



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación de la expresión de GFAP
dependiente de la edad en el cerebro de
ratones Tg-SwDI, modelo de la enfermedad
de Alzheimer y angiopatía amiloide cerebral

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

DANIEL ESTEBAN MALDONADO

TUTORA

DRA. GOHAR GEVORGYAN

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2023





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno
Esteban
Maldonado
Daniel
5625660529
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
314265380
2. Datos del tutor
Dra.
Gohar
Gevorgyan
3. Datos del sinodal 1
Dra.
Rutilia Marisela
Hernández
González
4. Datos del sinodal 2
Dra.
Beatriz
Aguilar
Maldonado
5. Datos del sinodal 3
Dra.
Claudia Angélica
Garay
Canales
6. Datos del sinodal 4
Biól.
Patricia
Espinosa
Cueto
7. Datos del trabajo escrito
Evaluación de la expresión de GFAP dependiente de la edad en el cerebro de ratones
Tg-SwDI, modelo de la enfermedad de Alzheimer y angiopatía amiloide cerebral
Tesis Profesional
66 p.
2023

Agradecimientos

Este trabajo se realizó en el laboratorio de la Dra. Gohar Gevorgyan, en el departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y recibió apoyo financiero del Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA-UNAM) IN203322.

Agradezco a la Q. F. B. Alicia Mercedes Torres Paniagua por su asesoría durante la realización de mi tesis.

Agradezco al M. en C. Gilberto Adrián Rodríguez López por su asesoría durante la realización de este proyecto.

Agradezco al Biól. Exp. Gonzalo Asariel Acero Galindo, técnico del laboratorio, por su enseñanza y ayuda en el laboratorio.

Agradezco a mis sinodales: Dra. Rutilia Marisela Hernández González, Dra. Beatriz Aguilar Maldonado, Dra. Claudia Angélica Garay Canales y Biól. Patricia Espinosa Cueto por el tiempo que se tomaron para la revisión y valiosa contribución a este trabajo de tesis.

Dedicatoria

A la doctora Gohar y a Gonzali, por compartirme incondicionalmente sus conocimientos y por ser un ejemplo a seguir, no sólo como académicos sino también como personas.

A mis padres Silvia Maldonado Gómez y Gabino Antonio Esteban Morales, porque sin su sacrificio nada me hubiera sido posible.

A Jess y a nuestros queridos Ámbar, William y Ubik, por regalarme una nueva familia y otorgar un nuevo sentido a mi vida.

A mi amiga Woods, por ser un constante ejemplo de perseverancia y un apoyo incondicional en los momentos más difíciles.

A mis compañeros y amigos: Adrián, Ali, Moni y Juanito, por los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio.

Índice

Lista de figuras	1
Abreviaturas	2
Resumen	3
1. Introducción	5
1.1 Demencia	5
1.2 Enfermedad de Alzheimer	6
1.2.1 Cambios neuropatológicos en la enfermedad de Alzheimer	7
1.2.2 Proteína precursora de β -amiloide.....	9
1.2.3 Las vías amiloidogénica y no amiloidogénica de la proteína precursora de β -amiloide.....	10
1.2.4 Péptido β -amiloide	12
1.2.5 Placas amiloides.....	13
1.2.6 Hipótesis de la cascada amiloide	13
1.3 Daño cerebrovascular: angiopatía amiloide cerebral	14
1.4 Neuroinflamación.....	16
1.4.1 Astrocitos y reactividad astrocítica	17
1.5 Modelos murinos de la enfermedad de Alzheimer	19
1.5.1 Modelo murino Tg-SwDI.....	19
2. Justificación	22
2.1 ¿Por qué estudiar la enfermedad de Alzheimer y la angiopatía amiloide cerebral?.....	22
2.2 ¿Por qué estudiar el papel de la reactividad astrocítica en la enfermedad de Alzheimer y la angiopatía amiloide cerebral?	22
2.3 ¿Por qué utilizar el modelo murino Tg-SwDI?.....	23
3. Objetivos	24
3.1 Objetivo general.....	24
3.1.2 Objetivos particulares.....	24
4. Hipótesis	24
5. Materiales y métodos	25
5.1 Animales	25
5.2 Perfusión transcardiaca.....	26
5.3 Preparación de tejidos	26
5.4 Inmunofluorescencia	26
5.4.1 Incubación de anticuerpos primarios	26
5.4.2 Incubación de anticuerpos secundarios.....	27
5.5 Cuantificación de la inmunofluorescencia	28
5.6 Análisis estadísticos.....	30

6. Resultados	31
6.1 Expresión de GFAP en distintas regiones cerebrales de ratones Tg-SwDI y <i>Wild type</i>	31
6.2 Distribución espacial de GFAP y β -amiloide en el cerebro de ratones Tg-SwDI.....	33
6.3 Expresión de GFAP dependiente de la edad en el cerebro de ratones Tg-SwDI	38
6.3.1 Ratones Tg-SwDI hembra.....	38
6.3.2 Ratones Tg-SwDI macho	40
6.3.3 Comparación de los niveles de expresión de GFAP entre ratones Tg-SwDI hembras y machos	42
7. Discusión	44
7.1 Reactividad astrocítica en el cerebro de ratones Tg-SwDI	44
7.2 Interacción entre astrocitos reactivos y agregados amiloides en ratones Tg-SwDI	45
7.3 Temporalidad de la expresión de GFAP en ratones Tg-SwDI.....	46
7.3.1 Inicio de la sobreexpresión de GFAP en el cerebro de ratones Tg-SwDI	47
7.3.2 Expresión de GFAP dependiente de la edad en ratones Tg-SwDI hembra y machos....	48
7.3.3 Niveles de expresión de GFAP en ratones Tg-SwDI hembra vs machos	49
7.4 Consideraciones sobre la importancia de la astrogliosis reactiva en la patología de la enfermedad de Alzheimer	51
8. Conclusiones	53
9. Literatura citada	54

Lista de figuras

Figura 1. Comparación de la evolución de la función cognitiva durante el envejecimiento normal y patológico	6
Figura 2. Comparación entre un cerebro Sano y con enfermedad de Alzheimer	8
Figura 3. Muestras cerebrales de Auguste D, la primera persona en ser diagnosticado con lo que hoy conocemos como la enfermedad de Alzheimer, teñidas con la tinción de Bielschowsky	9
Figura 4. Procesamiento enzimático de la proteína precursora de β -amiloide a través de las vías amiloidogénica y no amiloidogénica	11
Figura 5. Drenaje perivascular de β -amiloide en condiciones normales y su alteración en la angiopatía amiloide cerebral	15
Figura 6. Inmunofluorescencia anti-GFAP del hipocampo del cerebro del ratón en astrocitos no reactivos y astrocitos reactivos	18
Figura 7. Esquema de la construcción del promotor Thy 1.2 de ratón que alberga la secuencia de la proteína precursora de β -amiloide humana triple mutante	20
Figura 8. Delimitación de las regiones cerebrales del tálamo, giro dentado y CA1	29
Figura 9. Expresión de GFAP en el cerebro de ratones Tg-SwDI vs <i>Wild type</i>	32
Figura 10. Morfología de astrocitos en giro dentado de ratones macho <i>Wild type</i> y Tg-SwDI a los 16 meses de edad	33
Figura 11. Distribución espacial de agregados β -amiloides y astrocitos en ratones Tg-SwDI hembra	35
Figura 12. Distribución espacial de agregados β -amiloides y astrocitos en ratones Tg-SwDI macho	37
Figura 13. Expresión de GFAP dependiente de la edad en ratones Tg-SwDI hembra	39
Figura 14. Expresión de GFAP dependiente de la edad en ratones Tg-SwDI macho	41
Figura 15. Comparación de los niveles de expresión de GFAP entre ratones Tg-SwDI hembra y machos	43

Abreviaturas

AAC:	angiopatía amiloide cerebral
A β :	péptido β -amiloide
ADAM:	proteína de dominio de desintegrina y metaloproteasa
ANOVA:	análisis de varianza
APP:	proteína precursora de β -amiloide
BACE:	enzima de escisión de APP en el sitio beta
CAI:	Subregión del hipocampo (cuerno de Amón)
CTF:	fragmento carboxil-terminal anclado a la membrana
DAMP:	patrón molecular asociado al daño
DAPI:	4',6-diamidino-2-fenilindol
EA:	enfermedad de Alzheimer
GD:	giro dentado
GFAP:	proteína ácida fibrilar glial
PAMP:	patrón molecular asociado a patógenos
PBS:	solución salina tamponada con fosfato
PFA:	paraformaldehído
ROI:	región de interés
sAPP:	fragmento amino-terminal APP soluble
TBS:	solución salina tamponada con Tris
Tg-SwDI	Ratón transgénico con un fondo genético C57BL/6J que expresa la APP ₇₇₀ humana con las mutaciones <i>Swedish</i> , <i>Dutch</i> e <i>Iowa</i> , bajo el control del promotor Thy 1.2.
TI:	tálamo
Wt:	tipo salvaje

Resumen

La enfermedad de Alzheimer es la forma más común de demencia en adultos mayores y frecuentemente se ve agravada por la coexistencia de la angiopatía amiloide cerebral, con la que comparte notables características patológicas. Aunque en la actualidad no se conocen con exactitud las posibles causas de la enfermedad de Alzheimer, se ha visto que los astrocitos, que pueden actuar como células inmunitarias residentes del sistema nervioso central, contribuyen en su inicio y progresión al sobreexpresar la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, por sus siglas en inglés) y tornarse reactivos, lo que interrumpe sus diversas funciones que son esenciales para el correcto funcionamiento del cerebro y, en cambio, liberan componentes neurotóxicos y proinflamatorios.

En este trabajo se buscó evaluar si la expresión de GFAP aumenta con la edad en el cerebro de ratones transgénicos Tg-SwDI; estos tienen un fondo genético C57BL/6J y expresan la proteína precursora de β -amiloide humana con las mutaciones *Swedish*, *Dutch* e *Iowa* que, en conjunto, inducen en este modelo características patológicas de la enfermedad de Alzheimer y la angiopatía amiloide cerebral. Adicionalmente, se determinó si los niveles de expresión de GFAP difieren entre ratones Tg-SwDI de distinto sexo, así como entre ratones Tg-SwDI y *Wild type* (C57BL/6J). De igual manera, se buscó analizar si en los ratones Tg-SwDI los astrocitos reactivos interactúan con los agregados de β -amiloide.

Se utilizó microscopía de inmunofluorescencia para evaluar la expresión de GFAP en el cerebro de ratones Tg-SwDI y *Wild type*; en los primeros se aplicó el método de Cuantificación de la Intensidad de Fluorescencia utilizando ROIs (*Regions of Interest*) en las regiones cerebrales del tálamo, giro dentado y la subregión del hipocampo CA1 (cuerno de Amón) y se realizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía con corrección de Welch y la prueba *post hoc* de comparaciones múltiples de Games-Howell para determinar si existían diferencias en los niveles de expresión de GFAP en ratones Tg-SwDI del mismo sexo, pero de diferente edad, y la prueba *t* de Student para muestras independientes con corrección de Welch para determinar la existencia de diferencias entre los niveles de expresión de GFAP en ratones Tg-SwDI de la misma edad, pero de diferente sexo, en cada caso, considerando estadísticamente significativo un valor de probabilidad $p < 0.05$. Adicionalmente, en ratones Tg-SwDI se realizaron ensayos de doble inmunofluorescencia para evaluar la coexpresión de GFAP y del péptido β -amiloide.

Se encontró que los ratones Tg-SwDI presentan astrogliosis reactiva, que puede estar implicada en la formación de una barrera entre los agregados de β -amiloide y el tejido circundante, así como en la limitación de su crecimiento por medio de fagocitosis. Adicionalmente, se observó que en los ratones Tg-SwDI la reactividad astrocítica comienza antes de los 3 meses de edad en CA1 y giro dentado, mientras que en el tálamo comienza entre los 4-5 meses. También se pudo determinar que en este modelo existen cambios en la expresión de GFAP dependientes de la edad, que en el caso de las hembras es siempre progresivo, pero en machos puede incrementar y disminuir, y en este último caso podría estar asociado a cambios hormonales relacionados con la senescencia reproductiva. De igual manera, se determinó que los niveles de expresión de GFAP entre ratones Tg-SwDI hembra y machos se mantienen relativamente similares en los primeros 9 meses de vida, mientras que a los 12 meses son superiores en hembras y a los 16 meses en machos.

1. Introducción

1.1 Demencia

La palabra demencia deriva del latín *de* (ausencia) y *mens* (alma, espíritu o inteligencia), sin embargo, la manera en la que se ha entendido a esta afección en el ámbito de la salud ha cambiado en el transcurso de los siglos, de tal manera que en la actualidad se define como un síndrome que se manifiesta con un deterioro global cognitivo-conductual que impide llevar a cabo las actividades sociolaborales y familiares cotidianas. Al considerar que la demencia es un síndrome, se pone de manifiesto que no es una enfermedad en sí misma, sino un conjunto de síntomas que son provocados por una o más de una enfermedad o lesión, es decir, es de carácter multi-etiológico (Acosta *et al.*, 2012; Assal, 2019).

Debido a su alta prevalencia en adultos mayores, la demencia se ha convertido en uno de los mayores retos en materia de salud pública, como ejemplo de lo anterior, la Organización Mundial de la Salud reporta que a nivel global, más de 55 millones de personas de 60 años o más padecen demencia y que cerca del 60 % de ellas viven en países de ingresos bajos y medios. Adicionalmente, se ha calculado que este número casi se duplicará cada 20 años, alcanzando los 139 millones para el año 2050 y respecto a su incidencia, se reporta que en el mundo ocurren más de 10 millones de casos cada año, el equivalente a un caso nuevo cada 3.2 segundos (Prince *et al.*, 2015, World Health Organization, 2023).

Pese a su alta incidencia en adultos mayores, la demencia no forma parte del envejecimiento normal. Como señalan Budson y Solomon (2016), se sabe que al igual que otras aptitudes, el razonamiento y la memoria se van alterando durante el envejecimiento, presentándose variaciones leves en la memoria reciente o a corto plazo que se ven reflejadas en una ligera disminución de la capacidad de aprendizaje de nuevo material y de la facultad para recordar nombres de personas o lugares. De acuerdo con dichos autores, mientras que estos cambios son parte del envejecimiento normal, en los casos en los que se presenta un déficit de memoria como consecuencia de un proceso patológico, el deterioro cognitivo es mayor a lo previsto y su secuencia sigue una trayectoria característica, como se describe a continuación:

Cuando las funciones cognitivas se deterioran a causa de un proceso patológico (Figura 1), existe una primera fase preclínica en la que los cambios en la función cognitiva aún no se

hacen evidentes; esta etapa puede iniciar décadas antes de que aparezcan síntomas detectables. Adicionalmente, antes de que se desarrolle la etapa de demencia, se encuentra una entidad diagnóstica intermedia que recibe el nombre de deterioro cognitivo leve: en esta etapa se presentan cambios leves en la memoria pero que a diferencia de lo que ocurre en la etapa de demencia, no alcanzan a interferir la independencia para las actividades diarias.

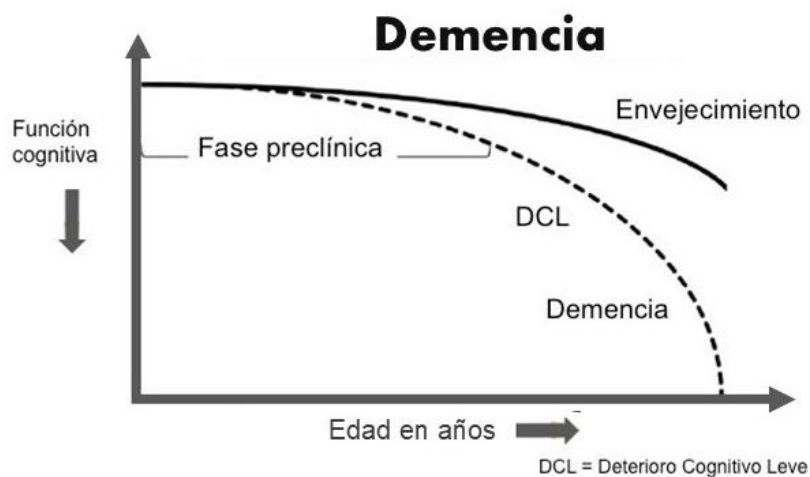


Figura 1. Comparación de la evolución de la función cognitiva durante el envejecimiento normal y patológico. Modificado de Sperling *et al.*, 2011.

1.2 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer, en adelante referida como EA, se ha establecido como la principal causa de demencia en personas mayores de 65 años, abarcando hasta un 75 % de todos los casos. Se trata de una enfermedad neurodegenerativa progresiva que se caracteriza por el deterioro prominente de la memoria episódica, aunque también puede presentarse con características disfuncionales del lenguaje, visuoespaciales o motoras. Por otra parte, es posible que la EA no se presente de manera aislada, sino que actúe de manera sinérgica con otra u otras enfermedades dando pie a una demencia de etiología múltiple (Budson y Solomon, 2016; Alireza, 2019; Knopman *et al.*, 2021).

La EA puede clasificarse de acuerdo con la edad de inicio de los síntomas, o bien, por la existencia de historia familiar, y aunque ambas clasificaciones comúnmente se superponen, si se considera el segundo criterio, se obtienen los siguientes tipos de EA:

- 1) La EA esporádica representa cerca del 95 % de todos los casos y se suele diagnosticar en personas mayores de 65 años. Este tipo de EA tiene una etiología desconocida, pero se asocia con múltiples factores de riesgo que influyen en la predisposición a padecer la enfermedad y que pueden ser tanto no modificables (genéticos) como modificables (principalmente del estilo de vida), aunque se considera que el más importante de ellos es la edad avanzada; además, este tipo de EA es más común entre las mujeres (Piaceri *et al.*, 2013; Knopman *et al.*, 2021).

Los estudios epidemiológicos muestran que las mujeres representan dos tercios de las personas que viven con EA esporádica, lo cual no puede explicarse completamente por el hecho de que las mujeres tienden a vivir más años que los hombres, ya que, como se ha mencionado anteriormente, esta enfermedad inicia décadas antes de la aparición de síntomas detectables. Aunque en la actualidad se desconocen las bases biológicas que subyacen a este mayor riesgo, se ha propuesto que la menopausia podría estar implicada en este proceso, ya que suele acompañarse de diversos síntomas neurológicos, como la alteración de los ritmos circadianos, deterioro de múltiples dominios cognitivos y depresión, que a su vez, constituyen factores de riesgo para la EA esporádica (Pike, 2017; Scheyer *et al.*, 2018; Aggarwal y Mielke, 2023).

- 2) El segundo tipo es la EA familiar que se diagnostica en personas con antecedentes familiares de demencia, casi siempre se manifiesta antes de los 65 años y obedece a un patrón de herencia autosómico dominante. Quienes padecen esta variante hereditaria de la EA presentan mutaciones ya sea en el gen de la proteína precursora de β -amiloide (*APP*, por sus siglas en inglés), *presenilina 1* o *presenilina 2*. Este tipo de mutaciones son el único factor determinista que se conoce para la EA y, pese a las notables diferencias entre ambos tipos de EA, la EA familiar es histopatológicamente similar a la EA esporádica, por lo que los estudios enfocados en una u otra variante de la enfermedad pueden ser útiles para ambos casos (Wu *et al.*, 2012; Piaceri *et al.*, 2013).

1.2.1 Cambios neuropatológicos en la enfermedad de Alzheimer

Al tratarse de una enfermedad neurodegenerativa, la EA muestra notables diferencias tanto cualitativas como cuantitativas en las tasas y patrones de atrofia cerebral cuando se comparan

con el envejecimiento normal. Aunque se sabe que el volumen cerebral disminuye, de una manera no lineal y dependiente de la región, a partir de que alcanza su punto máximo en la adolescencia, y que esta disminución se acelera a partir de los 60 años, la atrofia cerebral es notablemente más severa en personas con EA. Como ejemplo de lo anterior, se ha reportado que el promedio de la tasa anual de atrofia cerebral global es de 0.4 ± 0.7 % en adultos mayores sanos, mientras que personas con EA es de 2.4 ± 1.4 %. También se ha visto que en personas con EA esta atrofia aumenta antes de la aparición de los síntomas y se acelera a medida que avanza la enfermedad (Fox *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2003; Schott *et al.*, 2003; Fox y Schott, 2004).

La pérdida del volumen cerebral va de la mano con el aumento del volumen del sistema ventricular, que se hace evidente por una dilatación simétrica de los ventrículos laterales, así como el redondeo de sus ángulos. Adicionalmente, en el análisis *post mortem* de los cerebros de personas con EA también se suele observar el ensanchamiento de los surcos cerebrales, así como estrechamiento de las circunvoluciones, principalmente en las cortezas frontal y temporal (Figura 2) (Perl, 2010).

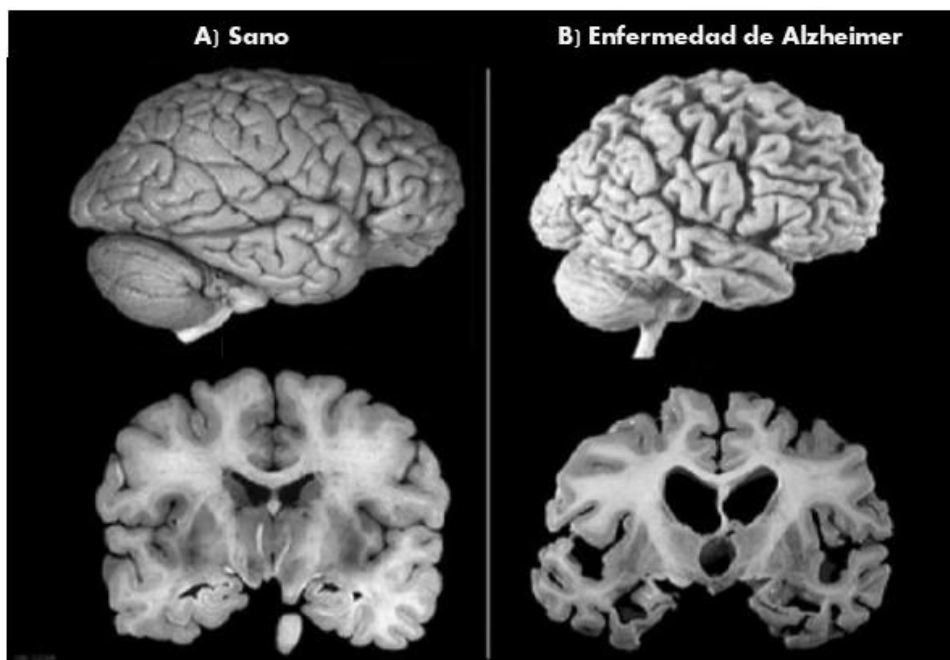


Figura 2. Comparación entre un cerebro A) Sano y B) con enfermedad de Alzheimer. Modificado de Bagad *et al.*, 2013.

