K., Amor, S., Tsartsalis, S., Millet, P., Owen, D. R., Papadopoulos, V., & Tournier, B. B. (2021). Cellular sources of TSPO expression in healthy and diseased brain. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 49(1), 146–163. <https://doi.org/10.1007/s00259-020-05166-2>

Ogrodnik, M., Evans, S. A., Fielder, E., Victorelli, S., Kruger, P., Salmonowicz, H., Weigand, B. M., Patel, A. D., Pirtskhalava, T., Inman, C. L., Johnson, K. O., Dickinson, S. L., Rocha, A., Schafer, M. J., Zhu, Y., Allison, D. B., von Zglinicki, T., LeBrasseur, N. K., Tchkonja, T., Neretti, N., ... Jurk, D. (2021). Whole-body senescent cell clearance alleviates age-related brain inflammation and cognitive impairment in mice. *Aging cell*, 20(2), e13296. <https://doi.org/10.1111/acer.13296>

Pan, J., & Wan, J. (2020). Methodological comparison of FACS and MACS isolation of enriched microglia and astrocytes from mouse brain. *Journal of Immunological Methods*, 112834. <https://doi:10.1016/j.jim.2020.112834>

Papadopoulos, V., Baraldi, M., Guilarte, T. R., Knudsen, T. B., Lacapère, J. J., Lindemann, P., Norenberg, M. D., Nutt, D., Weizman, A., Zhang, M. R., & Gavish, M. (2006). Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends in pharmacological sciences*, 27(8), 402–409. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2006.06.005>

- Passos, G. F., Medeiros, R., Cheng, D., Vasilevko, V., Laferla, F. M., & Cribbs, D. H. (2013). The bradykinin B1 receptor regulates A β deposition and neuroinflammation in Tg-SwDI mice. *The American journal of pathology*, 182(5), 1740–1749. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.01.021>
- Paul, S., Gallagher, E., Liow, J. S., Mabins, S., Henry, K., Zoghbi, S. S., Gunn, R. N., Kreisl, W. C., Richards, E. M., Zanotti-Fregonara, P., Morse, C. L., Hong, J., Kowalski, A., Pike, V. W., Innis, R. B., & Fujita, M. (2019). Building a database for brain 18 kDa translocator protein imaged using [11C] PBR28 in healthy subjects. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 39(6), 1138–1147. <https://doi.org/10.1177/0271678X18771250>
- Philippens, I. & Langermans, J. (2021). Preclinical Marmoset Model for Targeting Chronic Inflammation as a Strategy to Prevent Alzheimer's Disease. *Vaccines*. 9. 388. <https://10.3390/vaccines9040388>
- Philippot, C., Griemsmann, S., Jabs, R., Seifert, G., Kettenmann, H., & Steinhäuser, C. (2021). Astrocytes and oligodendrocytes in the thalamus jointly maintain synaptic activity by supplying metabolites. *Cell Reports*, 34(3), 108642. <https://doi:10.1016/j.celrep.2020.108642>
- Pike, C. J., Carroll, J. C., Rosario, E. R., & Barron, A. M. (2009). Protective actions of sex steroid hormones in Alzheimer's disease. *Frontiers in neuroendocrinology*, 30(2), 239–258. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2009.04.015> .
- Pozzo, E. D., Tremolanti, C., Costa, B., Giacomelli, C., Milenkovic, V. M., Bader, S., Wetzel, C. H., Rupprecht, R., Taliani, S., Settimo, F. D., & Martini, C. (2019). Microglial Pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Phenotypes Are Modulated by Translocator Protein Activation. *International journal of molecular sciences*, 20(18), 4467. <https://doi.org/10.3390/ijms20184467>
- Prinz, M., Masuda, T., Wheeler, M. A., & Quintana, F. J. (2021). Microglia and Central Nervous System-Associated Macrophages-From Origin to Disease Modulation. *Annual review of immunology*, 39, 251–277. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-093019-110159>
- Qi, X., & Ma, J. (2017). The role of amyloid beta clearance in cerebral amyloid angiopathy: more potential therapeutic targets. *Translational Neurodegeneration*, 6(1). <https://doi:10.1186/s40035-017-0091-7>
- Rabin, J. S., Nichols, E., La Joie, R., Casaletto, K. B., Palta, P., Dams-O'Connor, K., Kumar, R. G., George, K. M., Satizabal, C. L., Schneider, J. A., Pa, J., & Brickman, A. M. (2022). Cerebral amyloid angiopathy interacts with neuritic amyloid plaques to promote tau and cognitive decline. *Brain: a journal of neurology*, 145(8), 2823–2833. <https://doi.org/10.1093/brain/awac178>
- Ransohoff, R. M., Kivisäkk, P., & Kidd, G. (2003). Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nature reviews. Immunology*, 3(7), 569–581. <https://doi.org/10.1038/nri1130>

