

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA



IMPLICACIÓN DE LA DISFUNCIÓN GLIAL EN LA EVOLUCIÓN DE LA PATOLOGÍA EN PACIENTES DE ALZHEIMER

Memoria presentada para optar al grado de Doctor
por la Universidad de Sevilla

Clara Muñoz Castro

Directores

Dr. Javier Vitorica Ferrández

Dra. M^a Luisa Vizquete Chacón

Sevilla, 17 de noviembre de 2020

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

ÍNDICE

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



A. INTRODUCCIÓN	1
1. Enfermedad de Alzheimer	3
1.1. Antecedentes	3
1.2. Tipos de Alzheimer	5
1.2.1. Alzheimer familiar	5
1.2.2. Alzheimer esporádico	5
2. Rasgos neuropatológicos	7
2.1. Pérdida sináptica, neuronal y patología neurítica	9
2.1.1. Disminución de la densidad sináptica	9
2.1.2. Pérdida neuronal	10
2.1.3. Patología neurítica	10
2.2. Patología amiloide	11
2.2.1. Agregación del péptido A β	11
2.2.2. Acumulación patológica de A β	14
2.2.2.1. Procesamiento de APP y producción de A β	14
A. Ruta no amiloidogénica	15
B. Ruta amiloidogénica	15
2.2.2.2. Degradación y/o aclaramiento de A β	16
2.2.3. Hipótesis de la cascada amiloide	17
2.3. Patología neurofibrilar y proteína Tau	19
2.3.1. Estructura y función de Tau	19
2.3.2. Fosforilación de Tau	20
2.3.3. Ovillos neurofibrilares de Tau	20
3. Respuesta inmune en el SNC y en la EA	22
3.1. Células gliales presentes en el parénquima del SNC	23
3.1.1. Microglía	23
3.1.1.1. Funciones de la microglía	24
3.1.1.2. Microglía en la EA	25
3.1.2. Astrocitos	27
3.1.2.1. Funciones de los astrocitos	28
3.1.2.2. Astrocitos en la EA	30
3.2. Otros componentes celulares del sistema inmune residentes en el SNC	32
3.2.1. Respuesta inmune innata	33
3.2.1.1. Macrófagos asociados al SNC o macrófagos asociados a barrera	34
3.2.1.1.1. Funciones de los macrófagos asociados al SNC	35
3.2.1.1.2. Macrófagos asociados al SNC en la EA	35
3.2.1.2. Monocitos y células derivadas de monocitos (CDM)	36



Índice

3.2.1.2.1. Funciones de los monocitos y CDM	37
3.2.1.2.2. Monocitos y CDM en la EA	37
3.2.1.3. Células dendríticas (CD)	39
3.2.1.3.1. Funciones de las CD	39
3.2.1.3.2. CD en la EA	40
3.2.1.4. Neutrófilos	41
3.2.2. Respuesta inmune adaptativa	41
3.2.2.1. Linfocitos B	42
3.2.2.2. Linfocitos T	42
3.2.2.2.1. Linfocitos T colaboradores o <i>helper</i> (Th)	43
3.2.2.2.2. Linfocitos T citotóxicos (Tc)	43
3.2.2.3. Linfocitos en la EA	43

B. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS **45**

C. MATERIALES Y MÉTODOS **51**

1. Muestras humanas <i>post mortem</i>	53
2. Animales de experimentación	54
3. Cultivos celulares primarios	55
3.1. Cultivos mixtos de microglía y astrocitos	55
3.1.1. Aislamiento de astrocitos	55
3.2. Cultivos de neuronas	56
4. Aislamiento de proteínas solubles (S1)	56
5. Estudio del metabolismo de los astrocitos primarios mediante Seahorse	57
5.1. Procedimiento	59
6. Ensayos de supervivencia neuronal	59
6.1. Aislamiento de neurosinaptosomas (NS)	60
6.2. Obtención de medio condicionado por astrocitos	60
6.3. Filtración de medio condicionado por astrocitos	61
7. Inmunofluorescencia para células de cultivo	61
7.1. Marcaje inmunofluorescente doble para células de cultivo	61
7.2. Obtención de imágenes mediante Microscopía Confocal	62
7.3. Procesamiento de imágenes y cuantificación de neuronas	62

II

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

8. Inmunohistoquímica	62
9. Aislamiento de células a partir del cerebro de modelos de EA	64
9.1. Aislamiento de astrocitos <i>ex vivo</i> a partir del cerebro de ratones APP	65
9.2. Aislamiento de microglía, CDM y linfocitos <i>ex vivo</i> del cerebro de modelos APP y TAU	67
10. Aislamiento de ARN, ADN y proteínas	69
10.1. Procedimiento.....	70
10.1.1. Aislamiento de ARN	70
10.1.2. Aislamiento de ADN.....	71
10.1.3. Aislamiento de proteínas.....	72
11. Retrotranscripción	72
11.1. Procedimiento.....	73
12. PCR en tiempo real	73
12.1. Cuantificación de la expresión génica mediante sondas Taqman	74
12.1.1. Procedimiento	75
12.2. Cuantificación de la expresión génica mediante TaqMan® Array Cards....	77
12.2.1. Procedimiento.....	78
12.3. Identificación del genotipo APOE.....	78
12.3.1. Procedimiento.....	79
13. Cuantificación de proteínas: Método de Lowry	80
14. Western blot	80
14.1. Procedimiento.....	81
15. Dot blot	83
15.1. Procedimiento.....	83
16. Análisis de datos y clustering	83
13. Análisis estadístico	84
D. RESULTADOS	85

1. Caracterización de la patología y la respuesta microglial en la corteza frontal de pacientes de Alzheimer	87
1.1. Caracterización de la patología amiloide y neurofibrilar en la corteza frontal en relación con el hipocampo en la EA	87
1.2. Degeneración de neuronas parvalbúmina (PV) positivas en la corteza frontal y el hipocampo en la EA.....	90
1.3. Estudio de la respuesta microglial en la corteza frontal de pacientes de Alzheimer.....	92



2. Respuesta astrogliar en la patología de Alzheimer..... 95

2.1. Aumento de la reactividad astrogliar en muestras *post mortem* de pacientes de Alzheimer 95

 2.1.1. Aumento de reactividad astrogliar en muestras *post mortem* de hipocampo de pacientes de Alzheimer..... 95

 2.1.2. Reactividad astrogliar y genotipo APOE en muestras *post mortem* de hipocampo de pacientes de Alzheimer..... 98

 2.1.3. Reactividad astrogliar y neurodegeneración GABAérgica en muestras de hipocampo de pacientes de Alzheimer..... 98

 2.1.4. Reactividad astrogliar y patologías A β y Tau en muestras de hipocampo de pacientes de Alzheimer 99

 2.1.5. Aumento de reactividad astrogliar en muestras *post mortem* de corteza frontal de pacientes de Alzheimer 100

2.2. Aumento de la respuesta del complemento en el hipocampo y la corteza frontal de pacientes de EA..... 102

 2.2.1. Aumento de la respuesta del complemento en muestras *post mortem* de hipocampo de pacientes de EA..... 103

 2.2.2. La respuesta del complemento en el hipocampo de pacientes de EA parece estar mediada principalmente por los astrocitos reactivos 104

 2.2.3. Respuesta del complemento y genotipo APOE en muestras *post mortem* de hipocampo de pacientes de Alzheimer 105

 2.2.4. Respuesta del complemento y neurodegeneración GABAérgica en muestras *post mortem* de hipocampo de pacientes de Alzheimer..... 105

 2.2.5. Respuesta del complemento y patologías A β y Tau en muestras de hipocampo de pacientes de Alzheimer..... 106

 2.2.6. Aumento de la respuesta del complemento en muestras *post mortem* de corteza frontal de pacientes de Alzheimer..... 106

2.3. Disminución del metabolismo de los astrocitos *in vitro*, en modelos y pacientes de EA..... 108

 2.3.1. La disminución metabólica de los astrocitos *in vitro* podría reducir su capacidad neuroprotectora..... 109

 2.3.1.1. Disminución metabólica de los astrocitos *in vitro* en presencia de patología A β 109

 2.3.1.2. Pérdida de neuroprotección de los astrocitos *in vitro* en presencia de patologías A β y Tau..... 112

 2.3.1.2.1. Los astrocitos proporcionan factores prosupervivencia a las neuronas *in vitro*..... 112

 2.3.1.2.2. Las sustancias neuroprotectoras liberadas por los astrocitos tienen una masa molecular pequeña 113

 2.3.1.2.3. ¿Disminuyen los astrocitos su capacidad neuroprotectora en presencia de las patologías A β y Tau?..... 115



2.3.1.2.4. Los astrocitos recuperan su fenotipo neuroprotector cuando el S1 de modelos APP y TAU se elimina del medio	116
2.3.1.2.5. Los astrocitos disminuyen su capacidad neuroprotectora en presencia de las patologías A β y Tau	118
2.3.2. ¿Disminuye el metabolismo de los astrocitos en modelos de EA?	119
2.3.3. Disminución del metabolismo de los astrocitos en el hipocampo de pacientes de EA	119
3. Infiltración de células inmunes en el parénquima cerebral de pacientes de Alzheimer	126
3.1. En el parénquima cerebral de ratones transgénicos modelos de EA la infiltración de CDM es muy limitada	126
3.1.1. Aislamiento y caracterización de microglía, CDM y linfocitos de la corteza cerebral e hipocampo de distintos modelos murinos de EA.....	127
3.1.2. En los modelos APP y TAU se produce una entrada significativa de linfocitos, pero la infiltración de CDM es limitada.....	128
3.2. Infiltración de CDM en muestras <i>post mortem</i> de hipocampo de pacientes de EA.....	129
3.2.1. Análisis de clúster de genes expresados por células microgliales y/o CDM.....	129
3.2.2. Los marcadores clásicos de microglía activa permanecen prácticamente inalterados en la EA, mientras que la expresión de marcadores asociados a CDM? se incrementa significativamente.....	131
3.2.3. En pacientes Braak V-VI se produce un aumento significativo en la expresión de las quimioquinas CCL2 y CCL4, así como de su receptor CCR2	133
3.2.4. El cúster de CDM? no se expresa en células microgliales	134
3.2.5. En la EA los macrófagos asociados al SNC no parecen infiltrarse en el parénquima cerebral	139
3.3. ¿Existe relación entre la infiltración de CDM y otros aspectos de la patología de Alzheimer?.....	141
3.4. La infiltración de CDM ocurre en múltiples áreas cerebrales en los pacientes de EA.....	151
4. Caracterización de subpoblaciones o estados de astrocitos y microglía en pacientes de Alzheimer mediante inmunohistoquímica fluorescente múltiple	155
4.1. Muestras humanas <i>post mortem</i>	155
4.2. Procedimiento de la inmunohistoquímica fluorescente múltiple.....	156
4.3. Procesamiento de imágenes	161
4.4. Preprocesamiento y análisis de datos.....	162