A pesar de las notables afecciones macroscópicas que se observan en los cerebros de personas con EA, hasta la fecha sólo el examen histológico de muestras cerebrales *post mortem*

proporciona el medio definitivo por el cual se realiza el diagnóstico de esta enfermedad. A nivel microscópico la EA se caracteriza por dos lesiones histológicas clave (Figura 3): los ovillos neurofibrilares, que se forman en el interior de las neuronas y que están esencialmente compuestos por la acumulación de filamentos hiperfosforilados de la proteína tau (un miembro de las proteínas asociadas a los microtúbulos); y en segundo lugar, por diversas conformaciones de agregados amiloides en el parénquima cerebral que se forman por la acumulación del péptido β -amiloide ($A\beta$, por sus siglas en inglés) (Alzheimer, 1907; Dickson, 1997; Perl, 2010).

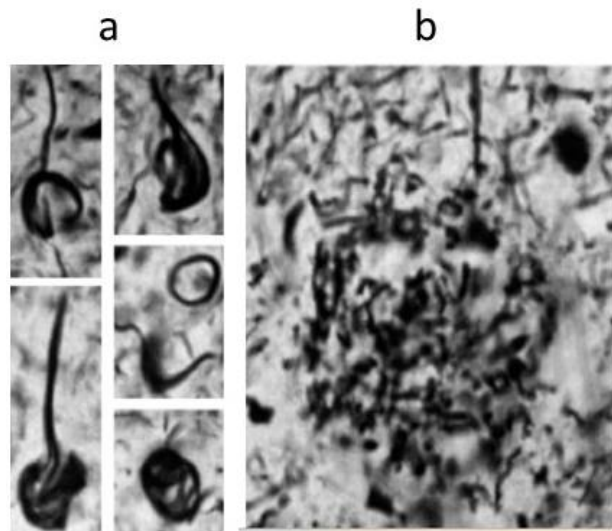


Figura 3. Muestras cerebrales de Auguste D, la primera persona en ser diagnosticado con lo que hoy conocemos como la enfermedad de Alzheimer, teñidas con la tinción de Bielschowsky. Se muestra a) ovillos neurofibrilares y b) placa amiloide. Modificado de Graeber *et al.*, 1998.

1.2.2 Proteína precursora de β -amiloide

$A\beta$ es uno de los productos de la proteólisis secuencial de la APP cuyo gen, en humanos, se encuentra en el cromosoma 21. La APP es una glicoproteína de membrana tipo 1 que se genera en 8 a 11 isoformas debido al empalme alternativo, cada una de ellas está conformada por un número particular de aminoácidos, siendo las principales isoformas APP_{751} , APP_{770} y APP_{695} ; esta última es la más abundante en el cerebro y es principalmente producida por las neuronas (Sandbrink *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2011).

No se ha determinado con exactitud el papel fisiológico de la APP, aunque se ha propuesto que desempeña un rol importante en una variedad de actividades biológicas, incluida la transmisión neuromuscular, la morfología neuronal, la plasticidad sináptica, el aprendizaje y

la memoria, entre otras. Por otra parte, un aspecto que se ha investigado de manera exhaustiva sobre esta glicoproteína es su papel en la formación de A β y se ha encontrado que la APP puede ser procesada a través de dos vías alternativas que se conocen como las vías amiloidogénica y no amiloidogénica (Dawson *et al.*, 1999; Weyer *et al.*, 2011; Hick *et al.*, 2014).

1.2.3 Las vías amiloidogénica y no amiloidogénica de la proteína precursora de β -amiloide

Existe un gran número de publicaciones acerca de las enzimas y productos de la vía amiloidogénica y no amiloidogénica de la APP, ambas se revisan ampliamente en Chow *et al.*, 2010 y Zhang *et al.*, 2011 y se resumen a continuación:

- 1) En ambas vías (Figura 4) el primer paso consiste en una escisión en la porción extracelular de la APP que es llevada a cabo por una enzima con actividad α -secretasa (vía no amiloidogénica) o β -secretasa (vía amiloidogénica), este primer paso libera los fragmentos amino-terminal APP soluble α (sAPP α) o β (sAPP β), respectivamente. Mientras que el desprendimiento de sAPP α deja un fragmento carboxil-terminal anclado a la membrana de 83 aminoácidos (CTF83), la liberación de sAPP β deja un fragmento de 99 residuos (CTF99).
- 2) Después de la actividad α - o β -secretasa, el siguiente paso, que es común a ambas vías, es la escisión llevada a cabo por la γ -secretasa que corta en el espacio intramembranal de CTF83 o CTF99, generando un pequeño péptido denominado p3 o el péptido A β , respectivamente, y que en ambos casos deja un fragmento anclado a la membrana que se conoce como dominio intracelular de APP amino-terminal.

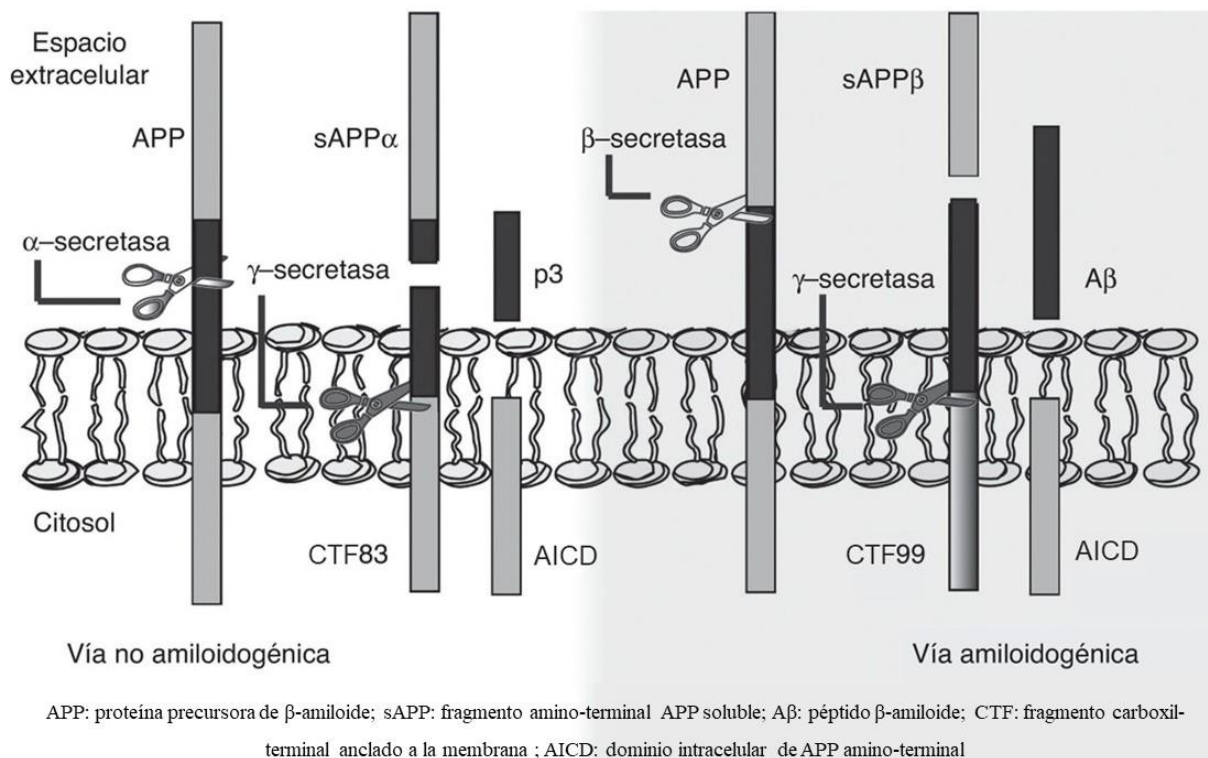


Figura 4. Procesamiento enzimático de la proteína precursora de β -amiloide a través de las vías amiloidogénica (derecha) y no amiloidogénica (izquierda). Modificado de Rius-Pérez *et al.*, 2015.

Se ha establecido que la principal β -secretasa en el cerebro es una aspartil proteasa denominada enzima 1 de escisión de APP en el sitio beta (BACE1, por sus siglas en inglés), mientras que la actividad α -secretasa está mediada por una o más de una enzima de la familia de las proteínas de dominio de desintegrina y metaloproteasa (ADAM, por sus siglas en inglés) siendo ADAM 9, 10, 17 y 19 los candidatos más probables. Por su parte, γ -secretasa es un complejo multiproteico que requiere de por lo menos cuatro proteínas para su actividad: presenilina 1 o 2, nicastrina, faringe anterior defectuosa 1 y presenilina potenciadora 2, aunque se ha visto que las presenilinas son los componentes catalíticos cruciales de este complejo (Vassar *et al.*, 1999; Asai *et al.*, 2003; De Strooper, 2003; Ahn *et al.*, 2010).

La vía no amiloidogénica es la ruta de procesamiento predominante de la APP y es llamada así porque excluye la generación de A β debido a que el sitio de escisión de la α -secretasa está dentro de su secuencia. Mientras que no se ha establecido un papel biológico claro para el fragmento p3, se ha encontrado que sAPP α es neuroprotector ante la lesión cerebral traumática y el estrés neurotóxico. En contraposición, sAPP β carece de la mayoría de los efectos neuroprotectores que se han asociado con sAPP α y en particular, A β está en el centro de la investigación sobre la patogénesis de la EA (Chow *et al.*, 2010; Corrigan *et al.*, 2012; Hick *et al.*, 2014; Milosch *et al.*, 2014).

1.2.4 Péptido β -amiloide

Debido a que la escisión de CTF99 por parte de la γ -secretasa es desigual, $A\beta$ abarca un grupo de péptidos de longitud variable (37-49 aminoácidos). Incluso en ausencia de una patología, estos péptidos se generan a lo largo de la vida y aunque su papel fisiológico no es conocido, se sabe que su producción y secreción es estimulada por la actividad sináptica. Dado que β y γ -secretasa se localizan en compartimentos endosomales y en la red trans-Golgi, se ha determinado que la mayoría de los péptidos $A\beta$ se generan en estas localizaciones subcelulares para posteriormente secretarse por exocitosis (Gómez-Ramos y Morán, 2007; Gouras *et al.*, 2015).

$A\beta$ no puede cristalizarse por métodos convencionales, por lo que la mayor parte del conocimiento sobre su estructura proviene de la espectroscopía de resonancia magnética nuclear y la dinámica molecular. Con estas técnicas se ha determinado que como monómero, $A\beta$ pertenece a la clase de los péptidos intrínsecamente desordenados, que se caracterizan por carecer de una estructura de hélice α o lámina β en un entorno acuoso, aunque se ha propuesto que pueden adquirir una estructura ordenada al unirse a otro monómero (Copani, 2017; Chen *et al.*, 2017).

Una vez secretados, los monómeros de $A\beta$ se pueden agregar entre sí hasta formar oligómeros, protofibrillas y fibrillas amiloides, siendo estas últimas polímeros proteicos lineales ricos en láminas β . Mientras que los oligómeros son solubles y pueden diseminarse por todo el cerebro, las fibrillas son insolubles y pueden ensamblarse aún más formando placas amiloides (Gorman y Chakrabartty, 2001).

En condiciones no patológicas la mayor parte del péptido $A\beta$ que se produce tiene una longitud de 40 aminoácidos ($A\beta_{40}$), mientras que el segundo péptido más abundante tiene 42 residuos ($A\beta_{42}$); estos péptidos se mantienen en una proporción aproximada $A\beta_{42}:A\beta_{40}$ de 1:9. Se ha visto que $A\beta_{42}$ es más hidrofóbico y propenso a la formación de fibrillas, por lo que es el tipo más abundante de las placas amiloides. De acuerdo con lo anterior, en diversos estudios, incluidos casos de EA familiar, se ha hecho énfasis en que los niveles elevados de $A\beta_{42}$, en relación con $A\beta_{40}$, son críticos para el desarrollo de la EA (Burdick *et al.*, 1992; Murray *et al.*, 2012; Qiu *et al.*, 2015;).

1.2.5 Placas amiloides

Las placas amiloides son estructuras complejas con una gran variedad de tipos y una nomenclatura complicada, sin embargo, los dos tipos que se observan con mayor frecuencia en personas con EA son las difusas y de núcleo denso. Las placas de núcleo denso tienen una zona central rica en amiloide que forma un núcleo compacto: cuando este tipo de placas se tiñen con rojo congo y se exponen a la luz polarizante producen birrefringencia de color verde intenso sobre un fondo oscuro, una propiedad característica de los amiloides, y también localizan fluorescencia al teñirse con tioflavina S. Un tipo particular de placas de núcleo denso son las placas neuríticas, estas adicionalmente se encuentran asociadas con neuritas distróficas que contienen tau hiperfosforilada y, además, comúnmente muestran microglía reactiva y astrocitos reactivos en su periferia (Yasuhara *et al.*, 1994; Dickson, 1997; Serrano-Pozo *et al.*, 2011; De Ture y Dickson, 2019).

A diferencia de las placas de núcleo denso, las difusas son amorfas y se tiñen débilmente con tioflavina S y rojo congo, y no muestran componentes neuríticos ni acumulación preferencial de microglía y astrocitos reactivos. Este tipo de placa es la que se observa en las etapas más tempranas de la EA y se ha propuesto que representan formas inmaduras de agregados amiloides que eventualmente se convertirán en placas de núcleo denso, no obstante, también suelen estar presentes en los cerebros de personas mayores cognitivamente sanas, por lo que se requieren más estudios para comprender su relación con el envejecimiento normal y con la patología de la EA (Thal *et al.*, 2006; Serrano-Pozo *et al.*, 2011; De Ture y Dickson, 2019).

1.2.6 Hipótesis de la cascada amiloide

Por más de 30 años la hipótesis de la cascada amiloide ha sido el modelo dominante para explicar la patogenia de la EA. De acuerdo con dicha hipótesis, la demencia por EA es consecuencia directa de un desequilibrio entre la producción y eliminación de A β , lo que provoca que este péptido se acumule en el parénquima cerebral en forma de placas amiloides, de este modo, todas las demás características neuropatológicas de esta enfermedad, incluida la formación de ovillos neurofibrilares, serían resultado directo de la agregación y acumulación de A β en el cerebro (Hardy y Higgins, 1992; Ricciarelli y Fedele, 2017).

El establecimiento de la hipótesis de la cascada amiloide se basó en la observación de que la EA podía ser causada por mutaciones autosómicas dominantes en los genes *APP*, presenilina 1 o 2, los cuales están directamente relacionados con la producción de A β , adicionalmente, se ha comprobado en múltiples estudios que los ratones que expresan la APP humana con mutaciones de la EA familiar también desarrollan lesiones características de esta enfermedad. Otro punto a favor de esta hipótesis es el hecho de que las personas con síndrome de Down, quienes portan una copia extra del cromosoma 21 que alberga el gen *APP*, suelen desarrollar demencia de inicio temprano con características neuropatológicas de la EA (Teller *et al.*, 1996; Karran *et al.*, 2011; Hall y Roberson, 2012; Castellani *et al.*, 2019).

Pese a que la hipótesis de la cascada amiloide ha guiado gran parte de la investigación básica y farmacéutica para el tratamiento de la EA, también ha recibido importantes críticas, entre las que destacan: 1) el fracaso de los ensayos clínicos que se basan en terapias anti-amiloides; 2) la observación de que los modelos murinos que expresan la APP humana con mutaciones de la EA familiar no muestran pérdida neuronal y de manera general, no replican todos los aspectos neuropatológicos de la EA; 3) no se ha demostrado que exista una correlación directa entre las placas amiloides cerebrales y el grado de demencia en personas con EA. Por lo anterior, se ha planteado la posibilidad de que la EA involucre varios mecanismos etiopatogénicos diferentes, por lo que la acumulación de A β sería necesaria pero no suficiente para producir las manifestaciones clínicas de la EA. Esto ha llevado a que en los últimos años se haya impulsado la inclusión de otros mecanismos patológicos que podrían ser la causa del inicio o la progresión de la EA, como el estrés oxidativo, el daño cerebrovascular y la neuroinflamación (Terry *et al.*, 1991; Aizenstein *et al.*, 2008; Ricciarelli y Fedele, 2017).

1.3 Daño cerebrovascular: angiopatía amiloide cerebral

La angiopatía amiloide cerebral, en adelante referida como AAC, es la acumulación cerebrovascular de A β . Mientras que A β ₄₂ es la especie predominante en las placas amiloides, A β ₄₀ es la forma más común que se agrega en los vasos sanguíneos del cerebro. Al igual que en la EA, casi todos los casos de AAC ocurren de manera esporádica, aunque existen algunas mutaciones en el gen *APP*, particularmente las que conllevan una sustitución puntual en los aminoácidos 21-23 de A β , que causan AAC hereditaria (Revesz *et al.*, 2003).

En la AAC, la acumulación cerebrovascular de $A\beta$ suele ser irregular y segmentaria, se encuentra principalmente en las arteriolas neocorticales y leptomeníngeas y raramente afecta a las vénulas. Respecto a su acumulación en la microvasculatura cerebral, la AAC se ha clasificado tomando como criterio si también afecta o no a los capilares (AAC tipo 1 y 2, respectivamente). Otro tipo de clasificación distingue entre AAC leve, cuando no se acompaña de manifestaciones clínicas, o grave, cuando se asocia con accidentes cerebrales hemorrágicos e isquémicos y demencia (Thal *et al.*, 2002; Yamada y Naiki, 2012).

Se ha discutido sobre el posible origen del péptido amiloide que se acumula en la vasculatura cerebral, aunque en la actualidad se reconoce que es de origen neuronal, esto debido a que la AAC se puede desarrollar en ratones transgénicos que expresan la APP humana exclusivamente en neuronas, aunque no se descarta una posible contribución adicional de la propia pared de los vasos. Una vez que $A\beta$ llega a la vasculatura, la integridad de los vasos sanguíneos resulta fundamental para su eliminación, sin embargo, a medida que avanza la edad, el endurecimiento de las paredes de los vasos cerebrales reduce la fuerza motriz para su drenaje. En la AAC la insuficiencia en la eliminación de $A\beta$ empeora aún más debido a que este péptido se agrega en forma de fibrillas en la lámina basal de las células del músculo liso y continúa progresivamente hasta que estas células mueren y la pared del vaso se reemplaza casi completamente por el péptido (Figura 5) (Wisniewski y Wegiel, 1994; Christen *et al.*, 2006; Weller *et al.*, 2008).

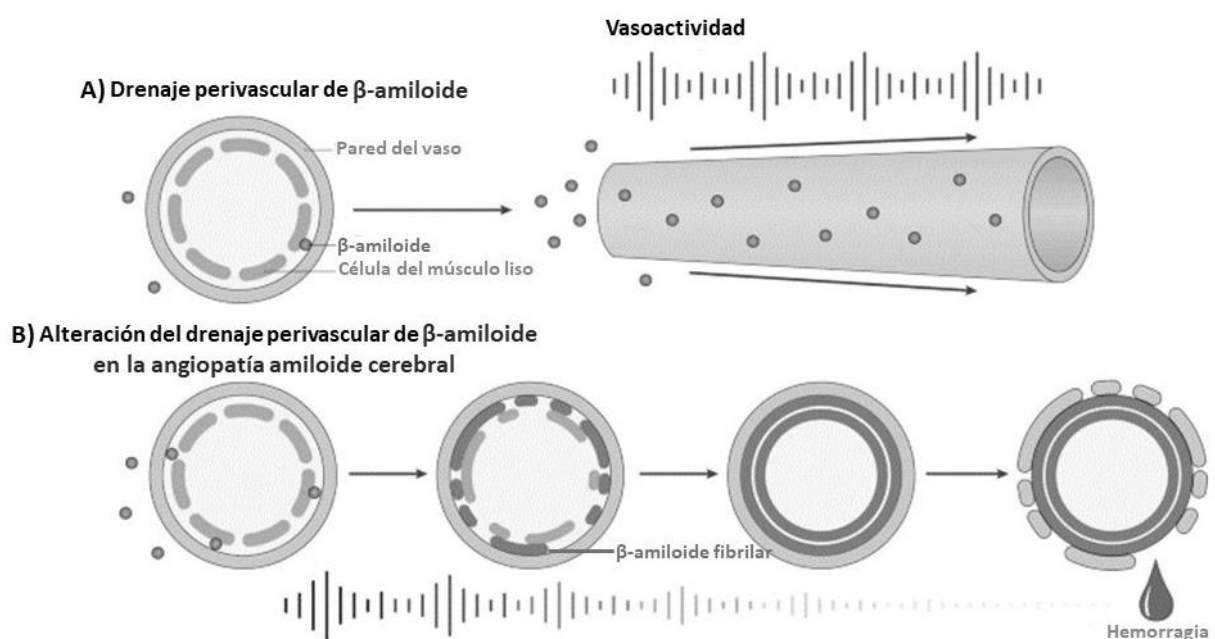


Figura 5. Drenaje perivascular de β -amiloide en A) condiciones normales y B) su alteración en la angiopatía amiloide cerebral. Modificado de Greenberg *et al.*, 2020.