- 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>
- Rao, Y. L., Ganaraja, B., Murlimanju, B. V., Joy, T., Krishnamurthy, A., & Agrawal, A. (2022). Hippocampus and its involvement in Alzheimer's disease: a review. *3 Biotech*, 12(2), 55. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03123-4>
- Robusto-Leitao, O., & Ferreira, H. (2006). Hormones and dementia - a comparative study of hormonal impairment in post-menopausal women, with and without dementia. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 2(2), 199–206. <https://doi.org/10.2147/nedt.2006.2.2.199>
- Ruitenber, A., Ott, A., van Swieten, J. C., Hofman, A., & Breteler, M. M. B. (2001). Incidence of dementia: does gender make a difference? *Neurobiology of Aging*, 22(4), 575–580. [https://doi:10.1016/s0197-4580\(01\)00231-7](https://doi:10.1016/s0197-4580(01)00231-7)
- Rupprecht, R., Papadopoulou, V., Rammes, G., Baghai, T. C., Fan, J., Akula, N., Groyer, G., Adams, D., & Schumacher, M. (2010). Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. *Nature reviews. Drug discovery*, 9(12), 971–988. <https://doi.org/10.1038/nrd3295>
- Santello, M., Cali, C., & Bezzi, P. (2012). Gliotransmission and the tripartite synapse. *Advances in experimental medicine and biology*, 970, 307–331. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0932-8_14
- 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:10.1038/s41593-018-0325-8>
- Santos-Galindo, M., Acaz-Fonseca, E., Bellini, M. J., & Garcia-Segura, L. M. (2011). Sex differences in the inflammatory response of primary astrocytes to lipopolysaccharide. *Biology of sex differences*, 2, 7. <https://doi.org/10.1186/2042-6410-2-7>
- Scaini, G., Barichello, T., Fries, G. R., Kennon, E. A., Andrews, T., Nix, B. R., Zunta-Soares, G., Valvassori, S. S., Soares, J. C., & Quevedo, J. (2019). TSPO upregulation in bipolar disorder and concomitant downregulation of mitophagic proteins and NLRP3 inflammasome activation. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 44(7), 1291–1299. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0293-4>
- Scholtzova, H., Do, E., Dhakal, S., Sun, Y., Liu, S., Mehta, P. D., & Wisniewski, T. (2017). Innate Immunity Stimulation via Toll-Like Receptor 9 Ameliorates Vascular Amyloid Pathology in Tg-SwDI Mice with Associated Cognitive Benefits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 37(4), 936–959. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1967-16.2016>
- Sennvik, K., Fastbom, J., Blomberg, M., Wahlund, L. O., Winblad, B., & Benedikz, E. (2000). Levels of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neuroscience letters*, 278(3), 169–172. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(99\)00929-5](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(99)00929-5)

- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., & Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer's disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 1(1), a006189. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006189>
- Setti, S. E., Flanigan, T., Hanig, J., & Sarkar, S. (2022). Assessment of sex-related neuropathology and cognitive deficits in the Tg-SwDI mouse model of Alzheimer's disease. *Behavioural brain research*, 428, 113882. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2022.113882>
- Sgourakis, N. G., Yan, Y., McCallum, S. A., Wang, C., & Garcia, A. E. (2007). The Alzheimer's peptides Abeta40 and 42 adopt distinct conformations in water: a combined MD / NMR study. *Journal of molecular biology*, 368(5), 1448–1457. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.02.093>
- Sharma, D., & Kanneganti, T. D. (2016). The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *The Journal of cell biology*, 213(6), 617–629. <https://doi.org/10.1083/jcb.201602089>
- Son, S. M., Kang, S., Choi, H., & Mook-Jung, I. (2015). Statins induce insulin-degrading enzyme secretion from astrocytes via an autophagy-based unconventional secretory pathway. *Molecular neurodegeneration*, 10, 56. <https://doi.org/10.1186/s13024-015-0054-3>
- Song, H., Stevens, C. F., & Gage, F. H. (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*, 417(6884), 39–44. <https://doi.org/10.1038/417039a>
- Sturchler-Pierrat, C., & Staufenbiel, M. (2000). Pathogenic mechanisms of Alzheimer's disease analyzed in the APP23 transgenic mouse model. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 920, 134–139. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06915.x>
- Taylor, X., Cisternas, P., You, Y. et al. A1 reactive astrocytes and a loss of TREM2 are associated with an early stage of pathology in a mouse model of cerebral amyloid angiopathy. *J Neuroinflammation* 17, 223 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01900-7>
- Thal, D. R., Griffin, W. S., & Braak, H. (2008). Parenchymal and vascular Abeta-deposition and its effects on the degeneration of neurons and cognition in Alzheimer's disease. *Journal of cellular and molecular medicine*, 12(5B), 1848–1862. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00411.x>
- Tournier, B. B., Tsartsalis, S., Ceyzériat, K., Fraser, B. H., Grégoire, M. C., Kövari, E., & Millet, P. (2020). Astrocytic TSPO Upregulation Appears Before Microglial TSPO in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 77(3), 1043–1056. <https://doi.org/10.3233/JAD-200136>
- Tsvilis, D., Vann, S. D., Denby, C., Roberts, N., Mayes, A. R., Montaldi, D., & Aggleton, J. P. (2008). A disproportionate role for the fornix and mammillary bodies in recall versus recognition memory. *Nature neuroscience*, 11(7), 834–842. <https://doi.org/10.1038/nn.2149>
- Van Vickle, G. D., Esh, C. L., Dausgs, I. D., Kokjohn, T. A., Kalback, W. M., Patton, R. L., ... Roher, A. E. (2008). Tg-SwDI Transgenic Mice Exhibit Novel Alterations in AbPP Processing, Aβ Degradation, and Resilient Amyloid Angiopathy. *The American Journal of Pathology*, 173(2), 483–493. <https://doi:10.2353/ajpath.2008.071191>

Verleye, M., Heulard, I., Nuss, P., & Gillardin, J. M. (2003). Effects of stress and etifoxine on pentobarbital-induced loss of righting reflex in Balb/cByJ and C57BL/6J mice. *Neuroscience letters*, 353(2), 127–130. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2003.09.010>

Vicente-Rodríguez, M., Mancuso, R., Peris-Yague, A., Simmons, C., NIMA Consortium, Gómez-Nicola, D., Perry, V. H., Turkheimer, F., Lovestone, S., Parker, C. A., & Cash, D. (2023). Pharmacological modulation of TSPO in microglía/macrophages and neurons in a chronic neurodegenerative model of prion disease. *Journal of neuroinflammation*, 20(1), 92. <https://doi.org/10.1186/s12974-023-02769-y>

Villa, A., Gelosa, P., Castiglioni, L., Cimino, M., Rizzi, N., Pepe, G., Maggi, A. (2018). Sex-Specific Features of Microglía from Adult Mice. *Cell Reports*, 23(12), 3501–3511. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.048>