E. DISCUSIÓN **167**

1. Patología amiloide, neurofibrilar y neurodegeneración GABAérgica en la corteza frontal y el hipocampo de pacientes de Alzheimer 171

2. Respuesta astrogliar en la patología de Alzheimer..... 174

 2.1. Reactividad astrogliar 174

 2.2. Disfunción metabólica astrogliar 179

 2.3. Interacción entre astrocitos y microglía 190

 2.4. Conclusión: papel dual de los astrocitos en la EA..... 191

3. Respuesta microglial en la enfermedad de Alzheimer..... 192

4. Infiltración de células inmunes en el parénquima cerebral de pacientes de Alzheimer 197

5. Caracterización de subpoblaciones o estados de astrocitos y microglía en pacientes de Alzheimer mediante inmunohistoquímica fluorescente múltiple..... 210

6. Conclusiones y reflexión final..... 213

F. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS **217**

G. ANEXO I: Figuras suplementarias **223**

H. SUMMARY **229**

1. Introduction..... 231

2. Aims 233

3. Methods..... 233

4. Results and Discussion..... 234

5. Conclusions..... 238

I. BIBLIOGRAFÍA **241**

J. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS **299**

K. ABREVIATURAS **309**



A. INTRODUCCIÓN

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un proceso neurodegenerativo progresivo e irreversible, que se manifiesta inicialmente con deterioro de las funciones cognitivas y alteraciones conductuales. La EA representa hoy en día la forma más común de demencia entre las personas mayores de 65 años, constituyendo las demencias a su vez la quinta causa de muerte en el mundo y la tercera en los países desarrollados (OMS, 2016).

En los pacientes de EA se produce una muerte neuronal selectiva en regiones cerebrales superiores, y, como consecuencia pérdida progresiva de memoria, trastornos de personalidad, pérdida de capacidad cognitiva (afasia, apraxia y agnosia), desorientación espaciotemporal, ansiedad, insomnio y finalmente demencia, que se manifiesta en los estadios más avanzados de la enfermedad (Hane et al., 2017b; Kumar y Tsao, 2019). Los pacientes de EA muestran un deterioro progresivo que les impide desempeñar una vida autónoma e independiente, y los deja en estado vegetativo los últimos meses, e incluso años, de su vida. Por tanto, es una enfermedad incapacitante que requiere la ayuda de familiares o/y servicios especializados.

1.1. Antecedentes

La EA fue descrita por primera vez en 1907 por el psiquiatra y neurólogo Alois Alzheimer como “un proceso patológico peculiar grave de la corteza cerebral” (Alzheimer, 1907), tras analizar el cerebro de la primera paciente diagnosticada con esta enfermedad, Auguste Deter (Figura A.1). Esta mujer manifestó a los 51 años pérdida progresiva de memoria junto a otros trastornos característicos, y cuatro años después, falleció en estado de invalidez total. El análisis anatomopatológico de su cerebro desveló la presencia de depósitos proteicos extracelulares (placas seniles) y agregados fibrilares intracelulares (ovillos), localizados principalmente en la corteza cerebral e hipocampo. Actualmente, estas lesiones histopatológicas son los dos principales marcadores *post mortem* de la EA. Sin embargo, no fue hasta 1910 cuando el psiquiatra alemán Emil Kraepelin dio nombre a esta nueva entidad clínica y patológica, denominándola Enfermedad de Alzheimer.

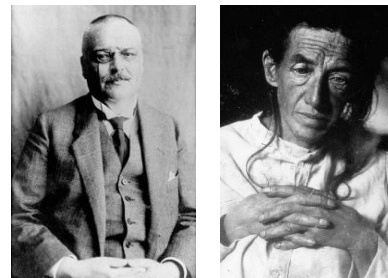


Figura A.1. Alois Alzheimer y Auguste Deter. El Dr. Alois Alzheimer (1864-1915) a la izquierda y su paciente Auguste Deter (1850-1906), la primera paciente diagnosticada de EA, a la derecha.

A día de hoy se estima que el número de personas con demencia en el mundo es de unos 50 millones (Alzheimer’s Disease International, 2019), siendo la EA la más común, ya que representa el 60-70% de todos los casos (Robinson et al., 2017; OMS 2020). La incidencia de la EA aumenta de forma exponencial con la edad afectando al 30-40% de la población mayor de 85 años, y al 63,9% de los mayores de 90 años (Prince et al. 2013). Actualmente, es el tercer problema de salud más grave



en los países desarrollados, y empeorará en el futuro por el aumento de la esperanza de vida, el envejecimiento de la población y el elevado coste económico, sanitario y social que supone el cuidado de los pacientes de EA (Robinson et al., 2017). Se prevee que el número de personas con demencia se duplique en 2030 y triplique en 2050, alcanzándose 152 millones de afectados en todo el mundo (Robinson et al., 2017; Alzheimer's Disease International, 2019; Kumar y Tsao, 2019).

Desde el punto de vista clínico, la EA pasa por 3 fases con distinto grado de alteración cognitiva (Kumar y Tsao, 2019). La primera fase "preclínica" es asintomática, cursa con amiloidosis cerebral y afecta a la corteza entorrinal y al hipocampo; a continuación, hay una fase "prodrómica" o de "deterioro cognitivo leve" (MCI; del inglés, *mild cognitive impairment*), en la que la patología progresa hacia distintas áreas de la corteza cerebral; finalmente, la fase de "demencia" es consecuencia de la pérdida de sinapsis y neuronas en las regiones cerebrales responsables de los procesos cognitivos, como son la corteza entorrinal, el hipocampo, la amígdala y las áreas neocorticales (Serrano-Pozo et al., 2011a; Karch et al., 2014; Scheltens et al., 2016; Winblad et al., 2016; Hane et al., 2017b; Kumar y Tsao, 2019). El curso clínico de la EA suele durar 4-8 años tras sus primeros signos, aunque se puede alargar hasta los 20 (Kumar y Tsao, 2019).

A pesar de la gravedad, prevalencia y coste sociosanitario de la EA, actualmente no existe ningún tratamiento farmacológico eficaz, que evite, o al menos retrase, la muerte neuronal progresiva que se produce en esta patología, y que se traduzca, por tanto, en una mejora de la calidad de vida del paciente y de sus familiares-cuidadores (Muñoz-Castro et al., 2020). Los fármacos que actualmente se usan para tratar a los pacientes con Alzheimer (inhibidores de la acetilcolinesterasa y un antagonista parcial de los receptores NMDA) son exclusivamente sintomáticos y producen un beneficio clínico limitado sólo en estadios iniciales de la enfermedad (Hane et al., 2017b; Kumar y Tsao, 2019). A pesar de los avances en técnicas médicas de imagen cerebral, el diagnóstico actual de la EA se realiza en base a la historia clínica y a los exámenes neuropsicológicos de los pacientes, tales como el MoCA (del inglés, *Montreal Cognitive Assessment*) o el MMSE (del inglés, *Mini-Mental State Examination*) (Hane et al., 2017b; Kumar y Tsao, 2019). Desafortunadamente, cuando la EA se diferencia del resto de demencias, el proceso patológico está muy avanzado y es irreversible (Hane et al., 2017b; Kumar y Tsao, 2019). Además, al no existir marcadores biológicos específicos de la enfermedad, no disponemos de pruebas *pre mortem* para su diagnóstico definitivo, que sólo se consigue tras el análisis neuropatológico *post mortem* del cerebro enfermo. Por tanto, resulta indispensable investigar con mayor profundidad los agentes causales de la patología, sus mecanismos moleculares y celulares, las estrategias diagnósticas tempranas y las posibles dianas terapéuticas que posibiliten el desarrollo de fármacos eficaces contra la misma.



1.2. Tipos de Alzheimer

Se distinguen dos tipos de EA, el Alzheimer familiar y el esporádico, que se diferencian en la edad de inicio, incidencia y etiología, pero que comparten la misma sintomatología y lesiones histopatológicas (Gomez-Isla et al., 2008; Perl, 2010; Ballard et al., 2011; Bagyinszky et al., 2014).

1.2.1. Alzheimer familiar

La EA familiar se manifiesta antes de los 60 años, generalmente entre los 35 y 40 años (Ringman et al., 2015), por lo que también se conoce como “Alzheimer presenil” o “de inicio temprano”. Representa únicamente entre el 1-3% de los casos de Alzheimer y se origina por mutaciones autosómicas dominantes (con un 100% de penetrancia) en los genes de la proteína precursora de amiloide (*APP*) y de las presenilinas 1 y 2 (*PSEN1* y *PSEN2*), localizados en los cromosomas 21, 14 y 1, respectivamente (Bertram et al., 2010; Karch et al., 2014; Calero et al., 2015; Hane et al., 2017a; Robinson et al., 2017; Kumar y Tsao, 2019). Estas proteínas están implicadas en la producción del péptido β -amiloide (A β): *PSEN1* y *PSEN2* forman parte del complejo γ -secretasa que interviene en el procesamiento de *APP*, proteína precursora de A β . Mutaciones en estas proteínas producen una acumulación anómala de A β 42, con gran tendencia a agregarse y formar placas. Hasta la fecha, se han descrito 62 mutaciones en *APP*, 306 en *PSEN1* y 56 en *PSEN2* causantes de EA familiar (Mutations. Alzforum, 2020).