El hecho de que el drenaje perivascular, una de las principales vías de eliminación de A β , se vea afectado conforme avanza la edad, explica que la AAC leve pueda observarse en la autopsia de personas ancianas que no mostraron alteraciones cognitivas en vida, sin embargo, la AAC, en cualquier grado, es mucho más prevalente en personas que cumplen con los criterios neuropatológicos de EA, mostrando una coexistencia entre ambas patologías de hasta un 80-90 %, además, la AAC se asocia con un deterioro cognitivo más grave y/o más rápido en personas que padecen EA. Debido a la estrecha relación entre ambas patologías y al papel central de A β en cada una de ellas, se ha hecho hincapié en que los estudios enfocados en la comprensión de la patogenia de la EA o la AAC pueden ser útiles para el entendimiento de ambas afecciones (Yamada *et al.*, 1987; Yamada, 2002; Boyle *et al.*, 2015; Greenberg *et al.*, 2020).

1.4 Neuroinflamación

El término neuroinflamación hace referencia a la amplia gama de respuestas inmunitarias del sistema nervioso central. Aunque anteriormente se pensaba que el cerebro era inmunológicamente privilegiado, es decir, que carecía de células inmunitarias residentes o infiltradas, en la actualidad se sabe que las células del cerebro son capaces de llevar a cabo diversas respuestas inflamatorias, de hecho, se ha establecido que la principal defensa del sistema nervioso central frente al daño o la infección está mediada por la microglía y los astrocitos; estas células expresan receptores de reconocimiento de patrones que son capaces de detectar patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) y patrones moleculares asociados al daño (DAMPs, por sus siglas en inglés), que se pueden encontrar en forma de proteínas mal plegadas, péptidos agregados (como placas amiloides o A β cerebrovascular) o ácidos nucleicos mal localizados (Heneka *et al.*, 2014; Lyman *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que la neuroinflamación juega un rol importante en diversas enfermedades neurodegenerativas, incluida la EA. Este hecho ha sido respaldado tanto por estudios epidemiológicos, que mostraron que el uso prolongado de antiinflamatorios no esteroideos reduce el riesgo de presentar la EA, así como por el hallazgo de niveles elevados de mediadores proinflamatorios en el cerebro y el líquido cefalorraquídeo de personas con EA, que incluyen componentes del sistema del complemento y citocinas proinflamatorias, como las de la familia de la interleucina-1 β . De igual manera, se ha observado una consistente

microgliosis y astrogliosis alrededor de las placas amiloides en estudios *post mortem* de personas con EA, así como en modelos animales de esta enfermedad (Itagaki *et al.*, 1989; Strohmeyer *et al.*, 2002; Olabarria *et al.*, 2010; Côté *et al.*, 2012; Fagan y Perrin, 2012).

Se ha establecido que, aunque la inflamación cerebral desempeña un papel neuroprotector durante una respuesta de fase aguda, es posible que la activación crónica de las células inmunocompetentes del cerebro las desvíe de sus funciones en el mantenimiento de la homeostasis cerebral y en cambio, propicie que liberen más mediadores proinflamatorios potenciando y contribuyendo al desarrollo y progresión de la EA, tanto o incluso más que las placas amiloides y los ovillos neurofibrilares (Heneka *et al.*, 2014; Heneka *et al.*, 2015).

1.4.1 Astrocitos y reactividad astrocítica

Después de las neuronas, los astrocitos son el tipo celular más numeroso en el sistema nervioso central, constituyen aproximadamente el 50 % del volumen del cerebro humano y tienen una distribución ubicua. Estas células también son el tipo funcionalmente más diverso del tejido nervioso y aunque por mucho tiempo se pensó que simplemente actuaban como un soporte físico para las neuronas, en la actualidad se sabe que desempeñan diversas actividades, entre las que destacan la regulación y formación de la barrera hematoencefálica, mantenimiento de la homeostasis de iones, soporte metabólico de las neuronas y reciclaje de neurotransmisores, adicionalmente, se encargan de guiar la migración neuronal y participan en las respuestas inmunitarias innatas del cerebro (Tower y Young, 1973; Squire, 2009; Rodríguez-Arellano *et al.*, 2016).

Los astrocitos son morfológicamente muy diversos, pero se caracterizan por presentar una forma estrellada (de ahí su nombre) con múltiples prolongaciones que interactúan con los vasos sanguíneos, neuronas y otras células gliales. No obstante, cuando el sistema nervioso central se expone crónicamente o de manera aguda a PAMPs o DAMPs, los astrocitos asumen un fenotipo reactivo que en parte se caracteriza por un aumento en el tamaño de su soma, el engrosamiento de sus prolongaciones y la retracción de algunos de sus procesos (Figura 6), con la consecuente pérdida de interacción con otras células. Esta hipertrofia celular ocurre, al menos en parte, por un aumento significativo en la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, por sus siglas en inglés), la cual es la principal proteína que compone los filamentos intermedios de los astrocitos maduros, por lo que esta molécula se ha convertido en el

marcador clásico para la identificación inmunohistoquímica de la astrogliosis reactiva (Hol y Pekny, 2015; Pekny y Pekna, 2004).

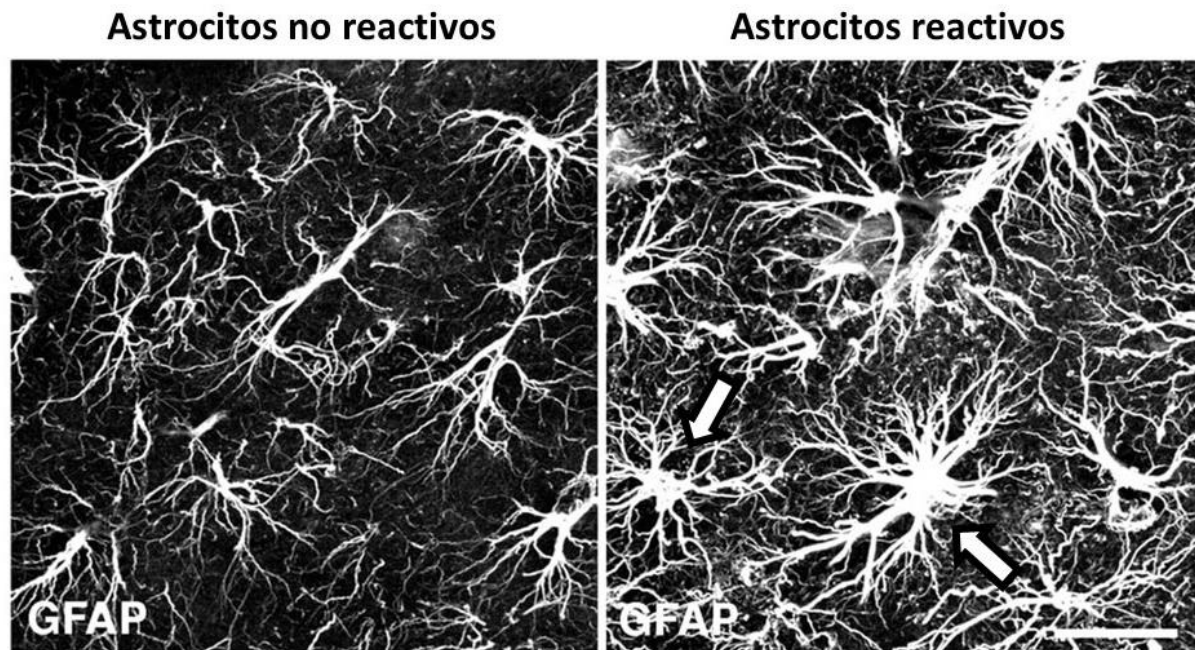


Figura 6. Inmunofluorescencia anti-GFAP del hipocampo del cerebro del ratón en A) astrocitos no reactivos y B) astrocitos reactivos. Las flechas señalan los cuerpos celulares de algunos de los astrocitos reactivos (Barra de escala, 25 μm .). Modificado de Wilhelmsson *et al.*, 2006.

Tanto en personas con EA como en modelos murinos de esta enfermedad se ha reportado una reactividad astrocítica generalizada y debido a que los astrocitos reactivos comúnmente se localizan alrededor de las placas amiloides, se sugiere que A β está implicado en este fenómeno. Aunque se ha visto que los astrocitos reactivos que rodean a los agregados amiloides son capaces de fagocitar dendritas y sinapsis degeneradas, estas células también pueden ser neurotóxicas al contribuir a los cambios neuroinflamatorios observados en la EA, ya que liberan citocinas proinflamatorias como interleucina-1 β , TNF- α y TGF- β , proteínas del sistema de complemento, especies reactivas del oxígeno, así como quimiocinas que atraen a células microgliales que a su vez, expresan más productos proinflamatorios contribuyendo a una mayor neurodegeneración. Cabe señalar que se ha demostrado que el grado de astrogliosis reactiva se relaciona positivamente con el grado de deterioro cognitivo (Shao *et al.*, 1997; Kato *et al.*, 1998; Johnstone *et al.*, 1999; Kashon *et al.*, 2004; Verkhratsky *et al.*, 2010; Carter *et al.*, 2019).

1.5 Modelos murinos de la enfermedad de Alzheimer

Los modelos murinos representan una valiosa herramienta en la investigación biomédica y en particular, los ratones tienen un importante grado de conservación filogenética con nuestra especie en cuanto a la arquitectura y función de los circuitos del hipocampo y la corteza entorrinal, que se encargan de mediar la memoria episódica, cuya alteración es la principal característica clínica de la EA. Pese a ello, los roedores no muestran de manera natural los marcadores neuropatológicos de la EA y/o AAC. Aunque la secuencia del A β de los ratones difiere al de los humanos por tan sólo tres aminoácidos (R5G, Y10F, H13R), esto parece ser suficiente para que su acumulación cerebral normal *in vivo* sea varias veces menor que en los humanos (Hall y Roberson, 2012; Esquerda-Canals *et al.*, 2017).

Para superar dichas limitaciones, desde 1995 se han generado más de 100 diferentes líneas de ratones transgénicos que se basan en la expresión de genes humanos que albergan mutaciones de la EA familiar y que recapitulan algunas de las características neuropatológicas más importantes de la EA (Jankowsky y Zheng, 2017). Uno de estos modelos es la cepa murina Tg-SwDI, la cual se utilizó para llevar a cabo la investigación expuesta en la presente tesis.

1.5.1 Modelo murino Tg-SwDI

Los ratones Tg-SwDI tienen un fondo genético C57BL/6J puro y expresan, exclusivamente en neuronas, la APP₇₇₀ humana con las mutaciones *Swedish*, *Dutch* e *Iowa*, bajo el control del promotor Thy 1.2 de ratón (Figura 7).

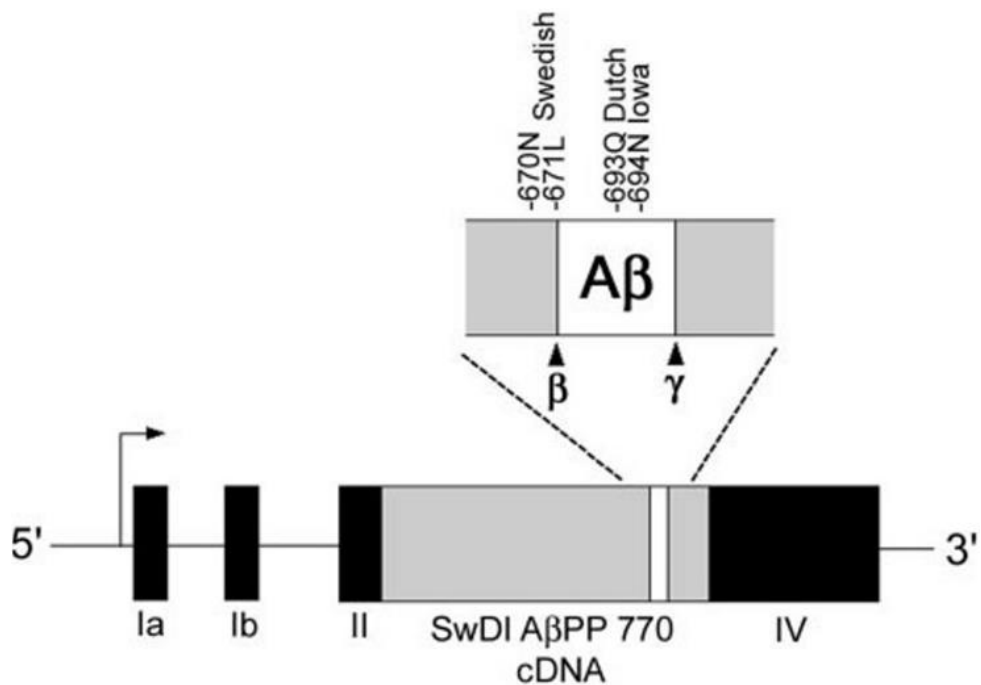


Figura 7. Esquema de la construcción del promotor Thy 1.2 de ratón que alberga la secuencia de la proteína precursora de β -amiloide humana triple mutante. El promotor estaba compuesto por cDNA de la APP₇₇₀ humana, que contenía las mutaciones *Swedish* (K670N/M671L), *Dutch* (E693Q) e *Iowa* (D694N), subclonada entre los exones II y IV de un *cassette* de expresión Thy1.2 de ratón. Las flechas indican los sitios de escisión de la β y γ - secretasa, Tomado de Davis *et al.*, 2004.

Las mutaciones *Dutch* e *Iowa* son causantes de un tipo particular de AAC familiar y se describen brevemente a continuación:

- 1) La mutación *Dutch* es la causante de la hemorragia cerebral hereditaria con amiloidosis tipo *Dutch*, la cual se ha encontrado en tres familias fundadoras de dos pueblos costeros de Países Bajos quienes desarrollaron hemorragias intracerebrales recurrentes debido a la acumulación de A β principalmente en las arterias meníngeas y arteriolas cerebrocorticales. Esta mutación consiste en la transversión de guanina a citosina en el codón 693 del gen *APP* (con respecto a la isoforma 770) que da como resultado la sustitución del aminoácido ácido glutámico (E) por glutamina (Q) en la posición 22 de A β (mutación E22Q) (Levy *et al.*, 1990; Kamp *et al.*, 2014).
- 2) La mutación *Iowa* se identificó originalmente en tres generaciones de una familia de ascendencia alemana que residía en Estados Unidos, en el estado de *Iowa*, y se asoció con leucoencefalopatía, calcificación cortical y demencia con inicio entre la sexta y séptima década de vida. Esta mutación es causada por una transición de guanina a

adenina en el codón 694 del gen *APP* (con respecto a la isoforma 770) y da como resultado la sustitución de ácido aspártico (D) por asparagina (N) en la posición 23 de A β (mutación D23N) (Grabowski *et al.*, 2001).

Existen notables similitudes entre las mutaciones *Dutch* e *Iowa*, ya que además de ser adyacentes (E22Q y D23N) y asociarse con AAC familiar, en ambos casos la sustitución puntual de aminoácidos conlleva la pérdida de una carga negativa en el péptido A β . Además, se ha reportado que los péptidos A β con la mutación *Dutch* o *Iowa* se ensamblan rápidamente *in vitro* formando fibrillas de A β_{40} y lo hacen dos veces más rápido cuando ambas mutaciones se encuentran en el mismo péptido. De igual manera, se ha observado que los péptidos A β doble mutantes D/I provocan una disminución de actina en células de músculo liso de la vasculatura cerebral y un alto grado de muerte de estas células, que es más severa que la provocada por los péptidos A β que sólo tienen una u otra mutación (Van Nostrand *et al.*, 2001).

La mutación *Swedish* se encontró en dos grandes familias suecas que presentaban casos de EA familiar; en realidad consiste en una doble sustitución de aminoácidos: lisina (K) por asparagina (N) y metionina (M) por leucina (L) (mutación K670N/M671L), y se encuentra inmediatamente adyacente al sitio de escisión de la β -secretasa, Esta mutación se ha utilizado ampliamente en el desarrollo de modelos murinos de la EA, debido a que provoca un aumento en la producción y secreción de péptidos A β de cualquier longitud, como consecuencia de la inducción de un incremento en la actividad de BACE1 (Mullan *et al.*, 1992; Rabe *et al.*, 2011).

La inclusión de las mutaciones *Swedish*, *Dutch* e *Iowa* en el transgén de la cepa Tg-SwDI, permitieron el desarrollo de un modelo murino cuya principal característica es la acumulación robusta y dependiente de la edad del péptido A β (principalmente A β_{40}) doble mutante E22Q/D23N, predominantemente en la pared de la microvasculatura cerebral, así como en forma de placas difusas en el parénquima del cerebro, por lo que constituye un excelente modelo tanto para el estudio de la EA como de la AAC (Davis *et al.*, 2004).

2. Justificación

2.1 ¿Por qué estudiar la enfermedad de Alzheimer y la angiopatía amiloide cerebral?

La enfermedad de Alzheimer (EA) y sus patologías estrechamente relacionadas, como la angiopatía amiloide cerebral (AAC), se han convertido en uno de los problemas sanitarios y socioeconómicos más importantes a nivel global, ya que su incidencia está incrementando a un ritmo alarmante a medida que aumenta la esperanza de vida en todo el mundo. Como ejemplo de lo anterior, en 2019 la EA y otras formas de demencia se situaron como la segunda causa de defunción en países de ingresos altos, superando a los accidentes cerebrovasculares. Esta enfermedad se ha establecido como la forma más común de demencia, por lo tanto, una de las principales causas de discapacidad, dependencia y muerte en adultos mayores, afectando no sólo la calidad de vida de quienes la padecen, sino también, impactando la integridad física, psicológica y económica de sus familiares y cuidadores. Pese a que la EA se describió hace ya más de un siglo, aún no se conoce su etiología y es la única enfermedad que, pese a ser una de las primeras diez causas de muerte en todo el mundo, no cuenta con un tratamiento eficaz que pueda detenerla o revertirla, ni existe alguna opción fiable para su diagnóstico preciso en vida, por lo que resulta de vital importancia continuar desentrañando los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a esta compleja enfermedad, con el fin de implementar estrategias que nos permitan prevenirla y/o detener su curso (Prince *et al.*, 2015; Doblhammer *et al.*, 2022).

2.2 ¿Por qué estudiar el papel de la reactividad astrocítica en la enfermedad de Alzheimer y la angiopatía amiloide cerebral?

Este trabajo se enfoca en el estudio de la respuesta neuroinflamatoria que acompaña a la acumulación del péptido A β en el parénquima cerebral y la cerebrovasculatura, dado que cada vez hay más evidencia que apunta a que la neuroinflamación desempeña un papel crítico en estas patologías, contribuyendo tanto a su inicio como a su progresión. De manera particular, este trabajo de tesis se enfoca en el papel que desempeñan los astrocitos en el proceso neuroinflamatorio, debido a que este tipo de glía representa una de las principales células inmunitarias residentes del sistema nervioso central, y se ha visto que, al sobreexpresar la proteína ácida glial fibrilar (GFAP, por sus siglas en inglés) y tornarse reactivas, interrumpen sus diversas funciones que son esenciales para el correcto funcionamiento del cerebro, y

además, liberan componentes neurotóxicos y proinflamatorios que exacerban el daño (Heneka *et al.*, 2014; Rodríguez-Arellano *et al.*, 2016)

2.3 ¿Por qué utilizar el modelo murino Tg-SwDI?

En la actualidad, la mayor parte del conocimiento sobre los procesos fisiopatológicos de la EA y la AAC proviene del uso de modelos murinos transgénicos que expresan genes con mutaciones autosómicas dominantes de las variantes hereditarias de estas enfermedades, uno de ellos es el modelo Tg-SwDI, que se utilizó en este trabajo de tesis debido a que se ha demostrado que recapitula la patología amiloide tanto en el parénquima cerebral como en la cerebrovasculatura, además de replicar otras características patológicas importantes de la EA como el estrés oxidativo, daño cerebrovascular, neuroinflamación, déficits cognitivos y conductuales, por lo que resulta ser un modelo único para el estudio tanto de la EA como de la AAC, así como de sus correlaciones (Davis *et al.*, 2004; Miao *et al.*, 2005a, Miao *et al.*, 2005b; Xu *et al.*, 2007; Wilcock *et al.*, 2008).

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Evaluar si la expresión de GFAP aumenta con la edad en el cerebro de ratones Tg-SwDI y de ser así, establecer si difiere entre hembras y machos.

3.1.2 Objetivos particulares

- 1) Comparar si existen diferencias en la expresión de GFAP entre ratones Tg-SwDI y C57BL/6J, así como en la morfología de sus astrocitos.
- 2) Observar si en el modelo murino Tg-SwDI los agregados de A β y astrocitos se encuentran en las mismas regiones.
- 3) Evaluar la expresión de GFAP en las regiones cerebrales del tálamo, giro dentado y CA1 de ratones Tg-SwDI hembra y machos a los 3, 6, 9, 12 y 16 meses de edad.

4. Hipótesis

Dado que el modelo murino Tg-SwDI desarrolla una acumulación del péptido β -amiloide robusta y dependiente de la edad, se espera que, al igual que ocurre en cerebros de personas y modelos murinos de la enfermedad de Alzheimer, esta acumulación se acompañe de un aumento significativo de la expresión de GFAP que podría variar en función del sexo.