Villarejo Galende, A., Eimil Ortiz, M., Llamas Velasco, S., Llanero Luque, M., López de Silanes de Miguel, C., & Prieto Jurczynska, C. (2021). Report by the Spanish Foundation of the Brain on the social impact of Alzheimer disease and other types of dementia. Informe de la Fundación del Cerebro. Impacto social de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias. *Neurología*, 36(1), 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2017.10.005>

Walker, L. C., & Jucker, M. (2017). The Exceptional Vulnerability of Humans to Alzheimer's Disease. *Trends in Molecular Medicine*, 23(6), 534–545. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.04.001>

Wang, D. S., Han, J., Li, S., Sun, T., Guo, Y. Y., Kang, W. B., Tian, Z., Zhao, J. N., Liu, G., Liu, S. B., & Zhao, M. G. (2017). Antidepressant-Like and Anxiolytic-Like Effects of ZBD-2, a Novel Ligand for the Translocator Protein (18 kDa). *Neuromolecular medicine*, 19(1), 57–68. <https://doi.org/10.1007/s12017-016-8425-7>

Wang, J., Sareddy, G. R., Lu, Y., Pratap, U. P., Tang, F., Greene, K. M., Meyre, P. L., Tekmal, R. R., Vadlamudi, R. K., & Brann, D. W. (2020). Astrocyte-Derived Estrogen Regulates Reactive Astroglia and is Neuroprotective following Ischemic Brain Injury. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 40(50), 9751–9771. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0888-20.2020>

Wang, Y., Cella, M., Mallinson, K., Ulrich, J. D., Young, K. L., Robinette, M. L., Gilfillan, S., Krishnan, G. M., Sudhakar, S., Zinselmeyer, B. H., Holtzman, D. M., Cirrito, J. R., & Colonna, M. (2015). TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model. *Cell*, 160(6), 1061–1071. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.049>

Weaver D. F. (2023). The Immunopathy of Alzheimer's Disease: Innate or Adaptive?. *Current Alzheimer research*, 20(2), 63–70. <https://doi.org/10.2174/1567205020666230517103312>

Wlodarczyk, A., Holtman, I. R., Krueger, M., Yogev, N., Bruttger, J., Khorooshi, R., Benmamar-Badel, A., de Boer-Bergsma, J. J., Martin, N. A., Karram, K., Kramer, I., Boddeke, E. W., Waisman, A., Eggen, B. J., & Owens, T. (2017). A novel microglial subset plays a key role in myelinogenesis in developing

brain. *The EMBO journal*, 36(22), 3292–3308. <https://doi.org/10.15252/embj.201696056> Wu, J. J., Yao, M., & Ni, J. (2021). Cerebral amyloid angiopathy-related inflammation: current status and future implications. *Chinese medical journal*, 134(6), 646–654. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000001427>

Wu, F., Liu, L., & Zhou, H. (2017). Endothelial cell activation in central nervous system inflammation. *Journal of leukocyte biology*, 101(5), 1119–1132. <https://doi.org/10.1189/jlb.3RU0816-352RR>

Wu, Y., & Eisel, U. L. M. (2023). Microglia-Astrocyte Communication in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 10.3233/JAD-230199. Advance online publication. <https://doi.org/10.3233/JAD-230199>

Xie, L., Zhang, N., Zhang, Q., Li, C., Sandhu, A. F., Iii, G. W., Lin, S., Lv, P., Liu, Y., Wu, Q., & Yu, S. (2020). Inflammatory factors and amyloid β -induced microglial polarization promote inflammatory crosstalk with astrocytes. *Aging*, 12(22), 22538–22549. <https://doi.org/10.18632/aging.103663>

Xu, F., Vitek, M. P., Colton, C. A., Previti, M. L., Gharkholonarehe, N., Davis, J., & Van Nostrand, W. E. (2008). Human apolipoprotein E redistributes fibrillar amyloid deposition in Tg-SwDI mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(20), 5312–5320. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1042-08.2008>