1.2.2. Alzheimer esporádico

Esta variante representa la mayoría de los casos de EA (97-99%), y se conoce también como Alzheimer “de inicio tardío”, ya que suele manifestarse en personas mayores de 60 años. A diferencia de la EA familiar, su etiología es actualmente desconocida y se le otorga un origen multifactorial. El principal factor de riesgo es la edad; afecta al 3-4% de la población entre 65 y 74 años, y su incidencia aumenta exponencialmente con los años, llegando a afectar a un 32% de los mayores de 85 (Hebert et al., 2013; Alzheimer’s Disease International, 2019). Además, existen factores genéticos y ambientales implicados en su desarrollo (Ballard et al., 2011; Scheltens et al., 2016; Robinson et al., 2017; Kumar y Tsao, 2019).

- Factores genéticos

Se han identificado mediante estudios de asociación de genoma completo (GWAS; del inglés, *Genome wide association studies*) polimorfismos en más de 20 genes implicados en el inicio, progresión y severidad de la EA esporádica (Robinson et al., 2017; Sancesario y Bernardini, 2018; Kunkle et al., 2019). En general, estos genes participan en diferentes vías relacionadas con la patología, como el procesamiento y aclaramiento de A β (*ADAM10*, *APOE*, *CD33*, *CLU*, *CR1*, *SQRL1*, *PICALM*, *BIN1*, *ABCA7*, *CASS4*), la respuesta inmune e inflamatoria (*TREM2*, *TYROBP*, *CD33*, *CR1*, *APOE*, *MS4A*, *ABCA7*, *BIN1*, *EPHA1*, *CLU*, *HLA-DRB5/HLA-DRB1*, *INPP5D*, *CELF1*, *MEF2C*, *ADAMTS1*, *ABI3*, *PLCG2*, *MAF*, *ZCWPW1*), el metabolismo del colesterol (*APOE*, *SORL1*, *ABCA7* y *CLU*), la regulación de la endocitosis y del transporte vesicular (*BIN1*, *CD2AP*, *PICALM*,



EPHA1, *SORL1*), y la función del citoesqueleto y del transporte axonal (*NME8*, *CELF1* y *CASS4*), entre otras (Sancesario y Bernardini, 2018; Pimenova et al., 2018; Kunkle et al., 2019). La mayoría de ellos se expresan preferencialmente en células implicadas en la respuesta inflamatoria del sistema nervioso central (SNC), como la microglía y los astrocitos (Srinivasan et al., 2016; Hansen et al., 2018; Kunkle et al., 2019).

Los polimorfismos asociados a un mayor riesgo de EA esporádica se manifiestan en *APOE* (Apolipoproteína E) y *TREM2* (del inglés, *triggering receptor expressed on myeloid cells 2*) (Robinson et al., 2017). El gen *APOE* se localiza en el cromosoma 19, y codifica una proteína implicada en el transporte de colesterol, principalmente en forma de HDL, que se secreta predominantemente por células gliales (Leyns y Holtzman, 2017; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). Además de modular la homeostasis lipídica y proteica cerebral (Robinson et al., 2017), *APOE* interviene como chaperona en el metabolismo y aclaramiento de A β , dificultando su eliminación y/o estabilizando los depósitos fibrilares (Kim et al., 2014; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018; Kumar y Tsao, 2019). Se ha propuesto además que *APOE* participa en el proceso neuroinflamatorio (Yamazaki et al., 2019), en las alteraciones sinápticas (Yu et al., 2014), e incluso en la patología Tau y la neurodegeneración que se producen en la EA (Shi et al., 2017b; Yamazaki et al., 2019). Existen tres isoformas de *APOE*, $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ (la más común) y $\epsilon 4$ (Yu et al., 2014), con diferentes efectos en la homeostasis de A β (Robinson et al., 2017). $\epsilon 4$ representa, tras la edad, el principal factor de riesgo asociado al Alzheimer esporádico (Robinson et al., 2017; Kumar y Tsao, 2019). Los individuos con una copia de este alelo (14% de la población) incrementan su riesgo tres veces y, los homocigotos, 8-15 veces, debido a una mayor patogenicidad y/o una menor eficiencia en las diferentes vías homeostáticas (Yamazaki et al., 2019; Fernandez et al., 2019). Contrariamente, el alelo $\epsilon 2$ parece tener un papel protector contra el desarrollo de la EA (Conejero-Goldberg et al., 2014; Reiman et al., 2020).

TREM2 codifica un receptor transmembrana de superficie celular perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas, que en el SNC se expresa específicamente en microglía, participando en su activación, supervivencia y proliferación, así como en procesos de fagocitosis (Hickman y El Khoury, 2014; Ulland et al., 2017; Hansen et al., 2018). Distintas variantes de este gen, como R47H, se asocian a una pérdida de función microglial (Shi et al., 2018) y aumentan entre dos y cuatro veces el riesgo de padecer EA (Jonsson et al., 2013; Leyns y Holtzman, 2017; Hansen et al., 2018).

- Factores ambientales

La EA esporádica también se asocia a ciertos factores ambientales, considerados como factores de riesgo modificables. Entre ellos, se encuentran la obesidad, el estrés, la hipertensión, la inactividad física y mental, el bajo nivel educativo, la depresión, las enfermedades vasculares, el tabaco, los traumatismos cerebrales y la diabetes mellitus (Xu et al., 2015; Hane et al., 2017a; Robinson et al., 2017; Kivipelto et al., 2018; Serrano-Pozo y Growdon, 2019; Edwards et al., 2019).



Existen múltiples evidencias que implican al sistema vascular cerebral en la EA (Govindpani et al., 2019; Serrano-Pozo y Growdon, 2019); de hecho, los pacientes de Alzheimer tienen su red neurovascular y capilar mucho más reducida, y desarrollan angiopatía amiloide cerebral o CAA (del inglés, *cerebral amyloid angiopathy*), caracterizada por la presencia de depósitos de A β en los vasos sanguíneos cerebrales (Zuroff et al., 2017) que parecen contribuir al declive cognitivo típico de la enfermedad (Greenberg et al., 2020). Todo ello ha llevado a establecer la *hipótesis vascular* de la EA (de la Torre, 2018).

La diabetes mellitus también es un factor de riesgo para la EA (Salas y De Strooper, 2019), ya que la insulina modula la plasticidad sináptica, la memoria y el aprendizaje, y regula el metabolismo de A β y de Tau (Sato y Morishita, 2014). Además, en pacientes diabéticos son comunes los daños microvasculares (Domínguez et al., 2014).

El género femenino tiene mayor riesgo que el masculino de padecer Alzheimer esporádico, lo que se atribuye a diferencias biológicas, ambientales, sociales y culturales entre ambos sexos (Nebel et al., 2018).

Controlar los factores anteriormente expuestos, así como realizar actividades intelectuales y sociales, una actividad física regular y una dieta equilibrada pueden contribuir a reducir el riesgo de desarrollar Alzheimer esporádico (Kivipelto et al., 2018; Serrano-Pozo y Growdon, 2019).

2. RASGOS NEUROPATOLÓGICOS

El cerebro de los pacientes de Alzheimer presenta rasgos anatomopatológicos muy característicos (Perl, 2010; Scheltens et al., 2016) (Figura A.2).

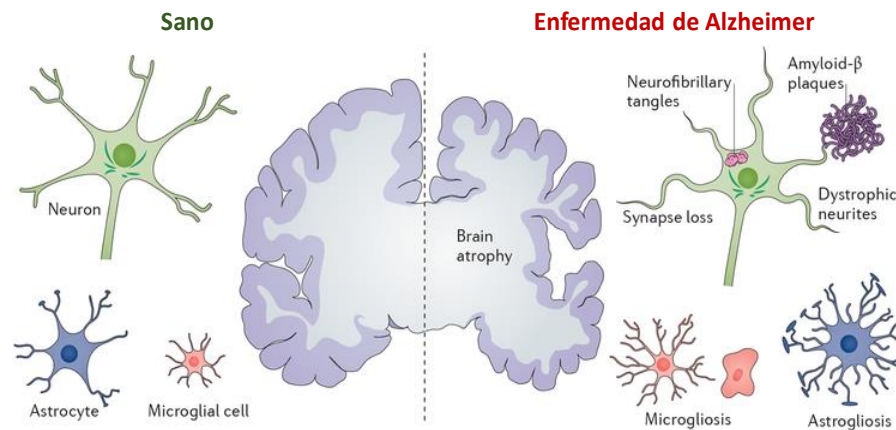


Figura A.2. Rasgos neuropatológicos de la EA. A nivel macroscópico, la enfermedad se caracteriza por atrofia cerebral asociada a la pérdida de sinapsis y neuronas. A nivel microscópico, los cerebros de pacientes de Alzheimer se caracterizan por la deposición de placas de A β y ovillos neurofibrilares de la proteína Tau hiperfosforilada, así como pérdida sináptica, degeneración neuronal y patología neurítica. Además, se produce una importante respuesta microglial y astrocítica. Imagen tomada de Congdon y Sigurdsson, 2018.



A nivel macroscópico, se produce una importante atrofia cortical (que afecta principalmente al lóbulo temporal medial), adelgazamiento de las circunvoluciones y ensanchamiento de los surcos, engrosamiento de las meninges, dilatación de las cavidades ventriculares, disminución del bulbo olfatorio y pérdida de peso y volumen cerebral (Serrano-Pozo et al., 2011a) (Figura A.3). También es frecuente encontrar algún tipo de patología cerebrovascular. Actualmente, existen técnicas de neuroimagen de alta resolución que permiten visualizar la atrofia cerebral incluso en etapas prodrómicas, y que pueden ser de gran utilidad para el diagnóstico y estudio de la evolución de la enfermedad (Drago et al., 2011; Kälin et al., 2017; Coupé et al., 2019; Gupta et al., 2019).