5. Materiales y métodos

5.1 Animales

Se utilizaron ratones transgénicos Tg-SwDI homocigóticos, que tienen un fondo genético C57BL/6J y expresan la APP humana (isoforma 770) con las mutaciones *Swedish*, *Dutch* e *Iowa* bajo el control del promotor Thy 1.2 de ratón (Davis *et al.*, 2004), así como ratones C57BL/6J, en adelante referidos como Wt (*Wild type*), que sirvieron como controles comparativos. En ambos casos las cepas fueron adquiridas de *Jackson Laboratories*. En los ensayos de inmunofluorescencia para evaluar la expresión de GFAP, de la cepa Tg-SwDI se utilizaron 30 ratones hembra (seis por cada grupo de edad: 3, 6, 9, 12 y 16 meses) y 30 ratones macho (seis por cada grupo de edad: 3, 6, 9, 12 y 16 meses), mientras que de la cepa Wt se utilizaron 15 ratones hembra y 15 machos (tres por cada grupo de edad: 3, 6, 9, 12 y 16 meses). Adicionalmente, se utilizaron 4 hembras y 4 machos de la cepa Tg-SwDI (uno por cada grupo de edad: 6, 9, 12 y 16 meses) en ensayos de doble inmunofluorescencia para evaluar la expresión de GFAP y la presencia de A β .

La expresión de GFAP comenzó a evaluarse a partir de los 3 meses de edad, debido a que se ha reportado que en los ratones Tg-SwDI la acumulación de A β inicia en esta etapa de la vida, principalmente en forma de placas difusas en el parénquima cerebral (Davis *et al.*, 2004). Adicionalmente, la evaluación de esta expresión se realizó en intervalos de 3 meses, con el fin de proporcionar un seguimiento más exhaustivo de lo que se ha reportado hasta el momento para esta cepa, pasando por distintas fases del ciclo de vida del ratón como la adultez madura, que en ratones va de los 3-6 meses de edad, el equivalente a los 20-30 años en humanos; la vida media, que en ratones comprende los 10-14 meses de edad, el equivalente a los 38-47 años en humanos; y la transición a la vejez, que en ratones ocurre en el intervalo de los 15-16 meses de edad, el equivalente a los 48-55 años en humanos (Fox *et al.*, 2007).

Los ratones se alojaron en las instalaciones del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo condiciones de humedad y temperatura controladas, en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y tuvieron acceso a comida y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos fueron autorizados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, en el proyecto de investigación aprobado y registrado con número ID 209.

5.2 Perfusión transcardiaca

Los ratones Tg-SwDI y Wt se sacrificaron a la edad específica mediante perfusión transcardiaca con solución salina a 4° C como se describe a continuación: previo a la perfusión, los animales fueron anestesiados profundamente por inhalación de una dosis letal de sevoflurano (Abbot Lab) e inmediatamente se les realizó una incisión en el tórax para exponer el corazón; a continuación, se insertó una cánula en el ventrículo izquierdo para producir el flujo continuo de 50 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) fría (4° C) a una velocidad de 15 mL/minuto con una presión hidrostática a una altura de 1.5 m. Para permitir el drenaje de la sangre y líquidos de la perfusión, se hizo una incisión en la aurícula derecha del corazón del animal (Rana *et al*, 2022).

5.3 Preparación de tejidos

Después de la perfusión, se recuperó el cerebro y se cortó a lo largo del plano medio-sagital. Uno de los hemisferios se fijó inmediatamente por inmersión en 10 mL de PBS con paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 24 h a 4° C. A continuación, el hemisferio fijado con PFA se deshidrató mediante incubaciones consecutivas, de 24 h cada una, en soluciones de PBS con una concentración creciente de sacarosa al 10 %, 20 % y 30 %. Tras la deshidratación, los tejidos se mantuvieron en TissuePlus (Fisher HealthCare) y en un criostato (Kedee, KD2850), se realizaron cortes coronales de 30 µm de espesor a -1.6 mm desde bregma, estos fueron recolectados en flotación y almacenados en solución crioprotectora (Buffer fosfato 0.1M/glicerol 30 %/ etilenglicol 30 %) a 4 °C hasta su uso para estudios de inmunofluorescencia.

5.4 Inmunofluorescencia

Antes de realizar los ensayos de inmunofluorescencia, se determinó la concentración óptima de los anticuerpos primarios y secundarios mediante titulación usando varias diluciones.

5.4.1 Incubación de anticuerpos primarios

Los tejidos permanecieron en flotación y se incubaron individualmente en agitación con 500 µL de solución salina tamponada con tris (TBS) 1X a temperatura ambiente, dos veces

durante 5 min cada una. A continuación, se realizó la exposición de epítomos para GFAP incubando los tejidos durante 30 min en estufa a 60° C con 500 µL de tampón de citrato (ácido cítrico 0.1M/ tween 20 al 0.05 %/pH 6.0). En el caso de doble inmunofluorescencia, antes de la incubación con tampón de citrato, los tejidos se incubaron por 3 min a temperatura ambiente con 0.1 mL de ácido fórmico al 80 % para la exposición de epítomos de Aβ.

Después de la exposición de epítomos, los tejidos se incubaron en agitación a temperatura ambiente con 500 µL de TBS 1X durante 5 min, 500 µL de TBS A (TBS1X/ tritón X-100 0.1 %) por 15 min para permeabilizar los tejidos y 500 µL de TBS B (TBS A/BSA 2 %) por 20 min para realizar el bloqueo y evitar la unión no específica de anticuerpos primarios. A continuación, se agregaron 100 µl de anticuerpo monoclonal anti-GFAP dilución 1:1000 (eBioscience) en una solución de TBS A/suero normal de cabra al 5 % y se incubaron toda la noche en agitación a 4° C. En los casos de doble inmunofluorescencia, adicionalmente se agregó suero policlonal de conejo anti-Aβ dilución 1:200.

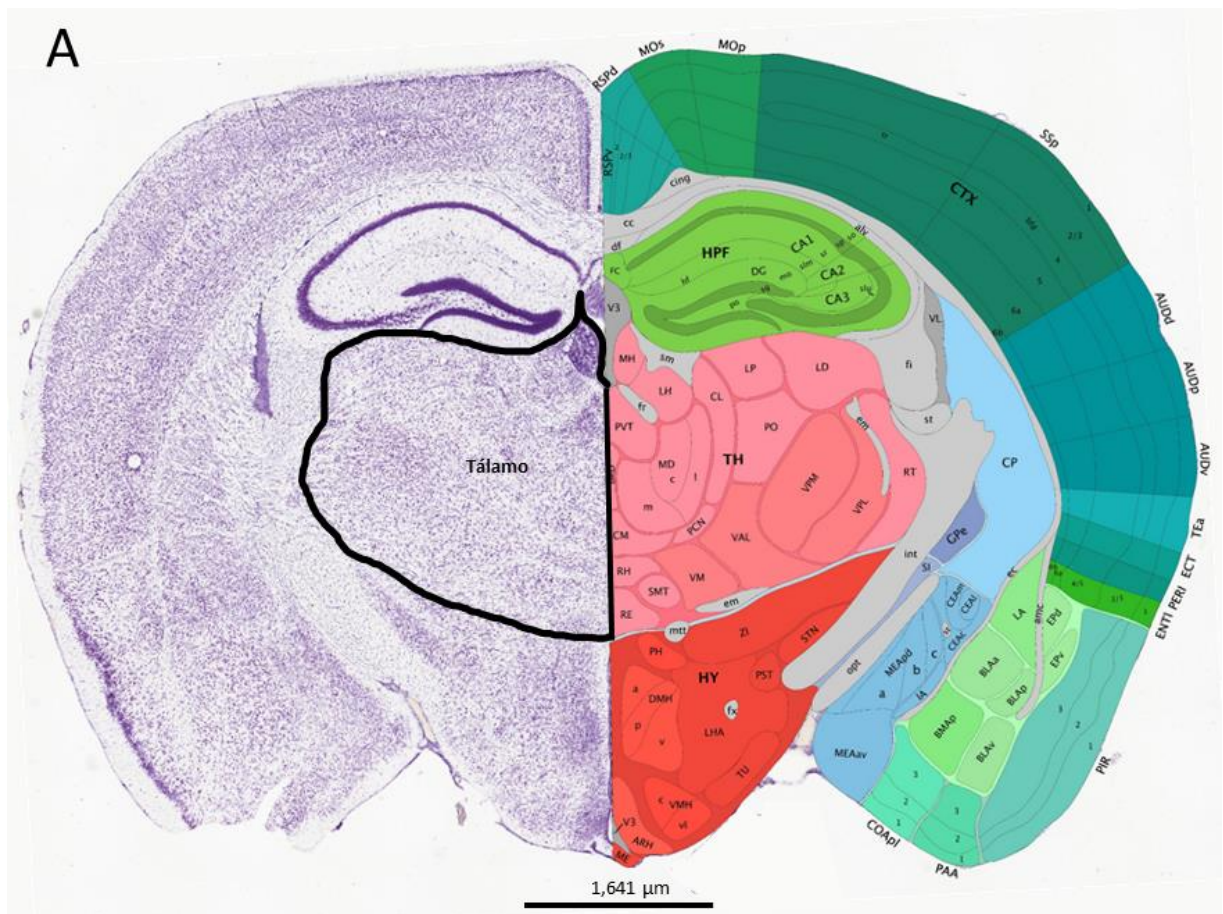
5.4.2 Incubación de anticuerpos secundarios

Después de la incubación con anticuerpos primarios, cada tejido se incubó durante 5 min en agitación a temperatura ambiente con 500 µL de TBS 1X, TBS A y TBS B de manera consecutiva. A continuación, se agregaron 100 µL del anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG1 de ratón Alexa Fluor 488 dilución 1:1000 (Invitrogen) en una solución de TBS A/suero normal de cabra al 5 % y se incubaron en oscuridad durante 1.5 h en agitación a temperatura ambiente. En los casos de doble inmunofluorescencia, adicionalmente se agregó el anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo Alexa Fluor 594 dilución 1:250 (Invitrogen). Posteriormente, cada tejido se incubó durante 5 min en agitación a temperatura ambiente con 500 µL de TBS 1X, TBS A y TBS B de manera consecutiva. Finalmente, los tejidos se inmovilizaron sobre un portaobjetos, se montaron con 15 µL de medio de VectaShield/DAPI (Vector Labs) y se colocó un cubreobjetos (Corning, Coverglass).

Con el fin de determinar la tinción no específica de los anticuerpos secundarios, para todos los experimentos de inmunofluorescencia se incluyeron tejidos que recibieron un tratamiento idéntico a los experimentales, pero sin la adición del anticuerpo primario.

5.5 Cuantificación de la inmunofluorescencia

Se tomaron micrografías de cada tejido en las regiones cerebrales del tálamo, giro dentado y CA1 con una cámara Olympus DP71 conectada a un microscopio de epifluorescencia Nikon i5 usando el *Software DP Controller 3.2.1.276* a un aumento con el que se podían capturar estas estructuras en su totalidad (4X). Estas estructuras fueron seleccionadas debido a que el hipocampo se considera la región más relevante para la consolidación de la memoria episódica, cuya pérdida es distintiva de la EA. Por su parte, recientemente ha surgido información que pone a la región talámica como una de las estructuras críticas en la regulación de este tipo de memoria, siendo principalmente relevante en las etapas tempranas de la EA (Aggleton, et al., 2016; Knopman *et al.*, 2021). Las regiones fueron delimitadas de acuerdo con los siguientes esquemas:



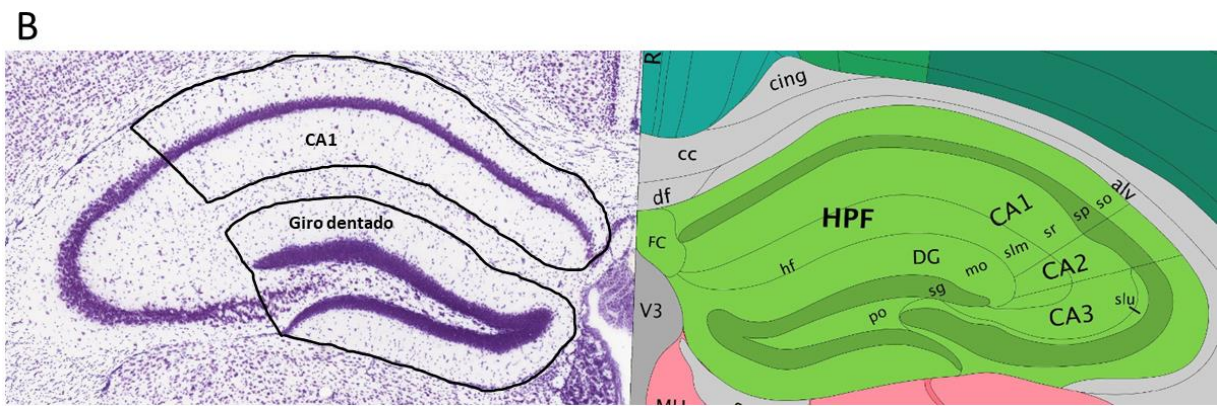


Figura 8. Delimitación de las regiones cerebrales del tálamo, giro dentado y CA1. A) Corte coronal del cerebro de ratón a -1.6 mm de bregma con la tinción de Nissl (izquierda) y anotaciones anatómicas (derecha). B) Amplificación de la región hipocámpal de la figura A. Las imágenes fueron tomadas de *Allen Mouse Brain Atlas*.

En el caso de los ensayos de inmunofluorescencia para evaluar la expresión de GFAP en ratones Tg-SwDI, se realizó la medición cuantitativa de la fluorescencia en las regiones de interés utilizando el método de Cuantificación de Intensidad de Fluorescencia utilizando ROIs (*Regions of Interest*) con el *software Image J* (v1.42q) como se describe a continuación: se delimitaron las siluetas de los astrocitos teñidos con el anticuerpo anti-GFAP (ROIs), con el fin de cuantificar únicamente el área de dichas regiones, así como la intensidad de fluorescencia dentro de cada una de ellas. A continuación, se obtuvo el área total de los ROIs como la suma de las áreas de todas las regiones, así como el promedio total de fluorescencia. Al multiplicar el promedio total de fluorescencia por el valor del área total de los ROIs, se obtuvo el valor de la Densidad Integrada de Fluorescencia, que representa el valor la superficie total de fluorescencia y su intensidad. Una vez obtenida la Densidad Integrada de Fluorescencia en cada región de interés (tálamo, giro dentado y CA1) de cada muestra cerebral, se obtuvo el promedio de este valor (promedio de la Densidad Integrada de Fluorescencia) para cada edad (3, 6, 9, 12 y 16 meses) y sexo.

En el caso de los ensayos para evaluar la expresión de GFAP en ratones Wt, dado que en todas las edades evaluadas la fluorescencia detectada era casi imperceptible por el aumento requerido para observar las estructuras en su totalidad (4X), las micrografías se tomaron a mayor aumento (10X) y las diferencias en la intensidad de fluorescencia en comparación a la cepa Tg-SwDI sólo se determinaron de manera cualitativa.

Para los ensayos de doble inmunofluorescencia, únicamente se observó la distribución espacial de los agregados amiloides y los astrocitos, utilizando el *Software DP Controller 3.2.1.276* para empalmar los canales (*merge*) que detectaron de manera individual los fluorocromos que fueron acoplados a GFAP o A β .

5.6 Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el *software GraphPad Prism* versión 8.0 para Windows (GraphPad, San Diego, CA, USA). Para determinar si la expresión de GFAP aumentaba de manera dependiente de la edad en ratones Tg-SwDI hembra y machos, se comprobó si existían diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de la Densidad Integrada de Fluorescencia en las distintas regiones cerebrales de ratones Tg-SwDI del mismo sexo, pero de diferente edad, utilizando la prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía con corrección de Welch, debido a la falta de homocedasticidad en los datos, y se realizó la prueba *post hoc* de comparaciones múltiples de Games-Howell. Para determinar si la expresión de GFAP difería entre ratones Tg-SwDI hembra y machos, se buscaron diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de la Densidad Integrada de Fluorescencia en las distintas regiones cerebrales de ratones Tg-SwDI de la misma edad, pero de diferente sexo, utilizando la prueba *t* de Student para muestras independientes, cuando ambos grupos presentaron homocedasticidad, o la prueba *t* de Student para muestras independientes con corrección de Welch, cuando ambos grupos mostraron varianzas distintas. En todas las pruebas estadísticas, a menos que se indique lo contrario, un valor de probabilidad $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

6. Resultados

6.1 Expresión de GFAP en distintas regiones cerebrales de ratones Tg-SwDI y *Wild type*

Se tomaron como imágenes representativas de cada grupo aquellas que mostraban la intensidad promedio de fluorescencia en cada grupo.

El primer paso en esta investigación fue determinar si los ratones Tg-SwDI expresaban más GFAP en las regiones cerebrales del tálamo (Tl), giro dentado (GD) y CA1, en comparación con ratones Wt de la misma edad y sexo.

Respecto al Tl, se encontró que en ratones Wt tanto hembras como machos, la señal de GFAP era casi imperceptible, al menos hasta la edad de 16 meses (Figura 9 A-a y B-a, respectivamente), mientras que, en esta misma región, la sobreexpresión de dicha molécula era muy evidente en ratones Tg-SwDI de la misma edad y sexo (Figura 9 A-b para hembras y B-b para machos). De igual manera, en el GD y CA1 de ratones Wt hembras (Figura 9 A-c y e, respectivamente) y machos (Figura 9 B-c y e, respectivamente), se encontró una ligera expresión de GFAP a los 16 meses de edad, pero que era muy inferior en comparación con lo observado en las mismas regiones cerebrales de ratones Tg-SwDI de la misma edad y sexo (Figura 9 A-d y f para hembras y B-d y f para machos). Cabe señalar que, en cada una de estas regiones cerebrales, la expresión de GFAP en ratones Wt también fue consistentemente inferior a la observada en ratones Tg-SwDI del mismo sexo a las edades de 6, 9 y 12 meses y no aumentaba notablemente con la edad (datos no mostrados), de tal manera que la señal era casi imperceptible con el aumento requerido (4X) para poder cuantificar la fluorescencia de las estructuras en su totalidad.

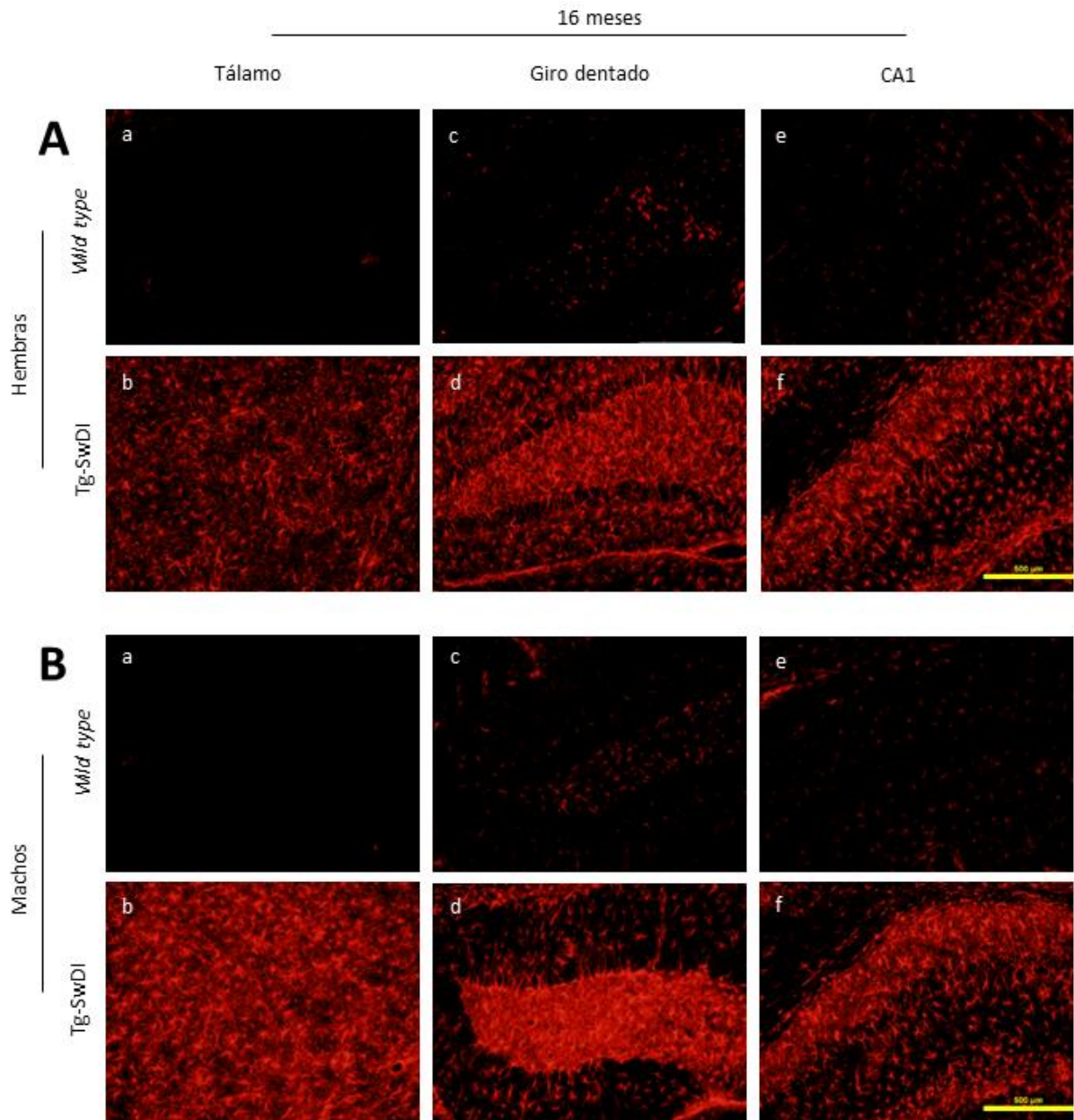


Figura 9. Expresión de GFAP en el cerebro de ratones Tg-SwDI vs *Wild type*. Imágenes representativas a los 16 meses de edad de ratones *Wild type* hembra (A: a, c y e) y machos (B: a, c y e), y Tg-SwDI hembras (A: b, d y f) y machos (B: b, d y f). Escala = 500 µm.