Xu, F., Kotarba, A. E., Ou-Yang, M.-H., Fu, Z., Davis, J., Smith, S. O., & Van Nostrand, W. E. (2014). Early-onset Formation of Parenchymal Plaque Amyloid Abrogates Cerebral Microvascular Amyloid Accumulation in Transgenic Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 289(25), 17895–17908. <https://doi:10.1074/jbc.m113.536565>

Xue, X., Duan, R., Zheng, G., Chen, H., Zhang, W., & Shi, L. (2022). Translocator protein (18 kDa) regulates the microglial phenotype in Parkinson's disease through P47. *Bioengineered*, 13(4), 11061–11071. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2068754>

Yamada, M. (2002). Risk Factors for Cerebral Amyloid Angiopathy in the Elderly. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 977(1), 37–44. <https://doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb04797.x>

Yao, R., Pan, R., Shang, C., Li, X., Cheng, J., Xu, J., & Li, Y. (2020). Translocator Protein 18 kDa (TSPO) Deficiency Inhibits Microglial Activation and Impairs Mitochondrial Function. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi:10.3389/fphar.2020.00986>

Yoo, C. H., Kim, J., Baek, H. M., Chang, K. A., & Choe, B. Y. (2023). Neurodegenerative Changes in the Brains of the 5xFAD Alzheimer's Disease Model Mice Investigated by High-Field and High-Resolution Magnetic Resonance Imaging and Multi-Nuclei Magnetic Resonance Spectroscopy. *International journal of molecular sciences*, 24(6), 5073. <https://doi.org/10.3390/ijms24065073>

Zhang, L., Hu, K., Shao, T., Hou, L., Zhang, S., Ye, W., Josephson, L., Meyer, J. H., Zhang, M. R., Vasdev, N., Wang, J., Xu, H., Wang, L., & Liang, S. H. (2021). Recent developments on PET radiotracers for TSPO and their applications in neuroimaging. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, 11(2), 373–393. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.08.006>

Zhou, D., Ji, L., & Chen, Y. (2020). Correction to: TSPO Modulates IL-4-Induced Microglía/Macrophage M2 Polarization Via PPAR- γ Pathway. *Journal of molecular neuroscience* : MN, 70(7), 1164. <https://doi.org/10.1007/s12031-020-01571-2>

Zhao, P., Xu, Y., Jiang, L., Fan, X., Li, L., Li, X., Arase, H., Zhao, Y., Cao, W., Zheng, H., Xu, H., Tong, Q., Zhang, N., & An, Z. (2022). A tetravalent TREM2 agonistic antibody reduced amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science translational medicine*, 14(661), eabq0095. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abq0095>

Zúñiga Maldonado A. (2021) Caracterización de la expresión de TSPO en cerebro de ratones transgénicos 3xTg-AD con patología tipo Alzheimer [Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]

ANEXO 1. Controles secundarios

En cada experimento, bajo las mismas condiciones, se incorporó un tejido en el cual se aplicó únicamente el anticuerpo secundario, excluyendo la presencia del anticuerpo primario. Esto se hizo con el fin de eliminar cualquier posible influencia de la autofluorescencia del fluorocromo en las observaciones. A continuación, se muestran imágenes representativas de los controles negativos correspondientes a cada tinción individual (Tabla A1) y a cada tinción doble (Tabla A2).

Tabla A1. Control negativo de tinciones individuales.