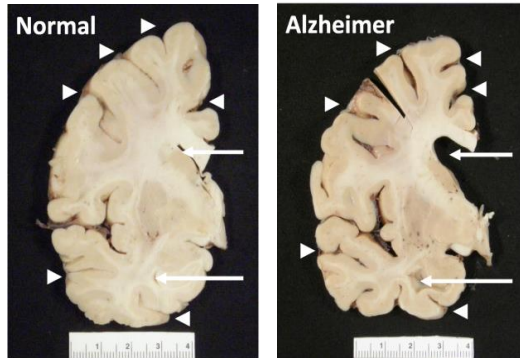


Figura A.3. Corte coronal de un hemisferio humano sano (izquierda) y de un paciente de Alzheimer (derecha). El cerebro afectado por la EA posee un menor volumen y ventrículos más dilatados. Esta atrofia afecta fundamentalmente a los lóbulos temporales, frontales, parietales y occipitales. Las regiones donde residen las funciones de memoria (hipocampo) y lenguaje (áreas de Broca y de Wernicke) son las más afectadas. Imagen tomada de DeTure y Dickson, 2019.

Por otro lado, las alteraciones microscópicas características de la EA son: (1) disminución de la densidad sináptica, degeneración neuronal y patología neurítica, (2) acumulación de proteínas extracelulares en forma de placas de péptido β -amiloide, (3) ovillos neurofibrilares intraneuronales de la proteína Tau hiperfosforilada (NFT; del inglés, *Neurofibrillary tangles*) (Gomez-Isla et al., 2008; Perl, 2010) y (4) proceso neuroinflamatorio mediado por células gliales (Serrano-Pozo et al., 2011a; Heneka et al., 2015; Zhang y Jiang, 2015) (Figura A.2).

Estas lesiones se manifiestan principalmente en áreas cerebrales implicadas en los mecanismos de memoria y aprendizaje, y en los procesos cognitivos focales. Las cortezas motora, visual y sensorial primarias sólo se alteran a veces y en estadios muy avanzados de la enfermedad (Thompson et al., 2003). Curiosamente, la propagación de los depósitos extracelulares de $A\beta$ sigue un patrón de distribución anatómico contrario (en cierto grado) al de la patología Tau (Jucker y Walker, 2011). La patología $A\beta$ comienza en el neocórtex, progresa hacia la allocorteza y, por último, se extiende a estructuras subcorticales (Jucker y Walker, 2011). Atendiendo a la localización de los ovillos neurofibrilares, los enfermos de Alzheimer se clasifican en seis estadios o etapas, que correlacionan altamente con el desarrollo de la enfermedad y se denominan **estadios de Braak** (Braak y Braak, 1991). De manera resumida, la patología Tau comienza en el locus coeruleus y la corteza entorrinal (Braak I-II), avanza hacia el hipocampo y la corteza asociativa (Braak III-IV), y afecta, en estadios posteriores, a las áreas sensoriales primarias (Braak V-VI) (Braak y Braak, 1991; Hane et al., 2017a; Gao et al., 2018) (Figura A.4).



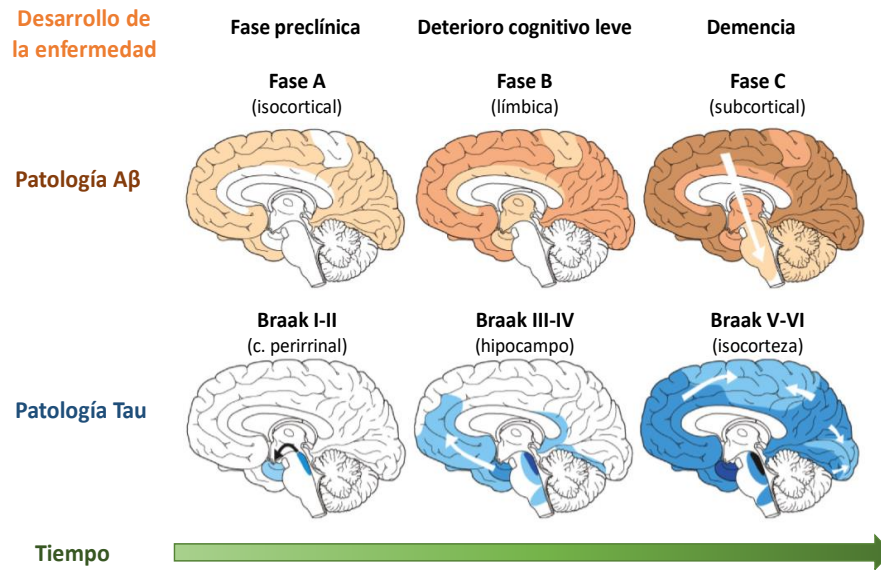


Figura A.4. La acumulación de Aβ y Tau sigue patrones característicos y predecibles en la progresión de la patología de Alzheimer. La deposición de placas de Aβ comienza en regiones isocorticales, progresa hacia zonas límbicas y, por último, se desarrolla en estructuras subcorticales. La patología Tau comienza en las regiones entorrinal y transentorrinal (Braak I y II) y, después se extiende al hipocampo (Braak III y IV) y, finalmente, a la isocorteza (Braak V y VI). La progresión de la agregación y deposición de Tau correlaciona altamente con el desarrollo de la enfermedad. Imagen modificada de Jucker y Walker, 2013.

2.1. Pérdida sináptica, neuronal y patología neurítica

En la enfermedad de Alzheimer se produce una pérdida importante de sinapsis y neuronas (Forner et al., 2017; Hane et al., 2017a), que afecta principalmente al hipocampo y a la neocorteza, y es responsable del declive cognitivo típico de esta enfermedad (Duyckaerts et al., 2009).

2.1.1. Disminución de la densidad sináptica

Estudios histológicos y bioquímicos han demostrado que en la corteza entorrinal e hipocampo de pacientes de EA, precediendo a la muerte neuronal, se produce una pérdida de un 25-35% de sinapsis (Gomez-Isla et al., 1996a; Price et al., 2001; Overk y Masliah, 2014; de Wilde et al., 2016). Dicho hallazgo es el que mejor correlaciona con los déficits cognitivos asociados a la patología (Forner et al., 2017; Colom-Cadena et al., 2020).

Numerosos estudios tratan de esclarecer las relaciones moleculares entre Aβ, Tau y las alteraciones sinápticas (Forner et al., 2017). Aunque Aβ participa de manera fisiológica en el desarrollo de las sinapsis, niveles elevados de este péptido disminuyen la excitabilidad neuronal y provocan la internalización de receptores AMPA, lo que facilita la depresión a largo plazo (LTD) e inhibe la potenciación a largo plazo (LTP), y, en consecuencia, media la pérdida de sinapsis electrofisiológicamente activas (Shankar et al., 2007; Viola y Klein, 2015; Chen, 2018). Por su parte, Tau, además de estabilizar los microtúbulos y regular el



transporte axonal también interviene en la función sináptica; las formas patológicas de Tau median la internalización de los receptores NMDA potenciando la LTD (Spires-Jones y Hyman, 2014), y alteran el tráfico de mitocondrias y receptores hacia las sinapsis, así como la señalización por calcio (Forner et al., 2017). Las formas solubles de A β y/o Tau, pero no las fibrilares y/o agregadas, son las causantes de los fallos sinápticos (Crimins et al., 2013; Spires-Jones y Hyman, 2014; Hane et al., 2017a; Forner et al., 2017; Gao et al., 2018).

También se ha propuesto que la microglía y los astrocitos, a través de una regulación positiva anormal del sistema del complemento, contribuyen a la pérdida de sinapsis y a la muerte neuronal (Castro-Gomez et al., 2019; Chew y Petretto, 2019).

2.1.2. Pérdida neuronal

En la EA se produce una degeneración neuronal selectiva que afecta de manera progresiva a regiones y tipos celulares concretos (Duyckaerts et al., 2009; Jeong, 2017), fundamentalmente a la región CA1 del hipocampo (Price et al., 2001) y a la capa II de la corteza entorrinal (Gomez-Isla et al., 1996a; Price et al., 2001), pero también al bulbo y al núcleo olfatorio anterior (ter Laak et al., 1994), a la amígdala (Vereecken et al., 1994), al núcleo basal de Meynert (Vogels et al., 1990; Jeong, 2017), a la parte medial de la sustancia negra, a la parte rostral del locus coeruleus (Theofilas et al., 2017) y al núcleo del rafe serotoninérgico (Aletrino et al., 1992; Duyckaerts et al., 2009). La pérdida de sustancia gris afecta primero y de manera importante al hipocampo y a la corteza entorrinal. Más tarde, el déficit se extiende a la corteza temporal y frontal, y finalmente, a las cortezas sensoriomotora y visual (Thompson et al., 2003).

En los mecanismos de muerte neuronal están implicados tanto A β como Tau (Duyckaerts et al., 2009; Spires-Jones y Hyman, 2014), así como las especies reactivas de oxígeno, las alteraciones mitocondriales, la sobreactivación de receptores de glutamato y el incremento en la concentración citoplasmática de iones calcio (Jeong, 2017).

2.1.3. Patología neurítica

Las neuritas distróficas asociadas a las placas seniles aparecen de manera temprana en la EA contribuyendo de manera significativa a la patología en los estadios preclínicos, antes de que se produzca la pérdida sináptica y neuronal (Masliah et al., 1991b; Dickson et al., 1999; Torres et al., 2012; Sanchez-Varo et al., 2012). Son prolongaciones neuronales engrosadas producidas por alteraciones del citoesqueleto que contienen numerosas vesículas donde se acumula, entre otros, APP, BACE1 (del inglés, *β -site APP cleaving enzyme 1*) y γ -secretasa, y especies tóxicas solubles de Tau hiperfosforilado (Nixon y Yang, 2011; Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012). En la EA, las distrofias son abundantes en los sistemas fibrosos del hipocampo, la región CA1 y la corteza entorrinal (Sanchez-Varo et al., 2012).