Después de comprobar que la sobreexpresión de GFAP era exclusiva de la cepa Tg-SwDI, el siguiente paso fue comparar la morfología de los astrocitos de la cepa Tg-SwDI con los de la Wt, con el fin de determinar si en los primeros ocurría un proceso de hipertrofia celular. Se pudo observar que, mientras que los astrocitos de los ratones Wt tenían prolongaciones finas y alargadas, que además mostraban una señal de fluorescencia débil (Figura 10 a), los de la cepa Tg-SwDI mostraban una forma radial más compacta y con procesos más gruesos y brillantes (Figura 10 b). En conjunto, la sobreexpresión de GFAP y la hipertrofia de los astrocitos mostraron que únicamente en la cepa Tg-SwDI ocurría un proceso de astrogliosis reactiva.

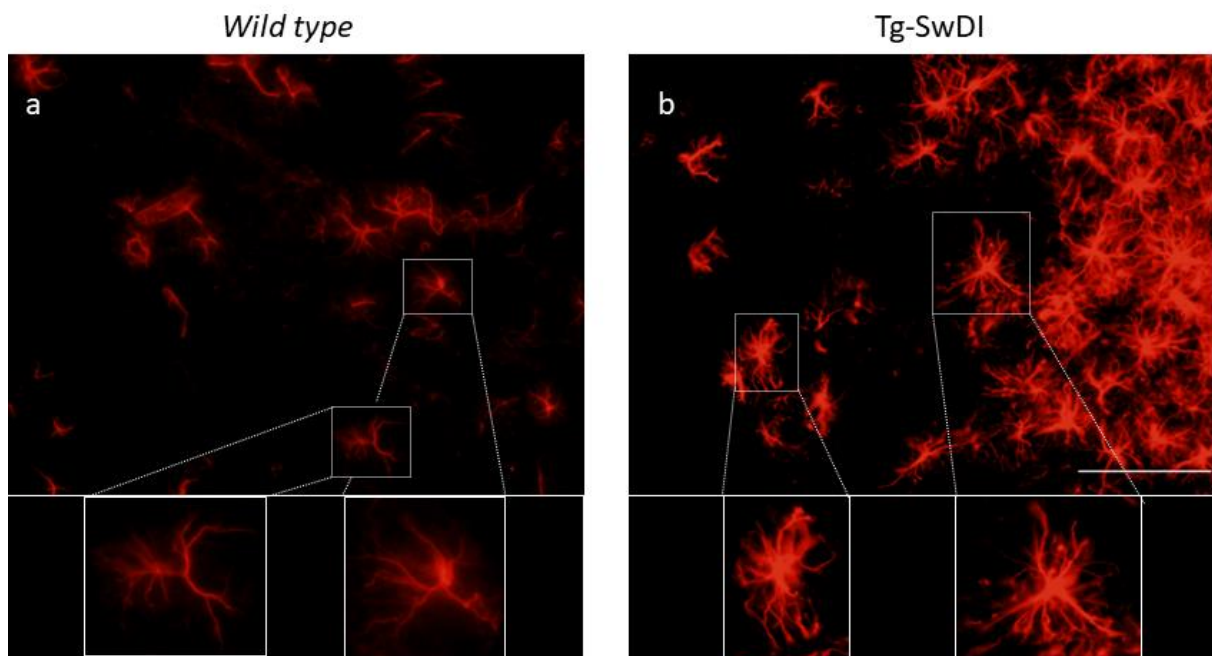


Figura 10. Morfología de astrocitos en giro dentado de ratones macho a) *Wild type* y b) Tg-SwDI a los 16 meses de edad. En la parte inferior de cada imagen se muestra la ampliación de astrocitos individuales de cada cepa, nótese que los de la cepa Tg-SwDI presentan prolongaciones más compactas, gruesas y brillantes, en comparación a los *Wild type*. Escala = 200 μ m.

6.2 Distribución espacial de GFAP y β -amiloide en el cerebro de ratones Tg-SwDI

Para corroborar que los fenómenos de la sobreexpresión de GFAP y la reactividad astrocítica, observados exclusivamente en la cepa Tg-SwDI, estaban relacionados con la acumulación del péptido A β doble mutante E22Q/D23N, se buscó observar si la distribución espacial de los agregados de A β coincidía con la de los astrocitos reactivos.

Al empalmar los canales que detectan de manera individual los fluorocromos que fueron acoplados a los anticuerpos secundarios anti-GFAP y anti-A β , se pudo observar a partir de los 6 meses de edad que en el TI, GD y CA1 de ratones Tg-SwDI hembra y machos, los astrocitos que sobreexpresaban GFAP, comúnmente se restringían a las proximidades de los agregados amiloides (Figuras 11 y 12) y que además, tendían a rodearlos, como si trataran de formar una barrera física entre ellos y el neuropilo (Figura 12-CA1). Aunque con menor frecuencia, se observaron algunas zonas, principalmente en el TI, en las que los agregados amiloides aparentemente carecían de astrocitos reactivos en su periferia, aunque cabe la posibilidad de que estos estuvieran presentes, pero a una profundidad distinta a la del corte analizado.

Adicionalmente, en algunos casos pudo observarse la colocalización (*merge*) de GFAP y A β , es decir, el solapamiento total o parcial de su distribución física, en procesos de los astrocitos que no estaban en contacto directo con los agregados amiloides, lo que podría interpretarse como si estas células hubieran fagocitado y movilizado en su interior al péptido (Figura 11-CA1 y 12-GD), o bien, que ambas moléculas se encontraban en el mismo plano, pero a diferente profundidad.

Cabe señalar que en todas las edades analizadas, la acumulación de A β , y por lo tanto su colocalización con GFAP, fue consistentemente mayor en el hipocampo, tanto en GD como CA1, en comparación al tálamo. Además, esta colocalización fue aumentando notablemente con la edad, de tal manera que a partir de los 9 meses de edad, la señal de ambas moléculas era tan fuerte que resultaba difícil distinguir entre agregados amiloides y astrocitos reactivos.

En conjunto, estos resultados mostraron que en la cepa Tg-SwDI los astrocitos que sobreexpresaban GFAP se encontraban próximos a los agregados amiloides, formando una barrera física alrededor de ellos y posiblemente fagocitándolos.

Tg-SwDI hembras 6 meses

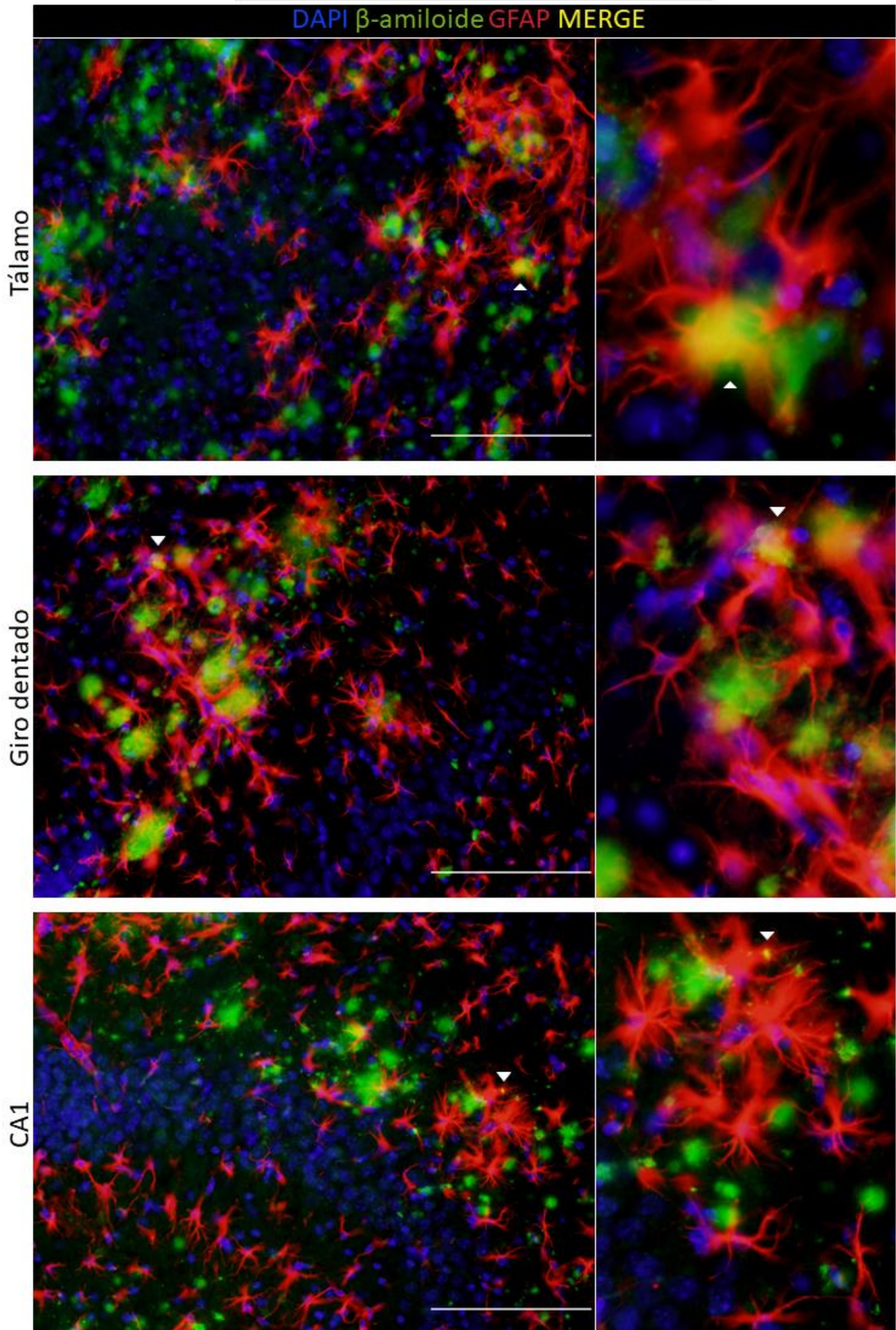


Figura 11. Distribución espacial de agregados β -amiloides y astrocitos en ratones Tg-SwDI hembra. Imágenes representativas a los 6 meses de edad. En la parte derecha de cada imagen se

observa una amplificación de las zonas marcadas con el triángulo blanco, en las que se muestra el solapamiento parcial (*merge*) de la distribución de GFAP y β -amiloide. En color azul: DAPI; verde: β -amiloide; rojo: GFAP y amarillo: *merge*. Escala = 500 μ m.

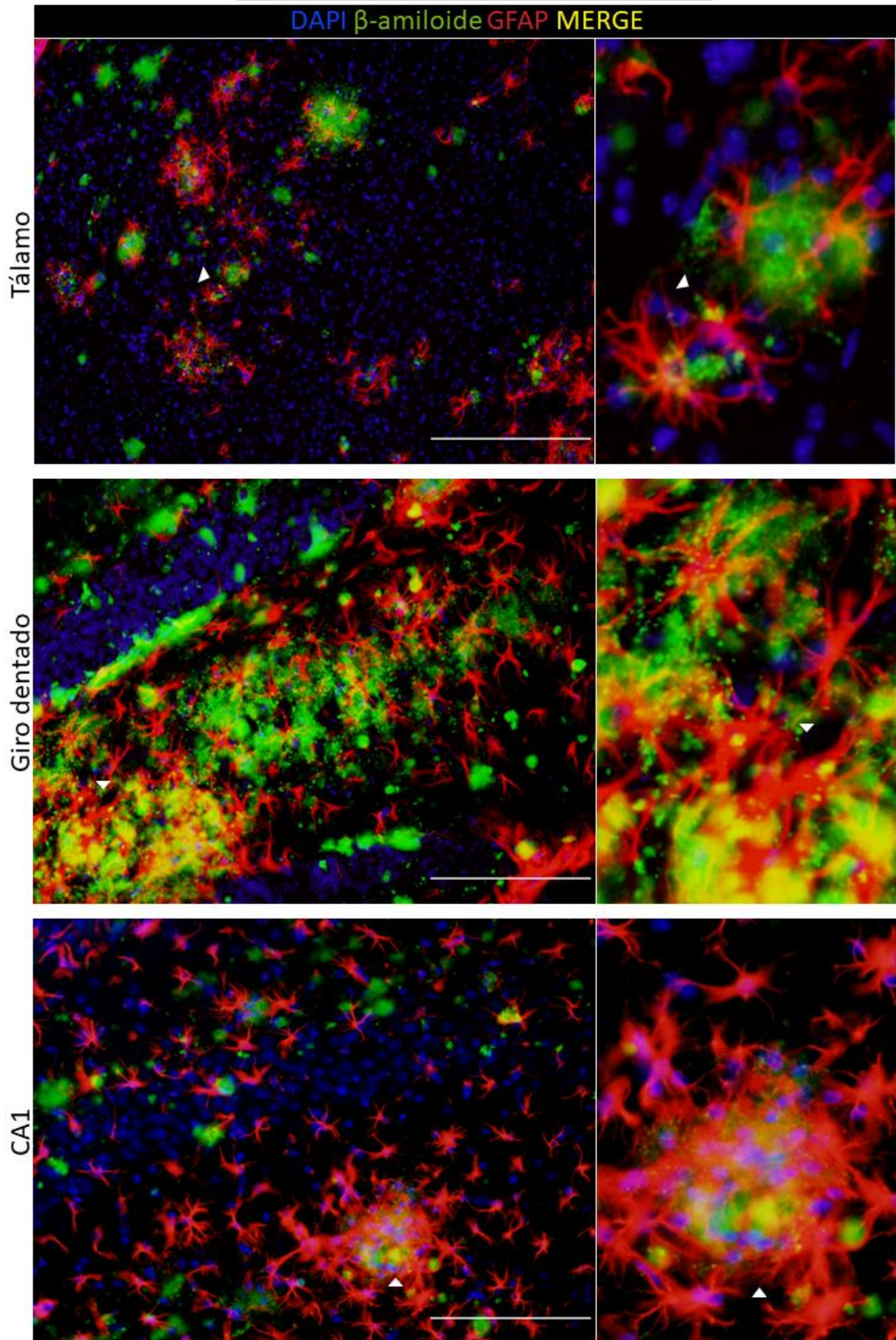


Figura 12. Distribución espacial de agregados β -amiloides y astrocitos en ratones Tg-SwDI macho. Imágenes representativas a los 6 meses de edad. En la parte derecha de cada imagen se

observa una amplificación de las zonas marcadas con el triángulo blanco, en las que se muestra el sobrelapamiento parcial (*merge*) de la distribución de GFAP y β -amiloide. En color azul: DAPI; verde: β -amiloide; rojo: GFAP y amarillo: *merge*. Escala = 500 μ m.

6.3 Expresión de GFAP dependiente de la edad en el cerebro de ratones Tg-SwDI

Finalmente, se buscó determinar si la expresión de GFAP en el TI, GD y CA1 aumentaba de manera dependientemente de la edad en ratones Tg-SwDI hembra y machos y a su vez, establecer si había diferencias en los niveles de expresión de GFAP entre ambos sexos.

6.3.1 Ratones Tg-SwDI hembra

Respecto a los ratones Tg-SwDI hembra, se encontró que en el TI (Figura 13 A-a y B-a) y GD (Figura 13 A-b y B-b), la expresión de GFAP era muy poco perceptible a los 3 meses de edad, por lo que era significativamente inferior en comparación a las demás edades, mientras que a esta misma edad, en CA1 (Figura 13 A-c y B-c) ya era notable, aunque seguía siendo significativamente inferior en comparación al resto de las edades.

En la región del TI, únicamente hubo un aumento significativo de la expresión de GFAP de los 3 a los 6 meses de edad y no volvieron a mostrarse variaciones significativas en el resto de las edades. En el GD, además de presentarse un aumento significativo de la expresión de GFAP de los 3 a los 6 meses de edad, también lo hubo entre los 6 y los 16 meses. Por su parte, en CA1 se encontró un aumento significativo de la expresión de GFAP de los 3 a los 6 meses de edad, de los 6 a los 9 y entre los 6 y los 16 meses.

Con lo anterior, se concluyó que tanto en el TI como en el GD de ratones Tg-SwDI hembra, la sobreexpresión de GFAP comenzaba a una edad comprendida entre los 4-5 meses, mientras que en CA1 iniciaba antes de los 3 meses. De igual manera, se concluyó que: en el TI la expresión de GFAP aumentaba de manera dependiente de la edad únicamente de los 3 a los 6 meses; en el GD aumentaba de manera dependiente de la edad de los 3 a los 6 meses y no volvía a incrementar sino hasta los 16; y que en CA1, aumentaba de manera dependiente de la edad de los 3 a los 6 y de los 6 a los 9 meses de edad.

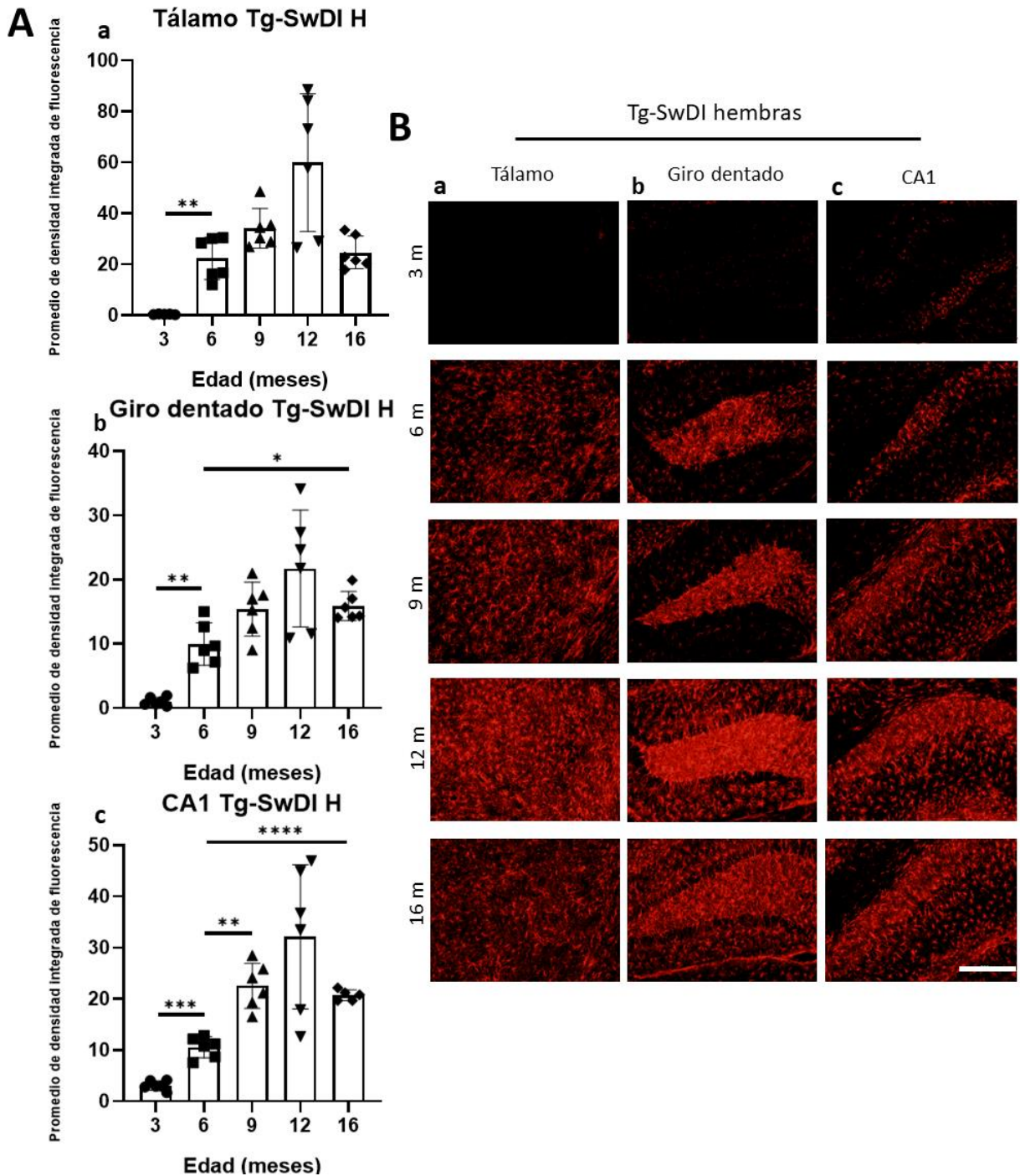


Figura 13. Expresión de GFAP dependiente de la edad en ratones Tg-SwDI hembra. A) se muestran los promedios de la densidad integrada de fluorescencia, es decir, el valor la superficie total de fluorescencia y su intensidad, a los 3, 6, 9, 12 y 16 meses de edad ($n = 6$ por edad). Los datos presentados son las medias de la densidad integrada de fluorescencia \pm error estándar de la media. Los datos se analizaron mediante una ANOVA de una vía con corrección de Welch: tálamo ($F = 55.92$; $g. l = 4$; $p < 0.05$); giro dentado ($F = 73.82$; $g. l = 4$; $p < 0.05$) y CA1 ($F = 194.4$; $g. l = 4$; $p < 0.05$) y la prueba *post hoc* de comparaciones múltiples de Games-Howell ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ y $****p < 0.0001$). B) Imágenes representativas de la expresión de GFAP a los 3, 6, 9, 12 y 16 meses de edad. Escala = 500 μ m.

6.3.2 Ratones Tg-SwDI macho

Al igual que en las hembras, en el Tl (Figura 14 A-a y B-a) y GD (Figura 14 A-b y B-b) de ratones Tg-SwDI macho, la expresión de GFAP estuvo prácticamente ausente a la edad de 3 meses, mientras que en CA1 (Figura 14 A-c y B-c) ya era considerable, aunque en todas estas regiones era significativamente inferior en comparación al resto de las edades.