Anticuerpo Secundario	Dilución	Imagen
Tinción de Iba-1		


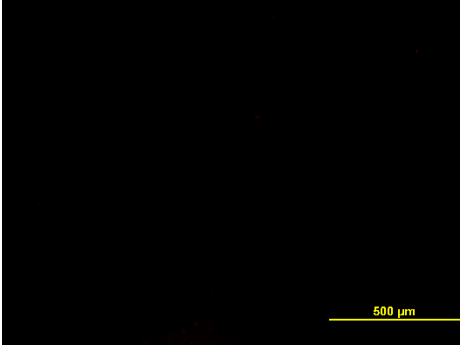
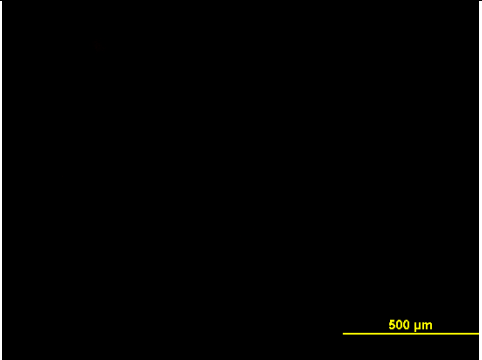
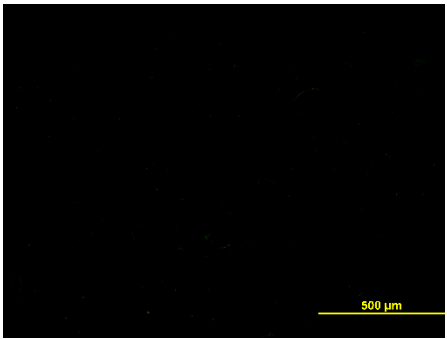
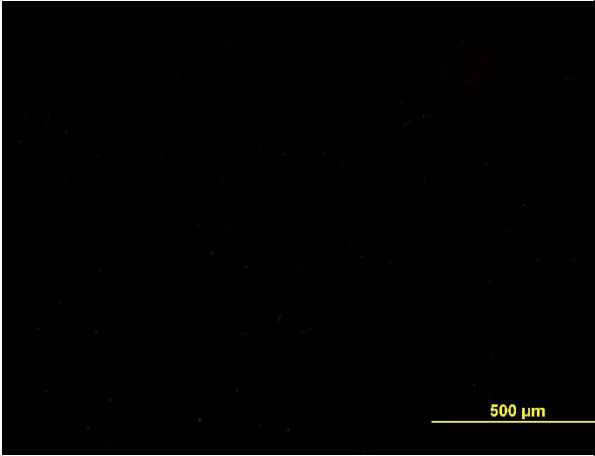
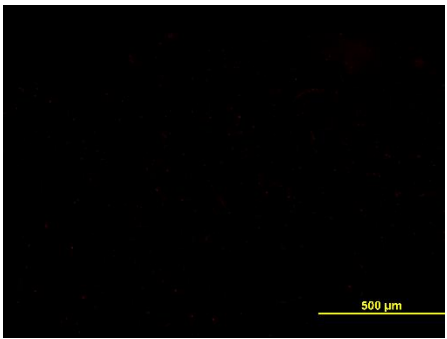
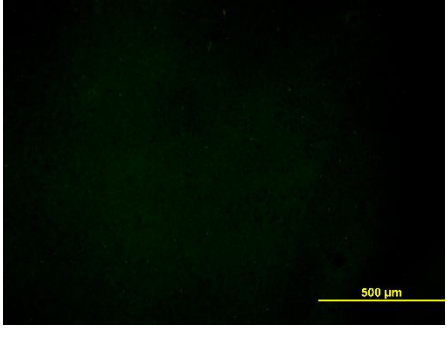
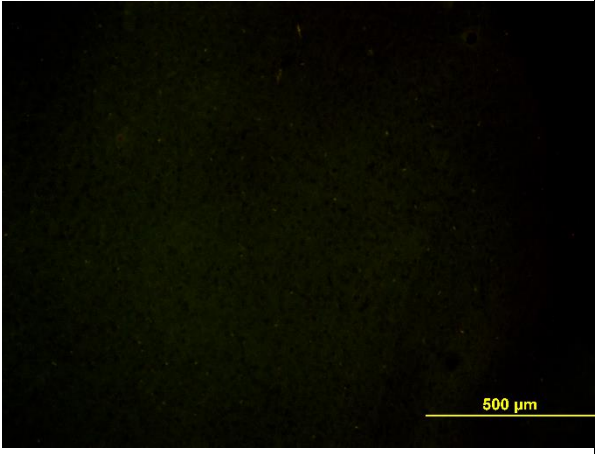
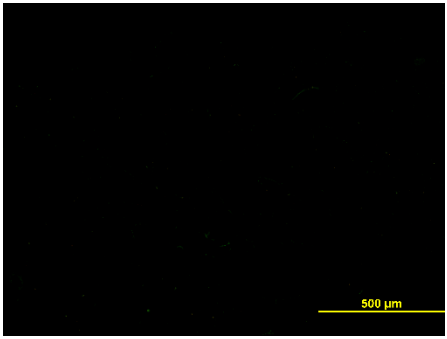
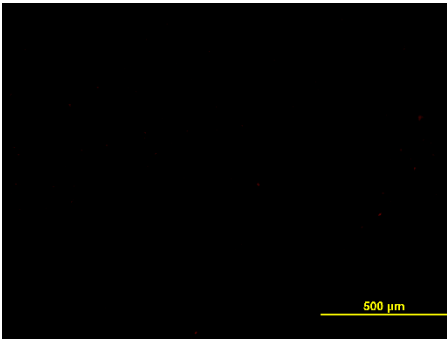
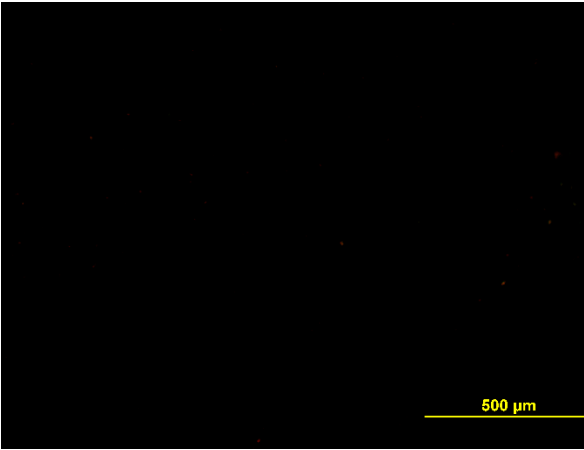
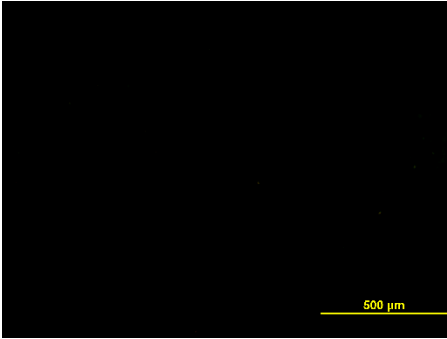
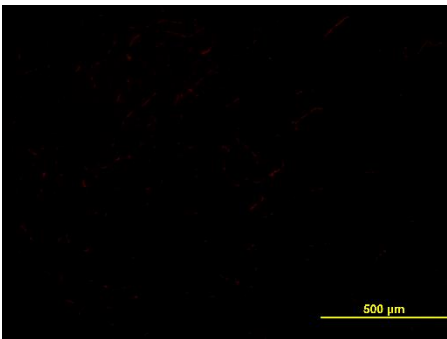
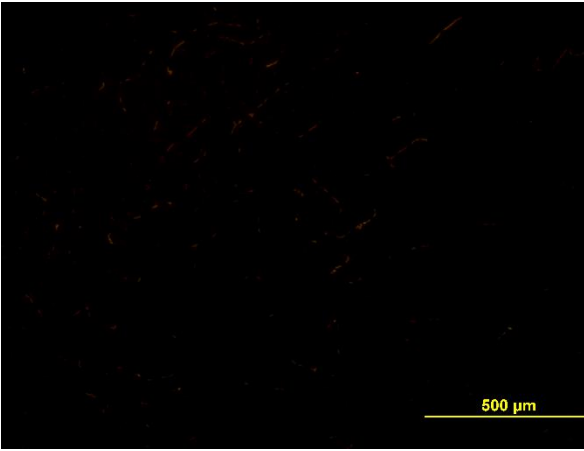