2.2. Patología amiloide

Una de las lesiones microscópicas más características del cerebro de pacientes de Alzheimer son las placas amiloides o seniles, ya descritas por Alois Alzheimer en 1907. Son agregados proteicos insolubles y extracelulares localizados en el parénquima cerebral y en la pared de los vasos sanguíneos, cuyo componente principal es el péptido A β (Kumar y Tsao, 2019). Este péptido, que deriva del procesamiento proteolítico de la proteína precursora del péptido β -amiloide (APP) (De Strooper, 2010; Hane et al., 2017a) (Subapartado 2.2.2.1.), se genera de forma fisiológica y circula a baja concentración en plasma y en líquido cefalorraquídeo (LCR) de individuos sanos. De hecho, existen depósitos de A β insoluble en el parénquima cerebral y en la pared de los vasos sanguíneos cerebrales de personas sanas con edad avanzada (Selkoe, 2004; Gomez-Isla et al., 2008; Rodrigue et al., 2012).

Numerosas investigaciones tratan de aclarar el papel fisiológico de A β . Se ha propuesto que podría regular la liberación de vesículas en terminales presinápticas excitatorias (Abramov et al., 2009), y actuar como modulador postsináptico negativo (Palop y Mucke, 2010), ya que concentraciones picomolares de A β mejoran la plasticidad sináptica y la memoria (Puzzo et al., 2008; Morley et al., 2010). Además, se ha asignado a los monómeros de A β un papel neuroprotector (Giuffrida et al., 2009), propiedades antioxidantes, y funciones como regulador del transporte de colesterol y como factor transcripcional (Sikanyika et al., 2019).

El péptido A β es una proteína desordenada de pequeño tamaño (4 kDa), constituida por 39-43 aminoácidos (Macleod et al., 2015; Hane et al., 2017a). En condiciones fisiológicas, más del 90% de las especies de A β están en forma de A β 40 (soluble), con 40 aminoácidos y Val40 en su extremo C-terminal, y menos del 10% como A β 42, con los aminoácidos adicionales Ile41 y Ala42, que le confieren mayor hidrofobicidad y capacidad de agregación (Wolfe y Guenette, 2007; Hiltunen et al., 2009; De Strooper, 2010; Zhang et al., 2011a). Sin embargo, en pacientes de EA, aumenta la relación A β 42/A β 40 (Hane et al., 2017a; Hillen, 2019), siendo A β 42 el componente mayoritario y más tóxico de las placas (Hane et al., 2017a; Kumar y Tsao, 2019).

2.2.1. Agregación del péptido A β

Los mecanismos por los que se agregan las distintas formas de A β y se forman las placas extracelulares no están claramente definidos. Se postula que a partir de A β monomérico con estructura aleatoria, se producen de manera secuencial monómeros parcialmente plegados en forma de horquilla (Choi y Ganchi, 2018), seguido de la dimerización de dos monómeros (Hane et al., 2017a). Posteriormente, los dímeros se agregan para generar formas intermedias oligoméricas solubles, de entre 8 KDa (dímeros) y 100 KDa (Shankar et al., 2008; Sakono y Zako, 2010), que finalmente originan las fibras y las placas amiloides o seniles (Takahashi et al., 2017; Hane et al., 2017a; Kumar y Tsao, 2019). Por otra parte, también se contemplan las placas como entes dinámicos liberadores de formas oligoméricas solubles y tóxicas de A β (Martins et al., 2008; Koffie et al., 2009), que, al tener distintas estructuras y



toxicidad, podrían explicar la gran diversidad de manifestaciones y síntomas de los pacientes de Alzheimer (Hane et al., 2017a).

El término oligómero se refiere a una agrupación de proteínas solubles mal plegadas con tamaños de dímeros a protofibras (Choi y Gandhi, 2018). Se han descrito múltiples formas oligoméricas, con capacidad de difundir por el parénquima cerebral y provocar un efecto tóxico a nivel sináptico y neuronal (Haass y Selkoe, 2007; Viola y Klein, 2015; Choi y Gandhi, 2018). Numerosos trabajos han demostrado que el tamaño de los agregados de A β es un determinante crítico de su toxicidad (Ladiwala et al., 2012); así, por ejemplo, los trímeros tienen una toxicidad tres veces mayor que los monómeros, mientras que los tetrameros tienen una toxicidad 13 veces mayor (Hane et al., 2017a). Entre los distintos mecanismos deletéreos, los oligómeros parecen inhibir la LTP en el hipocampo, interfiriendo en la señalización de los receptores NMDA o AMPA (Haass y Selkoe, 2007; Viola y Klein, 2015; Hane et al., 2017a). Además, alteran la membrana neuronal y glial (permeabilidad, canales iónicos y vías de señalización), lo que perturba la homeostasis del calcio y desencadena estrés oxidativo, cascadas inflamatorias, disfunción mitocondrial y modificación de la estructura del ácido desoxirribonucleico (ADN) (Haass y Selkoe, 2007; Viola y Klein, 2015; Hane et al., 2017a).

Las placas amiloides están compuestas principalmente por péptidos de A β insolubles (Glenner y Wong, 1984; Masters et al., 1985), aunque también pueden contener proteoglicanos, moléculas inflamatorias, proteasas, iones metálicos, APOE, proteínas antioxidantes, colinesterasas y restos de neuronas y células gliales (Atwood et al., 2002). Se clasifican en dos grandes grupos según su morfología, composición, y presencia o ausencia de distrofias neuríticas asociadas (Figura A.5):

- **Placas neuríticas:** depósitos extracelulares de A β de aspecto filamentoso, llamadas así porque suelen aparecer íntimamente asociadas a neuritas distróficas, y a células microgliales reactivas, mientras que la astrogliosis se localiza en la periferia (Dickson, 1997; Duyckaerts et al., 2009; Bouvier et al., 2016). Atendiendo a la morfología que presenten, se subdividen en dos tipos (Selkoe, 2001; Fiala, 2007; Perl, 2010):
 - Placas clásicas: se asocian normalmente a los vasos sanguíneos, y poseen un núcleo amiloide redondo y compacto formado por A β fibrilar y células microgliales, rodeado por un halo difuso de especies solubles de A β .
 - Placas primitivas: con forma esférica e inmunotinción homogénea, sin núcleo compacto central, que suelen aparecer en zonas cercanas a axones y sinapsis.
- **Placas difusas:** también llamadas “pre-amiloides”, son depósitos extracelulares no fibrilares (no congofílicos) de A β . Poseen una estructura amorfa o difusa, con límites poco definidos y sin núcleo compacto apreciable. Apenas poseen células microgliales, astrocitos o neuritas distróficas (Selkoe, 2001) y su composición principal es A β 42 (Perl, 2010).



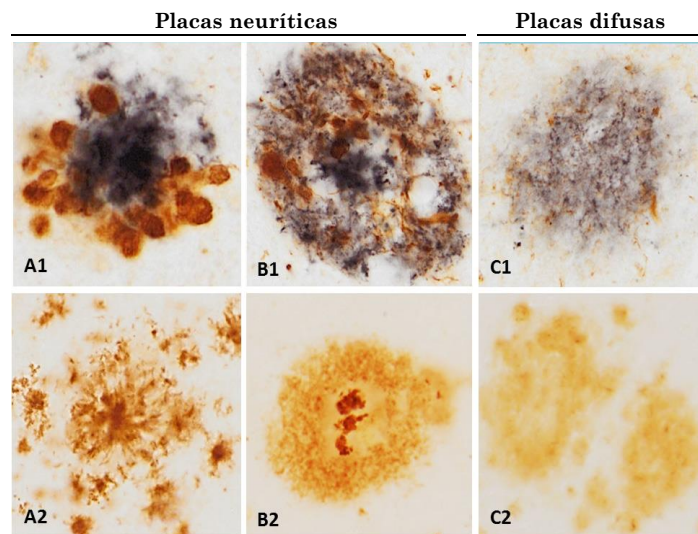


Figura A.5. Clasificación de las placas amiloides. Las placas neuríticas pueden ser de tipo fibrilar (o placas primitivas) (A1 y A2), o clásicas (B1 y B2) con núcleo denso compuesto principalmente por A β 42 (B2) y un halo difuso. Las placas difusas (C) no provocan distrofias neuríticas (C1) y presentan una morfología indefinida (C2). (A1, B1, C1) Inmunohistoquímica doble para A β (azul) y fosfo-Tau (marrón); (A2, B2, C2) Inmunotinción simple para A β 42. Imágenes cedidas por el grupo de la Dra. Antonia Gutiérrez.

El péptido A β , además de formar placas y oligómeros solubles extracelulares, también aparece en el citosol y en diferentes compartimentos subcelulares de las neuronas (mitocondria, lisosomas y retículo endoplasmático) (Sun et al., 2015b), alterando su funcionalidad (Kuruva y Reddy, 2017). El A β puede acumularse intraneuronamente por fallos en la liberación tras su síntesis (Takahashi et al., 2017), o por reinternalización a través de receptores extracelulares específicos (Bi et al., 2002; Zerbinatti et al., 2006). La acumulación de A β intracelular parece ser un acontecimiento temprano en la EA (Bayer y Wirths, 2010), ya que se manifiesta en células piramidales del hipocampo y de la corteza entorrinal de pacientes con defectos cognitivos leves, y sus niveles descienden con la formación de las placas (LaFerla et al., 2007). El A β dentro de la neurona podría alterar la función mitocondrial y del proteasoma, provocar una disfunción sináptica, potenciar la hiperfosforilación de Tau (LaFerla et al., 2007), originar déficits en la LTP (Billings et al., 2005) e incluso la muerte neuronal (Bayer y Wirths, 2010).