En las regiones cerebrales del Tl y CA1, el comportamiento de la expresión de GFAP fue muy similar, en ambas, la expresión de GFAP incrementó significativamente de los 3 a los 6 meses de edad, pero mientras que en el Tl volvió a incrementar de los 6 a los 9 meses, en CA1 no hubo un aumento significativo entre estas edades, posteriormente, en ambas regiones la expresión de GFAP disminuyó de los 9 a los 12 meses de edad, alcanzando valores tan bajos como los encontrados a los 6 meses y volvió a aumentar de los 12 a los 16 meses, tomando valores similares a los observados en ratones de 9 meses de edad. En cuanto al GD, se encontraron ligeras variaciones en la expresión de GFAP, comparado con el Tl y CA1: se observó un aumento significativo de los 3 a los 6 meses de edad, de los 12 a los 16 meses y entre los 6 y 16 meses de edad.

Con lo anterior, se concluyó que tanto en el Tl como en el GD de ratones Tg-SwDI macho, la sobreexpresión de GFAP comenzaba a una edad comprendida entre los 4-5 meses, mientras que en CA1 iniciaba antes de los 3 meses. De igual manera, se concluyó que en el Tl y CA1, la expresión de GFAP aumentaba de manera dependiente de la edad de los 3 a los 6 meses y, únicamente en el caso del Tl, de los 6 a los 9 meses de edad, a continuación, en ambas regiones disminuía de los 9 a los 12 meses y volvía a incrementar de los 12 a los 16 meses de edad; mientras que en el GD, aumentaba de manera dependiente de la edad de los 3 a los 6 meses y de los 12 a los 16 meses de edad.

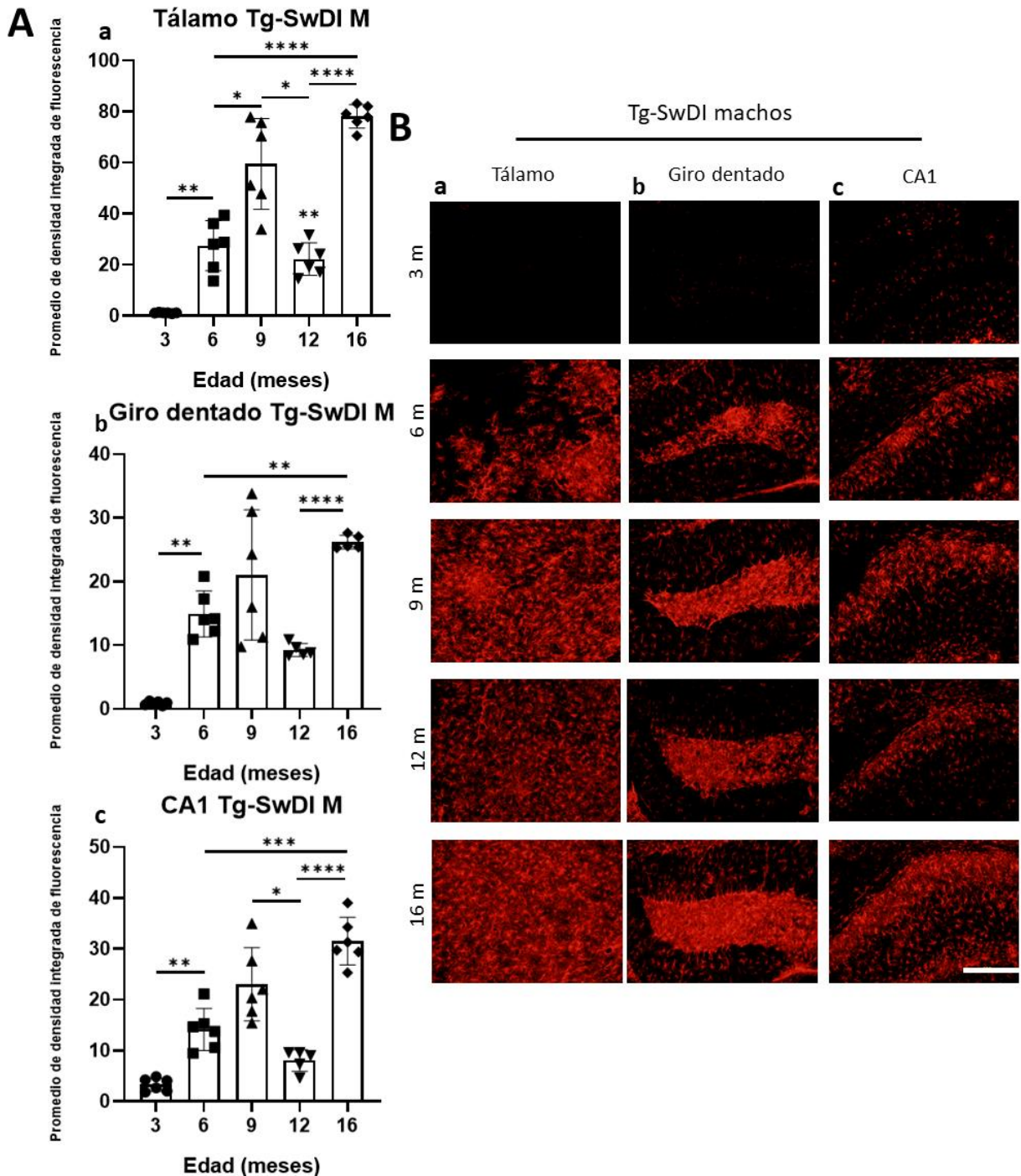


Figura 14. Expresión de GFAP dependiente de la edad en ratones Tg-SwDI macho. A) se muestran los promedios de la densidad integrada de fluorescencia, es decir, el valor la superficie total de fluorescencia y su intensidad, a los 3, 6, 9, 12 y 16 meses de edad ($n = 6$ por edad). Los datos presentados son las medias de la densidad integrada de fluorescencia \pm error estándar de la media. Los datos se analizaron mediante una ANOVA de una vía con corrección de Welch: tálamo ($F = 391.6$; $g. l = 4$; $p < 0.05$); giro dentado ($F = 603.7$; $g. l = 4$; $p < 0.05$) y CA1 ($F = 55.56$; $g. l = 4$; $p < 0.05$) y la prueba *post hoc* de comparaciones múltiples de Games-Howell (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ y **** $p < 0.0001$). B) Imágenes representativas de la expresión de GFAP a los 3, 6, 9, 12 y 16 meses de edad. Escala = 500 μm .

6.3.3 Comparación de los niveles de expresión de GFAP entre ratones Tg-SwDI hembras y machos

En el Tl de ratones Tg-SwDI (Figura 15-A) la expresión de GFAP no fue significativamente diferente entre hembras y machos a los 3 y 6 meses de edad ($t = 1.455$; $p > 0.05$ y $t = 0.995$; $p > 0.05$, respectivamente), mientras que a los 9 y 16 meses fue mayor en machos ($t = 3.204$; $p < 0.05$ y $t = 16.650$; $p < 0.05$, respectivamente) y a los 12 meses lo fue en hembras ($t = 3.326$; $p < 0.05$). Por su parte, en el GD (Figura 15-B) la expresión de GFAP no fue significativamente diferente entre hembras y machos a los 3 y 9 meses de edad ($t = 0.456$; $p > 0.05$ y $t = 1.253$; $p > 0.05$, respectivamente), pero fue significativamente mayor en machos a los 6 y 16 meses ($t = 2.465$; $p < 0.05$ y $t = 7.468$; $p < 0.05$, respectivamente) y fue mayor en hembras a los 12 meses ($t = 3.331$; $p < 0.05$). Respecto a CA1 (Figura 15-C), no se encontraron diferencias significativas en la expresión de GFAP entre ratones hembra y machos a los 3, 6 y 9 meses de edad ($t = 0.322$; $p > 0.05$, $t = 1.923$; $p > 0.05$ y $t = 0.137$; $p > 0.05$ respectivamente), pero fue mayor en hembras a los 12 meses ($t = 4.132$; $p < 0.05$). y en machos a los 16 ($t = 4.347$; $p < 0.05$).

Con los datos anteriores, se concluyó que no había diferencias en los niveles de expresión de GFAP entre ratones Tg-SwDI hembra y machos en el Tl, GD y CA1 a los 3 meses de edad, en el Tl y CA1 a los 6 meses y en el GD y CA1 a los 9 meses, pero fue mayor en machos en el GD a los 6 meses, en el Tl a los 9 meses y a los 16 meses en el Tl, GD y CA1, mientras que fue mayor en hembras a los 12 meses en las tres regiones evaluadas.

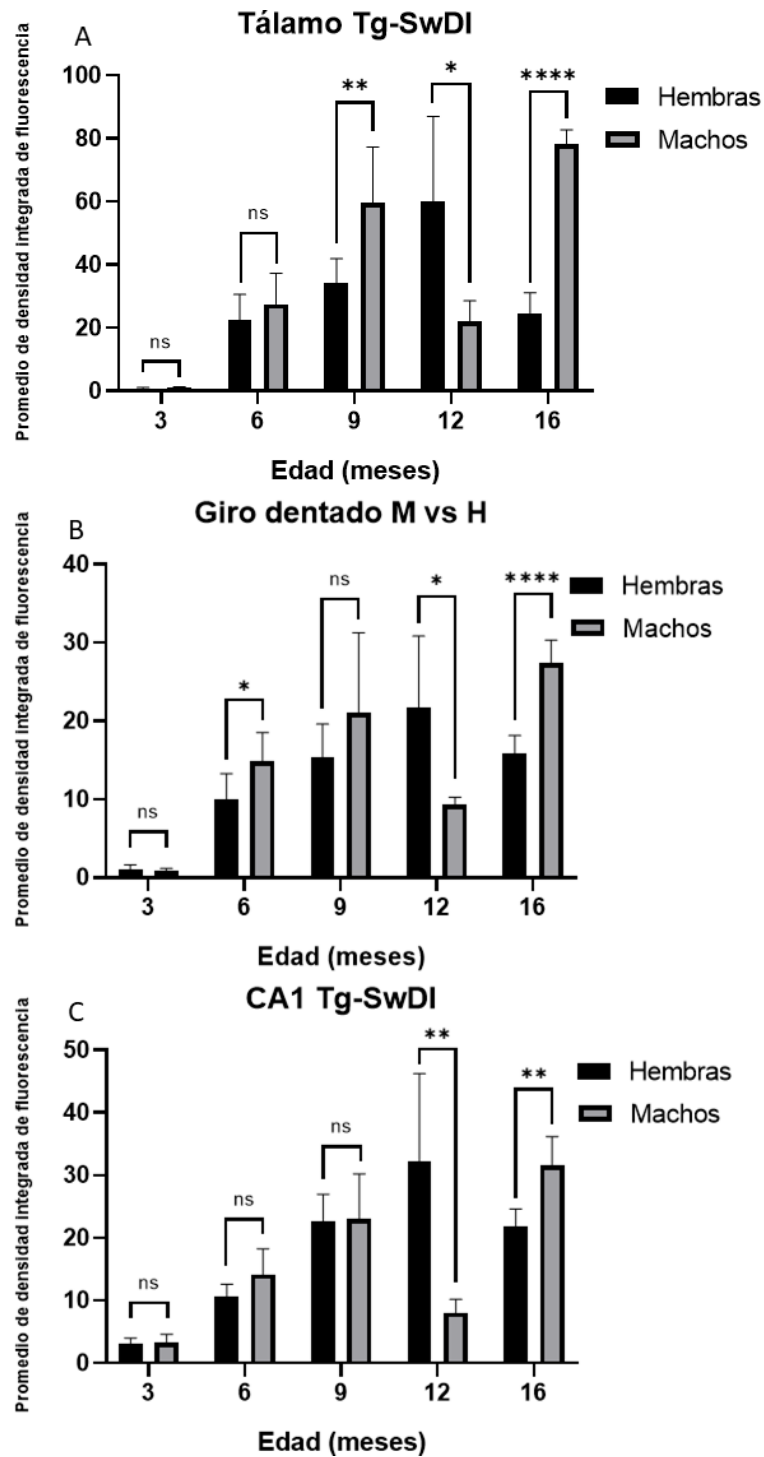


Figura 15. Comparación de los niveles de expresión de GFAP entre ratones Tg-SwDI hembra y machos. Se muestran los promedios de la densidad integrada de fluorescencia entre ratones Tg-SwDI hembra (barras negras) y machos (barras grises) a los 3, 6, 9, 12 y 16 meses de edad (n = 6 por edad).

ns: no significativo; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ y **** $p < 0.0001$.

7. Discusión

7.1 Reactividad astrocítica en el cerebro de ratones Tg-SwDI

Los ratones Tg-SwDI desarrollan una acumulación fibrilar robusta y dependiente de la edad del péptido A β doble mutante *Dutch/Iowa* predominantemente en la pared de los vasos cerebrales, así como en el parénquima cerebral, en forma de placas difusas (Davis *et al.*, 2004). Debido a que en la EA, la acumulación de A β es considerada el principal factor responsable de inducir y estimular crónicamente la astrogliosis, que en parte se hace evidente por un aumento de la expresión de GFAP y la hipertrofia celular (Meraz-Ríos *et al.*, 2013; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018), uno de los objetivos de este trabajo fue corroborar que la expresión cerebral de GFAP en ratones Tg-SwDI era mayor en comparación a los ratones Wt, así como verificar si en los primeros se alteraba la morfología de los astrocitos que sobreexpresan GFAP.

Se encontró que en cualquiera de las edades evaluadas (6, 9, 12 y 16 meses), la expresión de GFAP en las regiones cerebrales del TI, GD y CA1 de ratones Tg-SwDI hembra y machos superaba la de los ratones Wt de la misma edad y sexo; adicionalmente, al comparar la morfología de los astrocitos de ambas cepas, la hipertrofia celular sólo se hizo evidente en la cepa Tg-SwDI. De igual manera, se pudo observar que en los ratones de la cepa Wt, además de ser mínima la expresión de GFAP, no parecía incrementar notablemente a medida que los ratones envejecían.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Miao y col. (2005b), quienes determinaron que en ratones Tg-SwDI de 6, 12 y 24 meses de edad, había una cantidad progresiva de astrocitos que sobreexpresaban GFAP en la corteza fronto-temporal, TI y subículo, mientras que en ratones Wt de la misma edad, observaron que había una mínima expresión de GFAP en todas estas regiones cerebrales y que no aumentaba de manera dependiente de la edad. De igual manera, un estudio posterior en este modelo murino demostró que, en comparación con ratones Wt de la misma edad, la expresión de GFAP estaba significativamente elevada en ratones Tg-SwDI a los 12 meses de edad, mientras que a los 3 meses, la expresión de GFAP sólo se observó en el subículo, que era la única región cerebral que tenía agregados amiloides (Xu *et al.*, 2007).

Por otra parte, el hecho de que los ratones no desarrollan de manera natural las neuropatologías asociadas con la EA (Esquerda-Canals *et al.*, 2017), explica que en ratones Wt no se observara una sobreexpresión de GFAP dependiente de la edad ni la hipertrofia de sus astrocitos, aunque se ha reportado que en ratones, ratas y humanos se produce un ligero incremento en la expresión de GFAP durante el envejecimiento, incluso en ausencia de patologías cerebrales (Nichols *et al.*, 1993; Kohama *et al.*, 1995), lo que explica que en ratones Wt la expresión de GFAP fuera baja, pero no nula.

Los resultados obtenidos en este y otros trabajos, indican que en el modelo murino Tg-SwDI ocurre un proceso de astrogliosis reactiva y que este fenómeno está impulsado por la acumulación cerebral del péptido A β doble mutante *Dutch/Iowa*.

7.2 Interacción entre astrocitos reactivos y agregados amiloides en ratones Tg-SwDI

Se ha reportado ampliamente, tanto en los estudios *post mortem* de personas con EA como en modelos murinos de esta enfermedad, que los astrocitos reactivos interactúan de diversas maneras con los agregados amiloides (Itagaki *et al.*, 1989; Funato *et al.*, 1998; Acosta *et al.*, 2017). Por esta razón, el siguiente objetivo de este trabajo fue observar si en los ratones Tg-SwDI los astrocitos interactuaban con los agregados de A β .

El uso de la doble inmunofluorescencia para evaluar la expresión de GFAP y la presencia de A β , permitió observar la distribución espacial de los astrocitos reactivos y los agregados amiloides, de esta manera se pudo observar que los astrocitos comúnmente se restringían a las proximidades de los agregados de A β y parecían rodearlos y aislarlos del tejido circundante. Adicionalmente, en algunos casos pudo observarse la colocalización (*merge*) de ambas moléculas, lo que podría interpretarse de dos maneras: que los astrocitos reactivos fagocitaron A β o que los agregados amiloides y los astrocitos reactivos se encontraban distribuidos en el mismo plano, pero a una profundidad distinta.

Respecto a estos resultados, en el modelo Tg-SwDI se ha reportado que existe una estrecha relación espacial entre los astrocitos reactivos y agregados amiloides, particularmente, se ha determinado que en este modelo murino los astrocitos reactivos no se presentan en ausencia de la acumulación de A β (Xu *et al.*, 2007) y que la reactividad astrocítica es más severa en las regiones con mayor cantidad de agregados amiloides (Miao *et al.*, 2005b). Por otra parte, se

ha visto que cuando se emplean distintas estrategias para reducir la cantidad de agregados de A β en ratones Tg-SwDI, también disminuye la expresión de GFAP (Miao *et al.*, 2005a; Zhou *et al.*, 2023a; Zhou *et al.*, 2023b).

Al igual que en nuestros resultados, otros estudios han observado que los astrocitos reactivos pueden formar una estructura esférica que rodea las placas amiloides y se ha propuesto que esta distribución funciona como una barrera física que aísla las zonas de lesión del tejido circundante (Itagaki *et al.*, 1989; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). Por otra parte, en diversos trabajos se ha propuesto que la función de los astrocitos reactivos no se restringe a la formación de una barrera física, sino que estas células participan directamente en la eliminación de A β , por ejemplo, se ha reportado en tejidos *post mortem* de personas con EA que los astrocitos que rodean las placas amiloides presentan internalización de A β no fibrilar en gránulos similares a lisosomas (Funato *et al.*, 1998; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). De igual manera, estudios *in vitro* han mostrado que los astrocitos de ratón son capaces de internalizar y degradar A β (Pihlaja *et al.*, 2008). La evidencia a favor de la fagocitosis de agregados amiloides mediada por astrocitos reactivos también se ha visto respaldada por estudios que demuestran que estas células pueden expresar enzimas degradadoras de A β (Nakagomi *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2014; Ries y Sastre, 2016;). Aunque es importante señalar que también se ha reportado que el tamaño y la carga de A β en los agregados amiloides no disminuye significativamente a lo largo de la progresión de la EA, por lo que se ha propuesto que los mecanismos de eliminación de los agregados amiloides podrían limitar su crecimiento, pero no su eliminación (Serrano-Pozo *et al.*, 2012; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018).

Con lo anterior, se concluye que en el modelo Tg-SwDI existe una estrecha interacción entre astrocitos reactivos y agregados amiloides, de tal manera que estas células son capaces de establecer una barrera física entre los cúmulos de A β y el tejido circundante, además de que es posible que de manera activa limiten su crecimiento a través de la fagocitosis, aunque es necesario profundizar más en este fenómeno.

7.3 Temporalidad de la expresión de GFAP en ratones Tg-SwDI

La caracterización inicial del modelo murino Tg-SwDI mostró que estos ratones desarrollan una acumulación cerebral de A β robusta y de inicio temprano que aumentaba de manera

dependiente de la edad (Davis *et al.*, 2004), por esta razón, el objetivo principal de este trabajo fue determinar si en este modelo murino la expresión cerebral de GFAP también aumentaba de manera dependiente de la edad, así como establecer las diferencias entre ratones hembra y machos.

7.3.1 Inicio de la sobreexpresión de GFAP en el cerebro de ratones Tg-SwDI

Se encontró que, tanto en hembras como en machos, la sobreexpresión de GFAP ya estaba presente a los 3 meses de edad en CA1, mientras que en el GD y TI se observó por primera vez en ratones de 6 meses de edad, por lo que se concluyó que en estas últimas dos regiones debió iniciar en una edad comprendida entre los 4-5 meses. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Xu y col. (2007), quienes encontraron que en ratones Tg-SwDI a los 3 meses de edad, los astrocitos reactivos sólo se encontraban en el subículo, una región en estrecha relación al hipocampo. De igual manera, aunque la caracterización inicial de este modelo no evaluó la reactividad astrocítica, sí mostró que en el hipocampo, subículo y corteza cerebral se desarrollaban numerosas estructuras similares a placas, en gran parte difusas, a partir de los 3 meses de edad, mientras que en el TI comenzó los 6 meses, esta vez principalmente en forma de agregados fibrilares de A β en la microvasculatura cerebral (Davis *et al.*, 2004), por lo que es de esperar que la astrogliosis siguiera esta misma temporalidad, tal como lo muestran nuestros resultados..

El hecho de que en este modelo murino la sobreexpresión de GFAP inicie en estructuras que conforman la formación hipocampal, coincide con los estudios patológicos de la EA en los que se ha mostrado una afectación temprana y prominente de las estructuras del lóbulo temporal medial, especialmente la corteza entorrinal y el hipocampo (Braak y Braak, 1991). Cabe señalar que el hipocampo, junto con sus conexiones parahipocampales, son las principales regiones cerebrales que sustentan la memoria episódica, cuya afectación es característica de la EA (Spiers *et al.*, 2001; Squire *et al.*, 2004; Knopman *et al.*, 2021).

Con lo anterior, se concluye que en el modelo Tg-SwDI la reactividad astrocítica comienza en CA1 antes de los 3 meses de edad, posiblemente en respuesta a las placas amiloides difusas en el parénquima cerebral, y es posible que por su estrecha relación con CA1, se continúe muy poco después en el GD, mientras que en el TI podría haber iniciado más tarde, cerca de los 6 meses de edad, en respuesta a la acumulación fibrilar de A β en la microvasculatura cerebral.