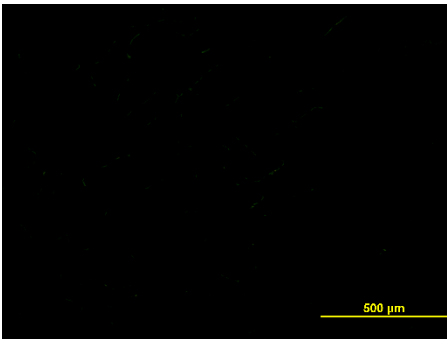
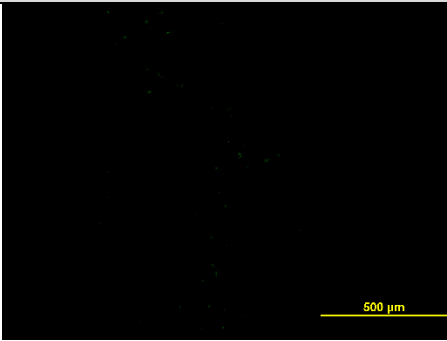
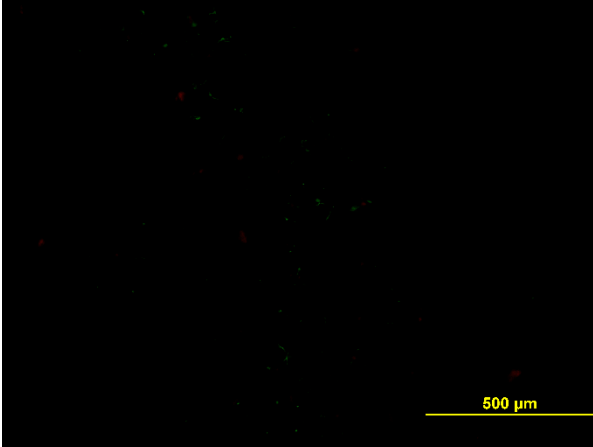
Cabra anti-IgG de conejo Alexa Fluor 594	1:500	
Tinción de GFAP		
Cabra anti IgG1de ratón Alexa Fluor 594	1:500	
Tinción de TSPO		
Cabra anti-IgG de conejo Alexa Fluor 594	1:500	

Tabla A2. Control negativo de las dobles tinciones

Anticuerpo Secundario	Dilución	Imagen	Merge
Tinción de Aβ e Iba-1			

Anticuerpo Secundario	Dilución	Imagen	Merge
Cabra anti IgG1de ratón Alexa Fluor 488	1:250		
Cabra anti-IgG de conejo Alexa Fluor 594	1:500		
Tinción de Aβ y GFAP			
Cabra anti-IgG de conejo Alexa Fluor 594	1:500		
Cabra anti IgG1de ratón Alexa Fluor 488	1:250		
Tinción de Iba-1 y GFAP			

Anticuerpo Secundario	Dilución	Imagen	Merge
Cabra anti-IgG de conejo Alexa Fluor 594	1:500		
Cabra anti IgG1de ratón Alexa Fluor 488	1:250		
Tinción de Iba-1 TSPO			
Cabra anti-IgG2a de rata Alexa Fluor 594	1:500		
Cabra anti-IgG de conejo Alexa Fluor 488	1:250		
Tinción de GFAP TSPO			

Anticuerpo Secundario	Dilución	Imagen	Merge
Cabra anti IgG1de ratón Alexa Fluor 488	1:250		
Cabra anti-IgG de conejo Alexa Fluor 594	1:500	