Se han realizado numerosos ensayos clínicos de inmunización activa y pasiva con diferentes anticuerpos monoclonales contra A β (Briggs et al., 2016; Cummings et al., 2019), aunque hasta la fecha, ninguno ha mostrado adecuada seguridad y/o eficacia (Mullard, 2019).



2.2.2. Acumulación patológica de A β

Aunque no se conoce en detalle el mecanismo de formación de las placas, la acumulación de A β (especialmente A β 42) parece ser limitante en dicho proceso. Además, podrían participar formas oligoméricas y fibras de A β , así como algunos complejos como los formados por APOE-A β (Thal et al., 2006). Por lo tanto, resulta fundamental conocer en detalle los mecanismos de producción, degradación y aclaramiento de las distintas isoformas de A β , cuyo desequilibrio parece originar su acumulación defectuosa (Thal et al., 2006; Duyckaerts et al., 2009; Baranello et al., 2015; Hane et al., 2017a).

2.2.2.1. Procesamiento de APP y producción de A β

APP es una glicoproteína integral de membrana de tipo I, muy conservada evolutivamente, que contiene un largo ectodominio globular (N-terminal) en el espacio extracelular, un único segmento transmembrana y un pequeño dominio citosólico (C-terminal) (Nguyen, 2015). Su gen se localiza en el cromosoma 21 (Kumar y Tsao, 2019), y está constituido por 18 exones que originan 10 isoformas alternativas de entre 563 y 770 aminoácidos (Evin y Weidemann, 2002; Hane et al., 2017a). La isoforma APP695 se expresa predominantemente en neuronas (Haass et al., 1991) y, por tanto, es la mayoritaria en el SNC (Giri et al., 2016; Müller et al., 2017b).

Además de ser precursora del péptido A β , la proteína APP posee otras funciones fisiológicas menos conocidas (Müller et al., 2017b; Hane et al., 2017a): participa en procesos de adhesión y señalización celular (Wolfe y Guenette, 2007), transporte de metales, unión a matriz extracelular, crecimiento de neuritas y del cono axónico neuronal, migración neuronal, homeostasis del calcio, LTP y señalización intracelular (Hoe y Rebeck, 2008; Hiltunen et al., 2009; Müller et al., 2017b). También se le han asignado propiedades neuroprotectoras, antioxidantes y tróficas (Rajendran y Annaert, 2012; Nguyen, 2015; Tatarnikova et al., 2015; Andreeva et al., 2017; Hane et al., 2017a).

Se han descrito 62 mutaciones en el gen APP relacionadas con las formas familiares de la EA (Mutations. Alzforum, 2020), que pueden aumentar los niveles de A β 42, disminuir los de A β 40, aumentar la patogenicidad de A β , su capacidad de agregación y de formación de fibras (Macleod et al., 2015; Musiek y Holtzman, 2015; Tatarnikova et al., 2015). Curiosamente, la mutación A673T en APP reduce la producción de A β y su agregación, proporcionando protección contra el declive cognitivo asociado a la edad (Karran y De Strooper, 2016; Selkoe y Hardy, 2016).

La proteína APP sufre diversas escisiones proteolíticas tanto a través de las vías canónicas (rutas amiloidogénica y no amiloidogénica) como de las no canónicas (Andrew et al., 2016), en las que están implicadas diversas enzimas como las caspasas, meprina, δ -secretasa y η -secretasa. A continuación, se describen las 2 rutas clásicas para el procesamiento post-traduccional de APP (Zhang et al., 2011a; Rajendran y Annaert, 2012; Hane et al., 2017a; Kumar y Tsao, 2019) (Figura A.6).



A. Ruta no amiloidogénica

Es la ruta principal en la mayoría de las células, ocurre mayoritariamente en la membrana plasmática y no produce A β , ya que implica una proteólisis en el interior de la región que contiene dicho péptido.

En primer lugar, se produce la fragmentación de APP entre los aminoácidos 16 y 17 por acción de la α -secretasa, enzima anclada a la membrana perteneciente a la familia de las desintegrinas y metaloproteasas (ADAM; del inglés, *A desintegrin and metalloprotease*), liberándose un fragmento soluble denominado sAPP α , al que se le atribuyen propiedades neurotróficas y neuroprotectoras (De Strooper, 2010; Jeong, 2017). Además, se genera un fragmento C-terminal (APP-CTF) de 83 aminoácidos, que permanece anclado a la membrana, al que se le conoce como C83. C83 es sustrato del complejo γ -secretasa, que lo escinde en el interior de la membrana entre los aminoácidos 711 y 713, originando los péptidos p3 (A β 17-40 y A β 17-42) que se liberan al espacio extracelular o vesicular, y un dominio AICD citosólico (p7), al que se le han atribuido propiedades neurotóxicas, funciones en la homeostasis del calcio y en la regulación de la transcripción génica (De Strooper, 2010; Zhang et al., 2011a; Jeong, 2017; Wilkins y Swerdlow, 2017).

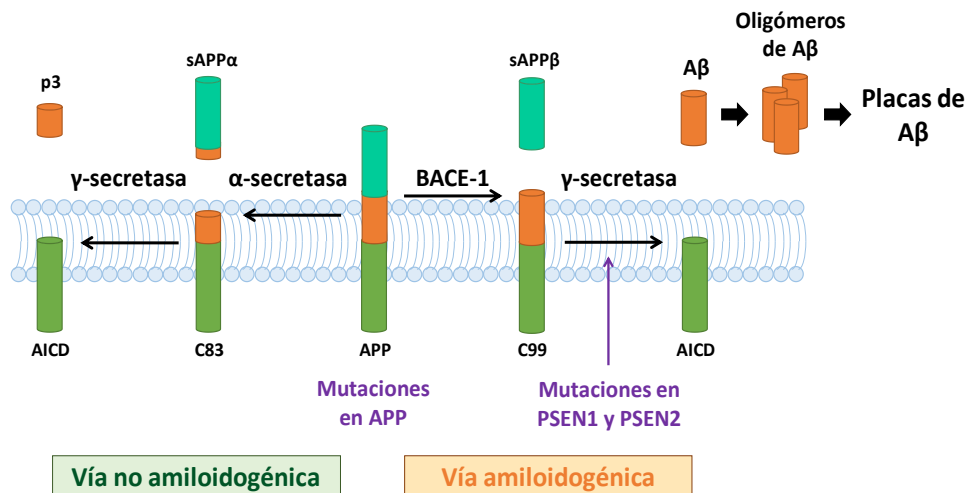


Figura A.6. Procesamiento de la Proteína Precursora Amiloide (APP). Esquema explicativo de las rutas amiloidogénica y no amiloidogénica. En la vía no amiloidogénica, el metabolismo del APP se produce mediante la actividad secuencial de la α -secretasa y γ -secretasa, que generan sAPP α , p3 y AICD. En la vía amiloidogénica, el procesamiento del APP se lleva a cabo por la acción β -secretasa de BACE-1, primero, y por la γ -secretasa, después, generándose los fragmentos sAPP β , AICD y el péptido A β . Este último se acumula en el medio extracelular, se agrega y forma las placas seniles características de la EA. Modificado de Muñoz-Castro et al., 2020.

B. Ruta amiloidogénica

Esta ruta alternativa de procesamiento de APP es minoritaria en la mayoría de las células, excepto en las neuronas, y produce péptidos A β . Aunque la vía está activa de forma fisiológica durante el envejecimiento normal, se potencia en la EA. A diferencia de la ruta no amiloidogénica, ocurre principalmente en endosomas (Zhou et al., 2018).



La ruta comienza con la acción de la β -secretasa, atribuida a la enzima **BACE-1**, una aspartil proteasa transmembrana presente principalmente en endosomas y aparato de Golgi de las neuronas (Vassar et al., 2009). La β -secretasa escinde a APP entre Met671 y Asp672, liberando al espacio extracelular APP soluble β (sAPP β), más pequeño que sAPP α pero también con funciones neuroprotectoras (Jeong, 2017), y un fragmento C-terminal (APP-CTF) de 99 aminoácidos, conocido como C99. C99 permanece anclado a la membrana y es procesado por el complejo γ -secretasa entre los aminoácidos 711 y 713, generando el péptido A β (de 39-43 aminoácidos) que se libera al medio extracelular, y AICD (Rajendran y Annaert, 2012; Selkoe, 2001; Zhou et al., 2018). El procesamiento proteolítico del sAPP β origina N-APP, que parece estar implicado en procesos de degeneración axonal y neuronal (Nikolaev et al., 2009; De Strooper, 2010; Jeong, 2017). Se ha propuesto que los oligómeros solubles de A β podrían ser los responsables iniciales de los procesos neurodegenerativos en la EA, potenciando la actividad neurotóxica de N-APP y AICD, y/o antagonizando las funciones protectoras de sAPP α , sAPP β y AICD (Jeong, 2017).

En ambas rutas, participa el complejo γ -secretasa, cuyo centro catalítico está constituido por PSEN1 o PSEN2, proteínas transmembrana con actividad proteasa (De Strooper, 2010; Andreeva et al., 2017; Wolfe, 2019). Las presenilinas tienen como principales sustratos a Notch y APP (Cai et al., 2015), y participan, además de en el procesamiento de APP, en el control de la apoptosis, la homeostasis del calcio, el crecimiento neurítico, la plasticidad sináptica, las rutas autofágicas/lisomales, el tráfico de proteínas y la señalización mediada por β -catenina (Lee et al., 2010, De Strooper et al., 2012). Hasta la fecha, se han identificado 306 mutaciones en el gen de PSEN1 y 56 en el de PSEN2 que producen EA familiar (Mutations. Alzforum, 2020). Todas implican una ganancia de función del complejo γ -secretasa, y producen un aumento de A β 42 y una disminución de A β 40.