7.3.2 Expresión de GFAP dependiente de la edad en ratones Tg-SwDI hembra y machos

Se encontró que en las hembras la expresión de GFAP aumentó de manera dependiente de la edad de los 3 a los 6 meses en el TI, GD y CA1, además, en el GD volvió a incrementar entre los 6 y 16 meses, mientras que en CA1 volvió a aumentar de los 6 a los 9 meses de edad. Por su parte, en los ratones macho también aumentó de los 3 a los 6 meses en todas las regiones evaluadas, además, en el TI volvió a incrementar de los 6 a los 9, posteriormente, tanto en el TI como en CA1, disminuyó de los 9 a los 12 y volvió a incrementar de los 12 a los 16 meses, mientras que en el GD sólo volvió a aumentar de los 12 a los 16 meses de edad.

El aumento de la expresión de GFAP dependiente de la edad se ha reportado anteriormente en el modelo murino Tg-SwDI, aunque estos estudios no han especificado si el análisis se realizó en ratones hembra o machos. El primero de ellos (Miao *et al.*, 2005b) se enfocó en la reactividad astrocítica asociada a la acumulación amiloide microvascular cerebral, y se reportó que en la corteza fronto-temporal, TI y subículo, el número de astrocitos aumentó con la edad de los 6 a los 12 y de los 12 a los 24 meses, aunque no se hace mención sobre si estas variaciones fueron estadísticamente significativas o si se trató de un análisis cualitativo, además de que se utilizaron ratones Tg-SwDI heterocigóticos, los cuales desarrollan una acumulación de A β menos extensa en comparación a los ratones homocigóticos, utilizados en este trabajo de tesis (Xu *et al.*, 2007). Por otra parte, aunque en el segundo estudio (Xu *et al.*, 2007) sí se utilizaron ratones homocigóticos, en realidad no se compararon directamente las edades analizadas (3 y 12 meses de edad), sino que se únicamente se señala que, a los 12 meses de edad, el número de astrocitos reactivos era mayor en ratones Tg-SwDI que en ratones Wt y que, a los 3 meses, los astrocitos se restringieron al subículo, siendo esta la única región con agregados amiloides.

En cuanto a la disminución en la expresión de GFAP observada en el TI y CA1 de ratones macho a los 12 meses de edad, no tenemos conocimiento de que existan precedentes sobre este fenómeno en este o en algún otro modelo murino de la EA o la AAC. Cabe señalar que, para corroborar estas observaciones, la cuantificación de la inmunofluorescencia para evaluar la expresión de GFAP en las muestras utilizadas en este trabajo de tesis se repitió por parte del M. en C. Gilberto Adrián Rodríguez López y en muestras independientes obtenidas por la Q. F. B Alicia Mercedes Torres Paniagua, obteniéndose resultados consistentes en ambos casos (datos no mostrados).

Aunque por el momento no es posible establecer las posibles causas que derivaron en esta disminución espontánea de la respuesta astrocítica, se sabe que en ratones la transición de los 9 a los 12 meses de edad se corresponde con la senescencia reproductiva (Diaz, 2012), por lo que cabe la posibilidad de que la explicación de este fenómeno recaiga, al menos en parte, en los cambios endócrinos relacionados a la reproducción. Esta hipótesis se basa en los estudios epidemiológicos que muestran la existencia de un mayor riesgo de desarrollar la EA con la pérdida de hormonas sexuales debido a la edad (Li y Singh, 2014). Específicamente, tanto en hombres con EA, así como en modelos murinos de esta enfermedad, se han reportado niveles reducidos de testosterona en la circulación y en el cerebro, lo cual se ha relacionado inversamente con los niveles cerebrales de A β soluble (Rosario *et al.*, 2009; McAllister *et al.*, 2010; Rosario *et al.*, 2011; Barron y Pike, 2012; Li y Singh, 2014). Por lo tanto, es posible que los cambios hormonales asociados con la senescencia reproductiva se relacionen con una disminución de la respuesta astrocítica, que a su vez, podría estar implicada en el aumento de los niveles cerebrales de A β soluble.

Con lo anterior, se concluye que en el modelo murino Tg-SwDI existen cambios en la expresión de GFAP dependientes de la edad, que en el caso de las hembras es siempre progresivo pero que en los machos puede incrementar y disminuir, y en este último caso podría estar asociado a cambios hormonales relacionados con la senescencia reproductiva, aunque es necesario estudiar con mayor profundidad este fenómeno, ya que podría arrojar información relevante acerca de los mecanismos inmunomoduladores que son relevantes en la patología de la EA y la AAC.

7.3.3 Niveles de expresión de GFAP en ratones Tg-SwDI hembra vs machos

Se sabe que la EA afecta de manera desproporcionada a hombres y mujeres, de hecho, los estudios epidemiológicos muestran que las mujeres constituyen dos tercios de las personas que viven con EA (Farrer *et al.*, 1997; Scheyer *et al.*, 2018) y que, independientemente de las diferencias en la esperanza de vida entre hombres y mujeres, en el sexo femenino hay un mayor riesgo de desarrollar la EA (Li y Singh, 2014). También se han visto diferencias en la forma en que la EA afecta cognitivamente a ambos sexos, por ejemplo, se ha reportado que las mujeres con EA presentan un mayor deterioro de las habilidades verbales en comparación a los hombres (Henderson y Buckwalter, 1994). Debido a estas notables diferencias dependientes del sexo en la EA, buscamos determinar si en el modelo murino Tg-SwDI los

niveles de expresión de GFAP variaban entre ratones hembra y machos a las edades de 3, 6, 9, 12 y 16 meses.

Al comparar los niveles de expresión de GFAP en el TI, CA1 y GD entre ratones Tg-SwDI hembra y machos, se encontró que, en cualquiera de estas regiones, no había diferencias a los 3 meses de edad, tampoco a los 6 meses en el TI y CA1, ni a los 9 meses en el GD y CA1. Sin embargo, los niveles de expresión de GFAP fueron mayores en los machos a los 6 meses de edad en el GD, a los 9 meses en el TI y a los 16 meses en todas estas regiones, mientras que en las hembras sólo fue superior a los 12 meses de edad y lo fue en las tres regiones evaluadas.

Aunque son muy escasos los estudios que analizan las diferencias dependientes del sexo en el modelo murino Tg-SwDI, un primer estudio al respecto demostró que los ratones hembra de 12-14 meses de edad mostraban una mayor cantidad de microhemorragias cerebrales y un menor desempeño en las pruebas de memoria espacial y contextual, mientras que los machos de esta misma edad superaban a las hembras en los niveles circulantes de las citocinas IL-1 α , IL-2, IL-9 e IFN- γ , aunque no se evaluaron las diferencias en los niveles de expresión de GFAP entre ambos sexos (Maniskas *et al.*, 2021). En este sentido, el deterioro cognitivo agravado en las hembras podría ser consistente con el mayor grado de astrogliosis reportado en este trabajo de tesis, ya que se sabe que el nivel de astrogliosis aumenta linealmente con el deterioro cognitivo (Kashon *et al.*, 2004; Carter *et al.*, 2019). Por otra parte, aunque la menor producción de citocinas por parte de las hembras podría ser contradictorio a la mayor reactividad astrocítica encontrada en nuestro trabajo, en realidad, se ha demostrado que la microglía es el principal tipo celular que responde ante las microhemorragias cerebrales (Ahn, *et al.*, 2018), por lo que es posible que esta sobreproducción de citocinas esté más relacionada con el nivel de microglíosis que con el de la astrogliosis reactiva. Por otro lado, un estudio reciente utilizó la colocalización de GFAP y Fluoruro de Jade C (un colorante fluorescente aniónico que se utiliza como marcador de la degeneración celular), para evaluar el porcentaje de astrocitos distróficos en el hipocampo (subregiones CA1, CA3 y GD) de ratones Tg-SwDI hembra y machos a la edad de 12-13 meses, y de esta manera se pudo determinar que, en concordancia con nuestros resultados, a esta edad las hembras presentan una mayor cantidad de GFAP en comparación a los machos. Adicionalmente, se encontró que el promedio de astrocitos en degeneración era del 41 % en hembras y del 38 % en machos, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Setti *et al.*, 2022).

Con los datos anteriores, se concluyó que en el modelo murino Tg-SwDI los niveles de expresión de GFAP se mantienen relativamente similares entre hembras y machos en los primeros 9 meses de vida, aunque con excepciones regionales en las que es superior en machos, mientras que, a los 12 meses de edad, la expresión de GFAP es superior en hembras y a los 16 meses lo es en machos. Se hace evidente la necesidad de incluir más estudios que consideren las diferencias dependientes del sexo en este modelo murino, desde los primeros meses en los que se presenta la reactividad astrocítica hasta las edades más avanzadas, con el fin de esclarecer la dinámica temporal de este fenómeno.

7.4 Consideraciones sobre la importancia de la astrogliosis reactiva en la patología de la enfermedad de Alzheimer

En este trabajo de tesis se utilizó la sobreexpresión de GFAP y la hipertrofia de los astrocitos como criterios para determinar la existencia de astrogliosis reactiva en el modelo murino Tg-SwDI. Sin embargo, es importante señalar que en la actualidad no se conoce cuál es el significado biológico de estos fenómenos. Por un lado, se ha señalado que, pese a que el aumento en los niveles de la expresión de GFAP podría atribuirse a un proceso de proliferación astrocítica o de los progenitores gliales, es mayor y más consistente la evidencia que señala que sólo la microglía exhibe una proliferación significativa en la EA y modelos murinos de esta enfermedad (Kamphuis *et al.*, 2012; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). Por otra parte, también se ha debatido sobre si los astrocitos reactivos son capaces de migrar hacia las placas amiloides, o bien, que simplemente reorientan sus procesos hacia ellas sin mover sus somas, Respecto a ello, se ha observado que cuando se induce una lesión cerebral aguda en roedores, los astrocitos cercanos al sitio del daño se vuelven reactivos al aumentar el grosor de sus principales prolongaciones celulares, no obstante, no modifican su distribución espacial, tampoco expanden netamente su volumen y no superponen sus procesos con otros astrocitos reactivos circundantes (Wilhelmsson *et al.*, 2006; Olabarria *et al.*, 2010).

Pese a que se han realizado avances considerables en el entendimiento de los cambios estructurales que experimentan los astrocitos al tornarse reactivos, queda por esclarecerse si la reactividad astrocítica es una respuesta benéfica o perjudicial durante la patología de la EA. Por una parte, se ha propuesto que el propósito de la astrogliosis reactiva es la neuroprotección y la recuperación del tejido neural lesionado, ya que los astrocitos reactivos son capaces de formar una barrera física alrededor de las placas amiloides, lo que limita su

crecimiento al tiempo que protege a las neuronas circundantes de las especies oligoméricas de A β (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). Además, se sabe que los astrocitos reactivos tienen un papel potencial en la internalización y degradación de A β *in vivo*, ya que pueden expresar proteasas degradantes de A β extracelular como neprilisina, ECE2, IDE, NEP y las metaloproteinasas MMP-2, 3, 6 y 9, (Miners, *et al.*, 2008; Verkhratsky, *et al.*, 2010; Ries y Sastre, 2016).

Por otro lado, también se ha propuesto que los astrocitos reactivos contribuyen al desarrollo y progresión de la EA. Esto en parte podría deberse a que al tornarse reactivos y modificar drásticamente su estructura, los astrocitos interrumpen sus funciones en el mantenimiento de la homeostasis cerebral, por ejemplo, se ha visto que durante la astrogliosis reactiva los pies de los astrocitos se ven afectados, lo cual produce alteraciones que afectan la integridad de la barrera hematoencefálica y disminuye el drenaje perivascular de A β , lo que contribuye al desarrollo de la AAC (Bell y Zlokovic, 2009; Avila-Muñoz y Arias, 2014; Acosta *et al.*, 2017). Adicionalmente, se ha propuesto una participación directa de los astrocitos reactivos en la neurodegeneración, debido a que en este estado son capaces de producir y responder a moléculas potencialmente citotóxicas, como las interleucinas-1, 4, 6, 10, 12; IFN γ ; TNF α y especies reactivas del oxígeno, que pueden contribuir a la muerte neuronal (Fuller *et al.*, 2010; Garwood *et al.*, 2011; Heneka *et al.*, 2014; Heneka *et al.*, 2015).

Debido al doble potencial de la reactividad astrocítica tanto en la neuroprotección como en la neurodegeneración, en los últimos años se ha desarrollado la idea de que la reactividad astrocítica es un mecanismo endógeno de defensa contra el depósito amiloide que es benéfica en los inicios de la patología o durante una respuesta de fase aguda, mientras que la activación persistente y la inflamación asociada pueden contribuir a la progresión de la EA, al cambiar el rol de los astrocitos desde células de apoyo metabólico a células inmunológicas capaces de inducir inflamación a través de la producción de una variedad de factores proinflamatorios que exacerban la patología en un ciclo de retroalimentación positiva (Fuller *et al.*, 2010; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018).

8. Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos y en la discusión de los datos, se formulan las siguientes conclusiones:

1. Tanto en hembras como en machos de la cepa Tg-SwDI ocurre un proceso de astrogliosis reactiva, que se hace evidente por su hipertrofia celular y la sobreexpresión de GFAP.
2. En el modelo murino Tg-SwDI los astrocitos reactivos son capaces de establecer una barrera física entre los agregados de A β y el tejido circundante, y es posible que limiten su crecimiento a través de la fagocitosis.
3. En el cerebro de ratones Tg-SwDI la reactividad astrocítica comienza antes de los 3 meses de edad en CA1, posiblemente en respuesta a los agregados amiloides en el parénquima cerebral, y es posible que, por su estrecha relación, se continúe muy poco después en el giro dentado. Por su parte, en el tálamo comienza entre los 4-5 meses de edad, posiblemente en respuesta a la acumulación fibrilar de A β en la microvasculatura cerebral.
4. En el modelo murino Tg-SwDI existen cambios en la expresión de GFAP dependientes de la edad, que en el caso de las hembras es siempre progresivo pero que en los machos puede incrementar y disminuir, y en este último caso podría estar asociado a cambios hormonales relacionados con la senescencia reproductiva.
5. En la cepa Tg-SwDI los niveles de expresión de GFAP son similares entre hembras y machos durante los primeros 9 meses de vida, con excepciones regionales en las que es superior en machos. No obstante, a partir de los 12 meses de edad comienza a haber diferencias en la expresión de GFAP dependientes del sexo, de tal manera que a esta edad es superior en hembras, pero a los 16 meses es superior en machos.

9. Literatura citada

- Acosta, C., Anderson, H. D., and Anderson, C. M. (2017). Astrocyte dysfunction in Alzheimer disease. *Journal of Neuroscience Research*, 95, 2430–2447.
- Acosta, D., Brusco, L. I., Fuentes, P., Guerra, M., Mena, R., Nitrini, R., Trujillo, Z., and Ventura, R. L. (2012). *La Enfermedad de Alzheimer, Diagnóstico y Tratamiento*. Editorial Médica Panamericana.
- Aggarwal, N. T., and Mielke, M. M. (2023). Sex Differences in Alzheimer's Disease. *Neurologic Clinics*, 41, 343–358.
- Aggleton, J. P., Pralus, A., Nelson, A. J., and Hornberger, M. (2016). Thalamic pathology and memory loss in early Alzheimer's disease: moving the focus from the medial temporal lobe to Papez circuit. *Brain : a Journal of Neurology*, 139, 1877–1890.
- Ahn, K., Shelton, C. C., Tian, Y., Zhang, X., Gilchrist, M. L., Sisodia, S. S., and Li, Y. M. (2010). Activation and intrinsic gamma-secretase activity of presenilin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 21435–21440.
- Ahn, S. J., Anrather, J., Nishimura, N., and Schaffer, C. B. (2018). Diverse inflammatory response after cerebral microbleeds includes coordinated microglial migration and proliferation. *Stroke*, 49, 1719–1726.
- Aizenstein, H. J., Nebes, R. D., Saxton, J. A., Price, J. C., Mathis, C. A., Tsopelas, N. D., Ziolkowski, S. K., James, J. A., Snitz, B. E., Houck, P. R., Bi, W., Cohen, A. D., Lopresti, B. J., DeKosky, S. T., Halligan, E. M., and Klunk, W. E. (2008). Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. *Archives of Neurology*, 65, 1509–1517.
- Alireza, A. (2019). The Alzheimer's disease clinical spectrum: diagnosis and management. *The Medical Clinics of North America*, 103, 263–293.
- Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin*, 64, 146-148.
- Asai, R., Hattori, C., Szabó, B., Sasagawa, N., Maruyama, K., Tanuma, S., and Ishiura, S. (2003). Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301, 231–235.

- Assal, F. (2019). History of dementia. *Frontiers of Neurology and Neuroscience*, 44, 118–126.
- Avila-Muñoz, E. and Arias, C. (2014). When astrocytes become harmful: functional and inflammatory responses that contribute to Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, 18, 29–40.
- Bagad, M., Chowdhury, D., and Khan, Z. (2013). Towards understanding Alzheimer's disease: An Overview. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 4, 286-298.
- Barron, A. M. and Pike, C. J. (2012). Sex hormones, aging, and Alzheimer's disease. *Frontiers in Bioscience (Elite edition)*, 4, 976–997.
- Bell, R. D. and Zlokovic, B. V. (2009). Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 118, 103–113.
- Boyle, P. A., Yu, L., Nag, S., Leurgans, S., Wilson, R. S., Bennett, D. A., and Schneider, J. A. (2015). Cerebral amyloid angiopathy and cognitive outcomes in community-based older persons. *Neurology*, 85, 1930–1936.
- Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, 82, 239–259.
- Budson, A. E., and Solomon, P. R. (2016). *Pérdida de memoria, Alzheimer y demencia: Una guía práctica para médicos* (2° ed.). Elsevier Health Sciences Spain.
- Burdick, D., Soreghan, B., Kwon, M., Kosmoski, J., Knauer, M., Henschen, A., Yates, J., Cotman, C., and Glabe, C. (1992). Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *The Journal of Biological Chemistry*, 267, 546–554.
- Carter, S. F., Herholz, K., Rosa-Neto, P., Pellerin, L., Nordberg, A., and Zimmer, E. R. (2019). Astrocyte biomarkers in Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine*, 25, 77–95.
- Castellani, R. J., Plascencia-Villa, G., and Perry, G. (2019). The amyloid cascade and Alzheimer's disease therapeutics: theory versus observation. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 99, 958–970.
- Chan, D., Janssen, J. C., Whitwell, J. L., Watt, H. C., Jenkins, R., Frost, C., Rossor, M. N., and Fox, N. C. (2003). Change in rates of cerebral atrophy over time in early-onset Alzheimer's disease: longitudinal MRI study. *The Lancet*, 362, 1121–1122.

- Chen, G. F., Xu, T. H., Yan, Y., Zhou, Y. R., Jiang, Y., Melcher, K., and Xu, E. H. (2017). Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacologica Sinica*, 38, 1205–1235.
- Chow, V. W., Mattson, M. P., Wong, P. C., and Gleichmann, M. (2010). An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromolecular Medicine*, 12, 1-12.
- Christen, Y., Jucker, M., Nitsch, R. M., Beyreuther, K., and Haass, C. (2006). *Alzheimer: 100 years and beyond*. Springer.
- Copani, A. (2017). The underexplored question of β -amyloid monomers. *European Journal of Pharmacology*, 817, 71–75.
- Corrigan, F., Vink, R., Blumbergs, P. C., Masters, C. L., Cappai, R., and Van den Heuvel, C. (2012). sAPP α rescues deficits in amyloid precursor protein knockout mice following focal traumatic brain injury. *Journal of Neurochemistry*, 122, 208–220.
- Côté, S., Carmichael, P. H., Verreault, R., Lindsay, J., Lefebvre, J., and Laurin, D. (2012). Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and the risk of cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Alzheimer's and ~~the~~ dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 8, 219–226.
- Davis, J., Xu, F., Deane, R., Romanov, G., Zeigler, K., Zlokovic, B. V., and Van Nostrand, W. E. (2004). Early-onset and robust cerebral microvascular accumulation of amyloid beta-protein in transgenic mice expressing low levels of a vasculotropic Dutch/Iowa mutant form of amyloid beta-protein precursor. *The Journal of Biological Chemistry*, 279, 20296–20306.
- Dawson, G. R., Seabrook, G. R., Zheng, H., Smith, D. W., Graham, S., O'Dowd, G., Bowery, B. J., Boyce, S., Trumbauer, M. E., Chen, H. Y., Van der Ploeg, L. H., and Sirinathsinghji, D. J. (1999). Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience*, 90, 1-13.
- De Strooper, B. (2003). Aph-1, Pen-2, and nicastrin with presenilin generate an active gamma-secretase complex. *Neuron*, 38, 9-12.
- De Ture, M. A., and Dickson, D. W. (2019). The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 14, 1-18.
- Diaz, B. R. (2012). Minireview: translational animal models of human menopause: challenges and emerging opportunities. *Endocrinology*, 153, 3571–3578.