Aunque BACE-1 y γ -secretasa se han considerado posibles dianas terapéuticas en la EA, los ensayos clínicos realizados hasta el momento con inhibidores o moduladores negativos de estas enzimas no han desvelado una adecuada relación riesgo-beneficio (Briggs et al., 2016; Chen et al., 2017; Long y Holtzman, 2019; Imbimbo y Watling, 2019).

2.2.2.2. Degradación y/o aclaramiento de A β

Aunque las mutaciones asociadas a la EA familiar aumentan la producción de A β 42, en los pacientes de Alzheimer esporádico las especies de A β se acumulan debido a la disminución en su degradación y/o en su aclaramiento (Duyckaerts et al., 2009; Miners et al., 2014; Hane et al., 2017a).

El péptido A β puede pasar a la circulación periférica a través de: (i) la barrera hematoencefálica (BHE), tras su interacción con el receptor de LDL (LRP1; del inglés, *low-density lipoprotein receptor related protein-1*) (Deane et al., 2009; Storck et al., 2016); (ii) el drenaje perivascular (Weller et al., 2008), y/o (iii) el sistema linfático (Nedergaard, 2013), gracias a los pies de los astrocitos localizados alrededor de los vasos sanguíneos (Ries y Sastre, 2016; Zenaro et al., 2017; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). Las células gliales, mediante la liberación de



chaperonas extracelulares, también facilitan el aclaramiento de A β a través de la BHE (Ries y Sastre, 2016). La mayoría de estas chaperonas se producen por los astrocitos, siendo las más relevantes la apolipoproteína E (APOE), la Apolipoproteína J (APOJ o Clusterina), la α 1-antichimiotripsina (ACT) y la α 2-macroglobulina (α 2-M).

La degradación de A β puede realizarse por un amplio rango de proteasas y/o por vías de aclaramiento no proteolíticas (Sikanyika et al., 2019). Entre las enzimas que participan en la degradación de A β destacan:

- Metaloendopeptidasas: principalmente NEP (neprelisina) e IDE (enzima degradadora de insulina), implicadas en la degradación de A β monomérico (Ries y Sastre, 2016). Durante el envejecimiento, se produce una disminución de los niveles de NEP (Farris et al., 2007; Tarasoff-Conway et al., 2015), que podría ser responsable del aumento de A β con la edad. También se han implicado a ECE-1 y a ECE-2 (enzimas convertidoras de endotelina) en la degradación de A β (Pacheco-Quinto y Eckman, 2013), aunque su participación en humanos no está del todo claro.
- Metaloproteinasas de matriz (MMPs), expresadas y secretadas principalmente por astrocitos, que participan en la degradación extracelular de formas monoméricas y fibrilares de A β (Ries y Sastre, 2016; Acosta et al., 2017).
- Peptidasas lisosomales: catepsinas B y D. Son cistein-proteasas que degradan proteínas que han entrado en la vía endo-lisosomal (Mueller-Steiner et al., 2006; De Strooper, 2010). La catepsina B transforma grandes agregados de A β en especies más pequeñas, menos tóxicas y con mayor afinidad por IDE y NEP (Mueller-Steiner et al., 2006; De Strooper, 2010; Ries y Sastre, 2016).

Respecto a las vías no proteolíticas, la microglía y los astrocitos participan de manera activa en la internalización de A β mediante mecanismos de pinocitosis, fagocitosis y/o endocitosis mediada por receptores (Lee y Landreth, 2010; Ries y Sastre, 2016), entre los que destacan los *scavenger receptors*, *toll-like receptors* (TLR), RAGE, receptores Fc (FcRs), TREM2, LIG3, y receptores de lipoproteínas (LRP). Así, el péptido A β se somete pues a varios sistemas de degradación intracelulares: autofagia (Nixon y Yang, 2011; Friedman et al., 2015), degradación endosomal/lisosomal y sistema ubiquitina-proteasoma (Baranello et al., 2015).

2.2.3. Hipótesis de la cascada amiloide

En base a las mutaciones encontradas en pacientes con Alzheimer familiar, se planteó la llamada “Hipótesis de la Cascada Amiloide”, la más aceptada en la actualidad para explicar la etiología de esta demencia. Esta hipótesis propone que el péptido A β es el agente causante (o desencadenante) de la patología de Alzheimer y que, como consecuencia de su deposición, se originan los ovillos neurofibrilares, la pérdida sináptica, la muerte neuronal, y la neuroinflamación, responsables en conjunto de la demencia típica de la enfermedad (Hardy y Higgins, 1992). Desde que se propuso esta hipótesis en 1992, ha ido sufriendo diversas modificaciones, como la que plantea que las especies solubles de A β , y no las placas, son las principales



responsables de la neurodegeneración, puesto que correlacionan mejor con los síntomas y severidad de la EA (Ricciarelli et al., 2017; Cline et al., 2018). Entre las principales razones para apoyar esta hipótesis destaca el hecho de que todas las mutaciones conocidas causantes de Alzheimer familiar están relacionadas con la producción y procesamiento de A β , y aumentan la razón A β 42/A β 40 (Rosenberg et al., 2016). Además, numerosas personas con síndrome de Down (con trisomía del cromosoma 21, donde se localiza el gen para APP) padecen síntomas tempranos (a los 30-40 años de edad) de EA. En tercer lugar, los animales transgénicos con mutaciones humanas de EA familiar en APP y PSEN1 desarrollan placas amiloides, pérdida sináptica y síntomas asociados a la EA, como problemas de memoria (Howlett et al., 2009; Sanchez-Varo et al., 2012). Además, se ha demostrado que la deposición de A β en el cerebro ocurre décadas antes de que aparezcan los síntomas clínicos (Gao et al., 2018).

Sin embargo, actualmente se está cuestionando la hipótesis de la cascada amiloide. Un motivo importante es que el patrón de deposición de A β es contrario (en cierto grado) al de la patología Tau (Jucker y Walker, 2011), que, como hemos comentado, correlaciona anatómicamente con la neurodegeneración (Hane et al., 2017b). Por tanto, en contra de lo defendido en la hipótesis de la cascada amiloide, en la EA las placas no son el principal agente causal de las alteraciones sinápticas, la neurodegeneración y la respuesta inflamatoria (Ricciarelli et al., 2017; Makin, 2018; Cline et al., 2018). De hecho, existen depósitos de A β insolubles en el parénquima cerebral y en la pared de los vasos sanguíneos cerebrales de personas sanas con edad avanzada (Selkoe, 2004; Gomez-Isla et al., 2008; Rodrigue et al., 2012). Otro aspecto a considerar es que, a pesar de la importancia de A β en la EA familiar, el 97-99% de los casos de EA son esporádicos y parecen tener distinta etiología y evolución patológica. Además, los modelos animales con mutaciones en APP y PSEN1, a pesar de tener patología A β no desarrollan ovillos neurofibrilares (Howlett et al., 2009), por lo que no reproducen la EA en su totalidad (Radde et al., 2006). De hecho, la mayoría de las estrategias terapéuticas ensayadas para la EA se han dirigido contra la patología A β (Yiannopoulou y Papageorgiou, 2020), y aunque muchas consiguen disminuir los niveles de este péptido, ninguna ha mostrado beneficios cognitivos en los pacientes (Makin, 2018). En resumen, existen múltiples factores que cuestionan la validez de la hipótesis de la cascada amiloide y sugieren que la acumulación de A β puede ser más consecuencia que causa de la EA (Krstic y Knuesel, 2013), lo que refuerza otras hipótesis alternativas para explicar el desarrollo de la enfermedad, como las basadas en la respuesta inmune y glial.



2.3. Patología neurofibrilar y proteína Tau

Además de las placas seniles, Alois Alzheimer también describió como lesión característica del cerebro de pacientes de EA los ovillos neurofibrilares, formados a partir de la proteína Tau hiperfosforilada.

2.3.1. Estructura y función de Tau

Tau es una proteína soluble expresada predominantemente en neuronas que pertenece a la familia de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs; del inglés, *Microtubule associated proteins*) (Hane et al., 2017a; Chen, 2018). Está codificada por el gen *MAPT*, que contiene 16 exones y se localiza en el cromosoma 17 (Gao et al., 2018). Mediante *splicing* alternativo se pueden generar 6 isoformas de Tau con tamaños comprendidos entre 352-441 aminoácidos (Iqbal et al., 2016; Holtzman et al., 2016; Li y Götz, 2017). Cada isoforma se caracteriza por la ausencia o presencia de 1 o 2 fragmentos (N) de 29 aminoácidos en el extremo N-terminal (0N, 1N, 2N), y de una secuencia (R) de 31-32 aminoácidos que se repite 3 ó 4 veces en el extremo C-terminal y que constituye el “dominio de unión a microtúbulos” (3R o 4R) (Gao et al., 2018). Así pues, las isoformas de Tau pueden ser: 0N3R, 0N4R, 1N3R, 1N4R, 2N3R o 2N4R (Figura A.7), siendo esta última la de mayor longitud (441 aminoácidos, Kimura et al., 2014). En el cerebro humano sano existen cantidades similares de Tau 3R y 4R, pero esta relación suele cambiar en enfermedades neurodegenerativas (Gao et al., 2018).