- Dickson, D. (1997). Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease: A perspective from longitudinal clinicopathological studies. *Neurobiology of Aging*, 18, 21–26.
- Doblhammer, G., Fritze, T., Reinke, C., and Fink, A. (2022). Can dementia become the most prevalent disease at the time of death in Germany? Projections up to the year 2060 for the five most important diseases at the time of death. *Population Ageing* 15, 523–540.
- Esquerda-Canals, G., Montoliu-Gaya, L., Güell-Bosch, J., and Villegas, S. (2017). mouse models of Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 57, 1171–1183.
- Fagan, A. M., and Perrin, R. J. (2012). Upcoming candidate cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease. *Biomarkers in Medicine*, 6, 455–476.
- Farrer, L. A., Cupples, L. A., Haines, J. L., Hyman, B., Kukull, W. A., Mayeux, R., Myers, R. H., Pericak-Vance, M. A., Risch, N., and van Duijn, C. M. (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer disease meta analysis consortium. *JAMA*, 278, 1349–1356.
- Fox, J. G., Quimby, F. W., Newcomwe, C. E., Davisson, M. T., Barthold, S. W., and Smith, S. L. (2007). *The mouse in biomedical research. History, Wild Mice, and Genetics*. (2^o ed). Academic Press.
- Fox, N. C., Scahill, R. I., Crum, W. R., and Rossor, M. N. (1999). Correlation between rates of brain atrophy and cognitive decline in AD. *Neurology*, 52, 1687–1689.
- Fox, N. C., and Schott, J. M. (2004). Imaging cerebral atrophy: normal ageing to Alzheimer's disease. *The Lancet*, 363. 392–394.
- Fuller, S., Steele, M., and Münch, G. (2010). Activated astroglia during chronic inflammation in Alzheimer's disease--do they neglect their neurosupportive roles? *Mutation Research*, 690, 40–49.
- Funato, H., Yoshimura, M., Yamazaki, T., Saido, T. C., Ito, Y., Yokofujita, J., Okeda, R., and Ihara, Y. (1998). Astrocytes containing amyloid beta-protein (Abeta)-positive granules are associated with Abeta40-positive diffuse plaques in the aged human brain. *The American Journal of Pathology*, 152, 983–992.
- Garwood, C. J., Pooler, A. M., Atherton, J., Hanger, D. P., and Noble, W. (2011). Astrocytes are important mediators of A β -induced neurotoxicity and tau phosphorylation in primary culture. *Cell Death and Disease*, 2, e167.

- Gómez-Ramos, P., and Morán, M. A. (2007). Ultrastructural localization of intraneuronal Abeta-peptide in Alzheimer disease brains. *Journal of Alzheimer's Disease*, *11*, 53–59.
- Gorman, P. M., and Chakrabartty, A. (2001). Alzheimer beta-amyloid peptides: structures of amyloid fibrils and alternate aggregation products. *Biopolymers*, *60*, 381–394.
- Gouras, G. k., Olsson, T. T., and Hansson, O. (2015). β -amyloid peptides and amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics*, *12*, 3-11.
- Grabowski, T. J., Cho, H. S., Vonsattel, J. P., Rebeck, G. W., and Greenberg, S. M. (2001). Novel amyloid precursor protein mutation in an Iowa family with dementia and severe cerebral amyloid angiopathy. *Annals of neurology*, *49*, 697–705.
- Graeber, M. B., Kösel, S., Grasbon-Frodl, E., Möller, H. J., and Mehraein, P. (1998). Histopathology and APOE genotype of the first Alzheimer disease patient, Auguste D. *Neurogenetics*, *1*, 223–228.
- Greenberg, S. M., Bacska, B. J., Hernandez-Guillamon, M., Pruzin, J., Sperling, R., and van Veluw, S. J. (2020). Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease — one peptide, two pathways. *Nature Reviews Neurology*, *16*, 30–42.
- Hall, A. M., and Roberson, E. D. (2012). Mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin*, *88*, 3–12.
- Hardy, J. A., and Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, *256*, 184–185.
- Henderson, V. W., and Buckwalter, J. G. (1994). Cognitive deficits of men and women with Alzheimer's disease. *Neurology*, *44*, 90–96.
- Heneka, M. T., Carson, M. J., Khoury, J. E., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, Town, T., Morgan, D., Shinohara, M. L., Perry, V. P., Holmes, C., Bazan, N. G., Brooks, D. J., Hunot, S., Joseph, B., Deigendesch, N., Garaschuk, O., Boddeke, E., Dinarello, C. A., Breitner, J. C., Cole, G. M., Golenbock, D. T., and Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, *14*, 388–405.
- Heneka, M. T., Kummer, M. P., and Latz, E. (2014). Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Immunology*. *14*, 463–477.

- Hick, M., Herrmann, U., Weyer, S. W., Mallm, J., Tschäpe, J., Borgers, M., Mercken, M., Roth, F. C., Draguhn, A., Slomianka, L., Wolfer, D. P., Korte, M., and Müller, U. C. (2014). Acute function of secreted amyloid precursor protein fragment APPs α in synaptic plasticity. *Acta Neuropathologica*, *129*, 21–37.
- Hol, E. M., and Pekny, M. (2015). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology*, *32*, 121–130.
- Itagaki, S., McGeer, P. L., Akiyama, H., Zhu, S., and Selkoe, D. (1989). Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *Journal of Neuroimmunology*, *24*, 173–182.
- Jankowsky, J. L., and Zheng, H. (2017). Practical considerations for choosing a mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, *12*, 1–22.
- Johnstone, M., Gearing, A. J., and Miller, K. M. (1999). A central role for astrocytes in the inflammatory response to beta-amyloid; chemokines, cytokines and reactive oxygen species are produced. *Journal of Neuroimmunology*, *93*, 182–193.
- Kamp, J. A., Moursel, L. G., Haan, J., Terwindt, G. M., Lesnik Oberstein, S. A., van Duinen, S. G., and van Roon-Mom, W. M. (2014). Amyloid β in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis-Dutch type. *Reviews in the Neurosciences*, *25*, 641–651.
- Kamphuis, W., Orre, M., Kooijman, L., Dahmen, M., and Hol, E. M. (2012). Differential cell proliferation in the cortex of the APPswePS1dE9 Alzheimer's disease mouse model. *Glia*, *60*, 615–629.
- Karran, E., Mercken, M., and De Strooper, B. (2011). The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, *10*, 698–712.
- Kashon, M. L., Ross, G. W., O'Callaghan, J. P., Miller, D. B., Petrovitch, H., Burchfiel, C. M., Sharp, D. S., Markesbery, W. R., Davis, D. G., Hardman, J., Nelson, J., and White, L. R. (2004). Associations of cortical astrogliosis with cognitive performance and dementia status. *Journal of Alzheimer's disease*, *6*, 595–681.
- Kato, S., Gondo, T., Hoshii, Y., Takahashi, M., Yamada, M., and Ishihara, T. (1998). Confocal observation of senile plaques in Alzheimer's disease: senile plaque morphology and relationship between senile plaques and astrocytes. *Pathology International*, *48*, 332–340.

- Knopman, D. S., Amieva, H., Petersen, R. C., Chételat, G., Holtzman, D. M., Hyman, B. T., Nixon, R. A., and Jones, D. T. (2021). Alzheimer disease. *Nature Reviews Disease Primers*, 7, 1-21.
- Kohama, S. G., Goss, J. R., Finch, C. E., and McNeill, T. H. (1995). Increases of glial fibrillary acidic protein in the aging female mouse brain. *Neurobiology of Aging*, 16, 59–67.
- Levy, E., Carman, M. D., Fernandez-Madrid, I. J., Power, M. D., Lieberburg, I., van Duinen, S. G., Bots, G. T., Luyendijk, W., and Frangione, B. (1990). Mutation of the Alzheimer's disease amyloid gene in hereditary cerebral hemorrhage, Dutch type. *Science*, 248, 1124–1126.
- Li, R., and Singh, M. (2014). Sex differences in cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35, 385–403.
- Lyman, M., Lloyd, D. G., Ji, X., Vizcaychipi, M. P., and Ma, D. (2014). Neuroinflammation: The role and consequences. *Neuroscience Research*, 79, 1-12.
- Maniskas, M. E., Mack, A. F., Morales-Scheihing, D., Finger, C., Zhu, L., Paulter, R., Urayama, A., McCullough, L. D., and Manwani, B. (2021). Sex differences in a murine model of cerebral amyloid angiopathy. *Brain, Behavior and Immunity - Health*, 14, 100260.
- McAllister, C., Long, J., Bowers, A., Walker, A., Cao, P., Honda, S., Harada, N., Staufenbiel, M., Shen, Y., and Li, R. (2010). Genetic targeting aromatase in male amyloid precursor protein transgenic mice down-regulates beta-secretase (BACE1) and prevents Alzheimer-like pathology and cognitive impairment. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30, 7326–7334.
- Meraz-Ríos, M. A., Toral-Rios, D., Franco-Bocanegra, D., Villeda-Hernández, J., and Campos-Peña, V. (2013). Inflammatory process in Alzheimer's disease. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 7, 59.
- Miao, J., Vitek, M. P., Xu, F., Previti, M. L., Davis, J., and Van Nostrand, W. E. (2005a). Reducing cerebral microvascular amyloid-protein deposition diminishes regional neuroinflammation in vasculotropic mutant amyloid precursor protein transgenic mice. *Journal of Neuroscience*, 25, 6271–6277.
- Miao, J., Xu, F., Davis, J., Otte-Höller, I., Verbeek, M. M., and Van Nostrand, W. E. (2005b). 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*, 167,505–515.

- Milosch, N., Tanriöver, G., Kundu, A., Rami, A., François, J. C., Baumkötter, F., Weyer, S. W., Samanta, A., Jäschke, A., Brod, F., Buchholz, C. J., Kins, S., Behl, C., Müller, U. C., and Kögel, D. (2014). Holo-APP and G-protein-mediated signaling are required for sAPP α -induced activation of the Akt survival pathway. *Cell death and Disease*, 5, 1-14.
- Miners, J. S., Baig, S., Palmer, J., Palmer, L. E., Kehoe, P. G., and Love, S. (2008). Abeta-degrading enzymes in Alzheimer's disease. *Brain Pathology*, 18, 240–252.
- Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B., and Lannfelt, L. (1992). A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nature Genetics*, 1, 345–347.
- Murray, P. S., Kirkwood, C. M., Gray, M. C., Ikonovic, M. D., Paljug, W. R., Abrahamson, E. E., Henteleff, R. A., Hamilton, R. L., Kofler, J. K., Klunk, W. E., Lopez, O. L., Penzes, P., and Sweet, R. A. (2012). β -Amyloid 42/40 ratio and kalirin expression in Alzheimer disease with psychosis. *Neurobiology of Aging*, 33, 2807–2816.
- Nakagomi, S., Kiryu-Seo, S., and Kiyama, H. (2000). Endothelin-converting enzymes and endothelin receptor B messenger RNAs are expressed in different neural cell species and these messenger RNAs are coordinately induced in neurons and astrocytes respectively following nerve injury. *Neuroscience*, 101, 441–449.
- Nichols, N. R., Day, J. R., Laping, N. J., Johnson, S. A., and Finch, C. E. (1993). GFAP mRNA increases with age in rat and human brain. *Neurobiology of Aging*, 14, 421–429.
- Olabarria, M., Noristani, H. N., Verkhratsky, A., and Rodríguez, J. J. (2010). Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Glia*, 58, 831–838.
- Pekny, M., and Pekna, M. (2004). Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *Journal of Pathology*, 204, 428 – 437.
- Perez-Nievas, B. G., and Serrano-Pozo, A. (2018). Deciphering the astrocyte reaction in Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 10, 114.
- Perl, D. P. (2010). Neuropathology of Alzheimer's disease. *The Mount Sinai Journal of Medicine, New York*, 77, 32–42.

- Piaceri, I., Nacmias, B., and Sorbi, S. (2013). Genetics of familial and sporadic Alzheimer's disease. *Frontiers in Bioscience, Elite*, 5, 167-177.
- Pihlaja, R., Koistinaho, J., Malm, T., Sikkilä, H., Vainio, S., and Koistinaho, M. (2008). Transplanted astrocytes internalize deposited beta-amyloid peptides in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Glia*, 56(2), 154–163.
- Pike, C. J. (2017). Sex and the development of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience Research*, 95, 671–680.
- Pike, C. J., Cummings, B. J., and Cotman, C. W. (1995). Early association of reactive astrocytes with senile plaques in Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*, 132, 172–179. Esta referencia no se cita en el texto
- Prince, M., Wimo, A., Guerchet, M., Ali, G. C., Wu, Y. T., and Prina, M. (2015). *World Alzheimer Report 2015: The global impact of dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost and trends*. London: Alzheimer's Disease International.
- Qiu, T., Liu, Q., Chen, Y. X., Zhao, Y. F., and Li, Y. M. (2015). A β 42 and A β 40: similarities and differences. *Journal of Peptide Science*, 21, 522–529.
- Rabe, S., Reichwald, J., Ammaturo, D., de Strooper, B., Saftig, P., Neumann, U., and Staufenbiel, M. (2011). The Swedish APP mutation alters the effect of genetically reduced BACE1 expression on the APP processing. *Journal of Neurochemistry*, 119, 231–239.
- Rana, A., Massa, P. T., and Chen, X. J. (2022). A Gravity-Fed Transcardial Perfusion Method for Histologic Analysis of the Mouse Central Nervous System. *Journal of Visualized Experiments*, 179.
- Revesz, T., Ghiso, J., Lashley, T., Plant, G., Rostagno, A., Frangione, B., and Holton, J. L. (2003). Cerebral amyloid angiopathies: A pathologic, biochemical, and genetic View. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 62, 885–898.
- Ricciarelli, R., and Fedele, E. (2017). The amyloid cascade hypothesis in Alzheimer's disease: It's time to change our mind. *Current neuropharmacology*, 15, 926–935.
- Ries, M., and Sastre, M. (2016). Mechanisms of A β clearance and degradation by glial cells. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8, 160.
- Rius-Pérez, S., Tormos, A. M., Pérez, S., and Taléns-Visconti, R. (2015). Patología vascular: ¿causa o efecto en la enfermedad de Alzheimer? *Sociedad Española de Neurología*, 33, 112-120.

- Rodríguez-Arellano, J. J., Parpura, V., Zorec, R., and Verkhratsky, A. (2016). Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 323, 170–182.
- Rosario, E. R., Chang, L., Beckett, T. L., Carroll, J. C., Paul Murphy, M., Stanczyk, F. Z., and Pike, C. J. (2009). Age-related changes in serum and brain levels of androgens in male Brown Norway rats. *Neuroreport*, 20, 1534–1537.
- Rosario, E. R., Chang, L., Head, E. H., Stanczyk, F. Z., and Pike, C. J. (2011). Brain levels of sex steroid hormones in men and women during normal aging and in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 32, 604–613.
- Sandbrink, R., Masters, C. L., and Beyreuther, K. (1996). APP gene family alternative splicing generates functionally related isoforms. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 777, 281-287.
- Scheyer, O., Rahman, A., Hristov, H., Berkowitz, C., Isaacson, R. S., Diaz Brinton, R., and Mosconi, L. (2018). Female sex and Alzheimer's risk: The menopause connection. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, 5, 225–230.
- Schott, J. M., Fox, N. C., Frost, C., Scahill, R. I., Janssen, J. C., Chan, D., Jenkins, R., and Rossor, M. N. (2003). Assessing the onset of structural change in familial Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 55, 181–188.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., and Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1, 1-24.
- Serrano-Pozo, A., Mielke, M. L., Muzitansky, A., Gómez-Isla, T., Growdon, J. H., Bacskai, B. J., Betensky, R. A., Frosch, M. P., and Hyman, B. T. (2012). Stable size distribution of amyloid plaques over the course of Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 71, 694–701.
- Setti, S. E., Flanigan, T., Hanig, J., and 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.
- Shao, Y., Gearing, M., and Mirra, S. S. (1997). Astrocyte-apolipoprotein E associations in senile plaques in Alzheimer disease and vascular lesions: a regional immunohistochemical study. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 56, 376–381.
- Sperling, R. A., Aisen, P. S., Beckett, L. A., Bennett, D. A., Craft, S., Fagan, A.M., Iwatsubo, T., Jack, C. R Jr., Kaye, J., Montine, T. J., Park, D. C., Reiman, E. M.,

- Rowe, C. C., Siemers, E., Stern, Y., Yaffe, K., Carrillo, M. C., Thies, B., Morrison-Bogorad, M., Wagster, M. V., and Phelps, C. H. (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's and Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 7, 280–292.
- Spiers, H. J., Maguire, E. A., and Burgess, N. (2001). Hippocampal amnesia. *Neurocase*, 7, 357–382.
 - Squire, L. R. (2009). *Encyclopedia of Neuroscience*. Elsevier uk. Páginas consultadas?
 - Squire, L. R., Stark, C. E., and Clark, R. E. (2004). The medial temporal lobe. *Annual Review of Neuroscience*, 27, 279–306.
 - Strohmeyer, R., Ramirez, M., Cole, G. J., Mueller, K., and Rogers, J. (2002). Association of factor H of the alternative pathway of complement with agrin and complement receptor 3 in the Alzheimer's disease brain. *Journal of Neuroimmunology*, 131, 135–146.
 - Teller, K. K., Russo, C., DeBusk, L. M., Angelini, G., Zaccheo, D., Dagna-Bricarelli, F., Scartezzini, P., Bertolini, S., Mann, D. M., Tabaton, M., and Gambetti, P. (1996). Presence of soluble amyloid beta-peptide precedes amyloid plaque formation in Down's syndrome. *Nature Medicine*, 2, 93–95.
 - Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L. A., and Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Annals of Neurology*, 30, 572–580.
 - Thal, D. R., Capetillo-Zárate, E., del Tredici, K., and Braak, H. (2006). The Development of amyloid β protein deposits in the aged brain. *Science of Aging Knowledge Environment*, 6, 1-9.
 - Thal, D. R., Ghebremedhin, E., Rüb, U., Yamaguchi, H., Del Tredici, K., and Braak, H. (2002). Two types of sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 61, 282–293.
 - Tower, D. B., and Young, O. M. (1973). The activities of butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase, the rate of anaerobic glycolysis, and the question of a constant density of glial cells in cerebral cortices of various mammalian species from mouse to whale. *Journal of Neurochemistry*, 20, 269–278.

- Van Nostrand, W. E., Melchor, J. P., Cho, H. S., Greenberg, S. M., and Rebeck, G. W. (2001). Pathogenic effects of D23N Iowa mutant amyloid beta -protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 32860–32866.
- Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J. C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., and Citron, M. (1999). Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, 286, 735–741.
- Vehmas, A. K., Kawas, C. H., Stewart, W. F., and Troncoso, J. C. (2003). Immune reactive cells in senile plaques and cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 24, 321–331. Revisar, no esta citadas en el texto
- Verkhratsky, A., Olabarria, M., Noristani, H. N., Yeh, C. Y., and Rodriguez, J. J. (2010). Astrocytes in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental Neuro Therapeutics*, 7, 399–412.
- Weller, R. O., Subash, M., Preston, S. D., Mazanti, I., and Carare, R. O. (2008). Perivascular drainage of amyloid-beta peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *Brain Pathology*, 18, 253–266.
- Weyer, S. V., Klevanski, M., Delekate, A., Voikar, V., Aydin, D., Hick, M., Filippov, M., Drost, N., Schaller, K. L., Saar, M., Vogt, M. A., Gass, P., Samanta, A., Jäschke, A., Korte, M., Wolfer, D. P., Caldwell, J. H., and Müller, U. C. (2011). APP and APLP2 are essential at PNS and CNS synapses for transmission, spatial learning and LTP. *The EMBO Journal*, 30, 2266–2280.
- Wilcock, D. M., Lewis, M. R., Van Nostrand, W. E., Davis, J., Previti, M. L., Gharkholonarehe, N., Vitek, M. P., and Colton, C. A. (2008). Progression of amyloid pathology to Alzheimer's disease pathology in an amyloid precursor protein transgenic mouse model by removal of nitric oxide synthase 2. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 28,1537–1545.
- Wilhelmsson, U., Bushong, E. A., Price, D. L., Smarr, B. L., Phung, V., Terada, M., Ellisman, M. H., and Pekny, M. (2006). Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 17513–17518.

- Wisniewski, H. M., and Wegiel, J. (1994). Beta-amyloid formation by myocytes of leptomeningeal vessels. *Acta Neuropathologica*, 87, 233–241.
- World Health Organization. (15 de marzo de 2023). Dementia. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.
- Wu, L., Rosa-Neto, P., R. Hsiung, G. Y., Sadovnick, A. D., Masellis, M., Black, S. E., Jia, J., and Gauthier, S. (2012). Early-onset familial Alzheimer's disease (EOFAD). *Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 39, 436-445.
- Xu, F., Grande, A. M., Robinson, J. K., Previti, M. L., Vasek, M., Davis, J., and Van Nostrand, W. E. (2007). Early-onset subicular microvascular amyloid and neuroinflammation correlate with behavioral deficits in vasculotropic mutant amyloid beta-protein precursor transgenic mice. *Neuroscience*, 146, 98–107.
- Yamada, M. (2002). Risk factors for cerebral amyloid angiopathy in the elderly. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 977, 37–44.
- Yamada, M., Tsukagoshi, H., Otomo, E., and Hayakawa, M. (1987). Cerebral amyloid angiopathy in the aged. *Journal of neurology*, 234, 371–376.
- Yamada, M., and Naiki, H. (2012). Cerebral amyloid angiopathy. *Molecular Biology of Neurodegenerative Diseases*, 107, 41–78.
- Yamamoto, N., Tanida, M., Ono, Y., Kasahara, R., Fujii, Y., Ohora, K., Suzuki, K., and Sobue, K. (2014). Leptin inhibits amyloid β -protein degradation through decrease of neprilysin expression in primary cultured astrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 445, 214–217.
- Yasuhara, O., Kawamata, T., Aimi, Y., McGeer, E. G., McGeer, E. G., and McGeer, P. L. (1994). Two types of dystrophic neurites in senile plaques of Alzheimer disease and elderly non-demented cases. *Neuroscience Letters*, 171, 73-76.
- Zhang, Y., Thompson, R., Zhang, H., and Xu, H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Molecular Brain*, 4, 1-13.
- Zhou, G., Xiang, T., Xu, Y., He, B., Wu, L., Zhu, G., Xie, J., Yao, L., and Xiao, Z. (2023a). Fruquintinib/HMPL-013 ameliorates cognitive impairments and pathology in a mouse model of cerebral amyloid angiopathy (CAA). *European Journal of Pharmacology*, 939, 175446.
- Zhou, G., Ye, Q., Xu, Y., He, B., Wu, L., Zhu, G., Xie, J., Yao, L., and Xiao, Z. (2023). Mitochondrial calcium uptake 3 mitigates cerebral amyloid angiopathy-related neuronal death and glial inflammation by reducing mitochondrial dysfunction. *International Immunopharmacology*, 117, 109614.