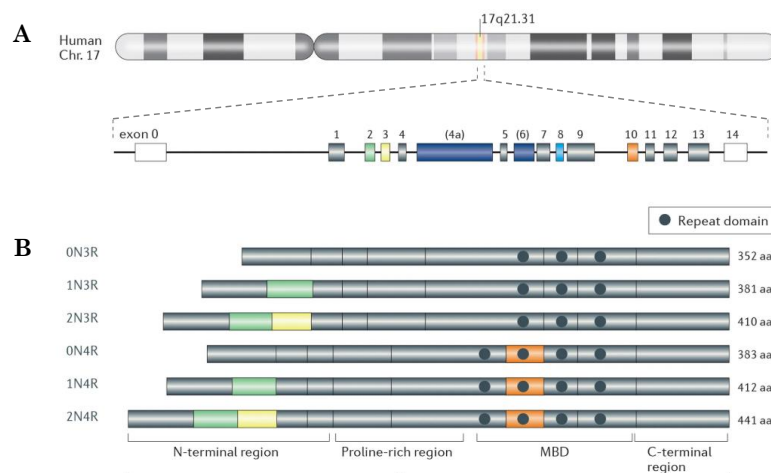


Figura A.7. Esquema del gen MAPT y de las diferentes isoformas de la proteína Tau. (A) El gen MAPT, localizado en el cromosoma 17, tiene 16 exones. Los exones 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 y 13 constituyen el componente básico de la proteína Tau en el SNC humano. Los exones 2, 3 y 10 presentan un *splicing* alternativo. Los exones 0 y 14 son no codificantes (blanco). Los exones 4a y 6 (azul) se transcriben sólo en el sistema nervioso periférico, mientras que el 8 (celeste) no se ha reportado en ninguna isoforma hasta el momento. (B) La isoforma de Tau está compuesta por 4 áreas: una región N-terminal, un dominio rico en prolina, un dominio de unión a microtúbulos y una región C-terminal. En el SNC, pueden generarse 6 isoformas principales de Tau mediante *splicing* alternativo de los exones 2, 3 y 10. 1N está codificado por el exón 2 (verde), mientras que 2N necesita también la presencia del exón 3 (amarillo). La repetición R2, que da lugar a las isoformas 4R, está codificada por el exón 10 (naranja). Imagen modificada de Li y Götz, 2017.



La función principal de Tau es regular la estructura y dinámica de los microtúbulos neuronales y favorecer su polimerización (Scholz y Mandelkow, 2014; Gao et al., 2018), por lo resulta indispensable en la formación y estabilidad del citoesqueleto (Hane et al., 2017a; Chen, 2018; Kumar y Tsao, 2019). Además, Tau participa en procesos de señalización, en el transporte axonal y en la regulación sináptica (Spires-Jones y Hyman, 2014; Gao et al., 2018). Recientemente se ha implicado a Tau en nuevas funciones tales como el mantenimiento de la integridad del ácido desoxirribonucleico (ADN), la regulación de la actividad neuronal, la neurogénesis, el tráfico de hierro y la LTD (Gao et al., 2018).

2.3.2. Fosforilación de Tau

Tau posee 80 residuos de serina o treonina y 5 de tirosina susceptibles de ser fosforilados, la mayoría localizados alrededor del dominio de unión a microtúbulos. En el cerebro sano, existe un equilibrio entre fosforilaciones y desfosforilaciones de Tau necesario para poder realizar sus funciones fisiológicas (Gao et al., 2018). Sin embargo, la hiperfosforilación anómala de Tau modifica su estructura, dificultando su unión a microtúbulos y, con ello, el ensamblaje de los mismos, lo que origina agregados intracelulares que interrumpen el transporte axonal y provocan, en última instancia, disfunción neuronal (Scholz y Mandelkow, 2014; Gao et al., 2018).

El estado de fosforilación de cualquier proteína depende de la actividad de las quinasas y fosfatasa que actúan sobre ella (Chen, 2018; Gao et al., 2018). Existen más de 20 enzimas con actividad quinasa, entre las que destacan GSK-3 β (*glycogen synthase kinase 3*) y Cdk5 (*Cyclin dependent kinase 5*) (Ballatore et al., 2007; Kolarova et al., 2012; Gendreau y Hall, 2013; Kimura et al., 2014), y varias fosfatasa, principalmente, PP2A y PP1 (Liu y Götz, 2013; Gao et al., 2018), implicadas todas en el estado de fosforilación de Tau. Además, el estrés oxidativo y/o los altos niveles de A β , pueden desregular la actividad de las quinasas de Tau (Moore et al., 2015). Tau también puede sufrir otras modificaciones postraduccionales que afectan a su estado de agregación, como glicosilación, acetilación o ubiquitinación (Iqbal y Grundke-Iqbal, 2008; Wang et al., 2013; Gao et al., 2018).

2.3.3. Ovillos neurofibrilares de Tau

Los ovillos neurofibrilares son agregados intracelulares, formados por filamentos helicoidales, cuyo componente mayoritario es la proteína Tau hiperfosforilada (Spillantini y Goedert, 2013; Kumar y Tsao, 2019). Su densidad se correlaciona directamente con la severidad y progresión de la patología de Alzheimer (Iqbal et al., 2016; Hane et al., 2017a).

Cuando Tau se hiperfosforila, se disocia de los microtúbulos y pasa de tener una localización principalmente axonal, a situarse en el soma y en las dendritas. Posteriormente, se autoagrega formando pares de filamentos helicoidales (PHF) que, a su vez, constituyen las unidades estructurales de los ovillos neurofibrilares intracelulares (NFT; del inglés, *Neurofibrillary tangles*) característicos de la EA (Ballatore et al., 2007; Spillantini y Goedert, 2013; Gao et al., 2018; Hane et al., 2017a). Estos agregados de Tau hiperfosforilado pueden acumularse, además de en



el soma neuronal como NFT, en los procesos dendríticos en forma de filamentos de neuropilo (NT; del inglés, *neuropil threads*) y como neuritas distróficas rodeando el núcleo amiloide de las placas neuríticas (Figura A.8) (Braak et al., 1986; Dickson, 1997; Duyckaerts et al., 2009).

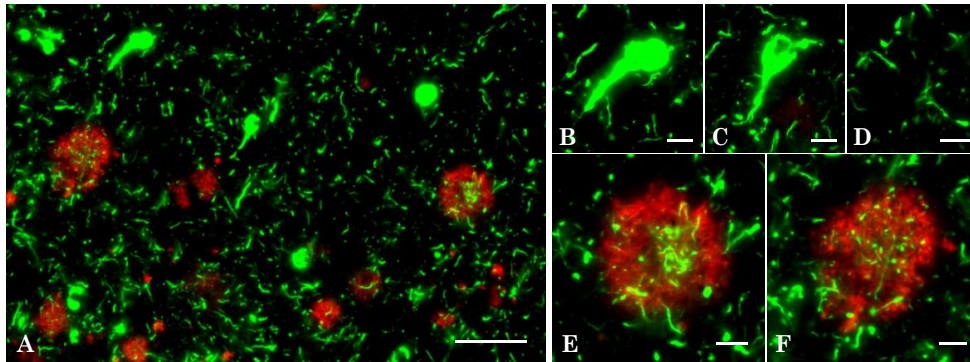


Figura A.8. Alteraciones neurofibrilares en la enfermedad de Alzheimer. (A) Inmunohistoquímica fluorescente para PHF1 (verde) y A β (rojo) en la capa V de la corteza temporal de pacientes de Alzheimer. Ampliaciones de (B-C) NFT, (D) NT, y (E-F) placas neuríticas. Barra de escala: (A) 50 μ m, (B-F) 10 μ m. Imagen realizada durante una estancia predoctoral en el laboratorio de los doctores Alberto Serrano-Pozo y Bradley T. Hyman.

Bajo el término de “taupatías” se agrupan distintas enfermedades en las que existen agregados intraneuronales de Tau hiperfosforilado (Lee et al., 2001; Leyns y Holtzman, 2017), que se diferencian unas de otras por la composición, morfología y distribución de los filamentos helicoidales. Como se ha descrito previamente (Apartado A.2), los enfermos de Alzheimer presentan un patrón típico de distribución de las lesiones neurofibrilares a lo largo de la enfermedad (Figura A.4) que se corresponden con los estadios de Braak (Braak y Braak, 1991). Además de la EA, en la “taupatías” se incluyen la parálisis supranuclear progresiva, la demencia frontotemporal y el parkinsonismo relacionado con el cromosoma 17, entre otros (Leyns y Holtzman, 2017; Hane et al., 2017a; Gao et al., 2018). Aunque se han descrito en torno a 40 mutaciones de Tau ligadas a la demencia frontotemporal, no se ha asociado ninguna al Alzheimer familiar.

Se han planteado diferentes estrategias terapéuticas contra la EA dirigidas a la patología Tau, como la inhibición de su agregación, fosforilación, acetilación y glicosilación, la inmunoterapia activa y pasiva, y la depleción de los sustratos de agregación de Tau (Medina, 2018; Lee et al., 2019; Gauthier et al., 2020). Sin embargo, hasta la fecha, ningún fármaco utilizado con estos fines se ha aprobado para su uso en pacientes de EA (Cummings et al., 2019).



3. RESPUESTA INMUNE EN EL SNC Y EN LA EA

La limitada capacidad regenerativa del SNC hace que, incluso sus pequeñas alteraciones, puedan provocar una disfunción severa, enfermedad o muerte. Para proteger al SNC de los factores que alteren su homeostasis, existen estrategias inmunes especializadas que lo separan de la periferia (Kierdorf et al., 2019). Históricamente, el SNC se ha considerado un órgano inmunoprivilegiado, por carecer de sistema linfático y estar aislado en condiciones fisiológicas de la circulación periférica por la BHE (Nieder Korn, 2006; Galea et al., 2007). Sin embargo, esta teoría ha sido cuestionada al descubrirse, primero en ratones y luego en humanos, un sistema especializado de drenaje linfático en la duramadre (Aspelund et al., 2015; Absinta et al., 2017). Además, existen claras evidencias de la capacidad de la BHE para responder a factores solubles y proteínas del plasma, así como para comunicarse con células del sistema inmune periférico (Zenaro et al., 2017). Por lo tanto, el cerebro no se considera actualmente un órgano inmunoprivilegiado.

A pesar de este desafío a la teoría del privilegio inmune, está claro que el SNC de vertebrados superiores muestra una separación inmune de la periferia. Existen estructuras anatómicas altamente especializadas, como las meninges, el espacio perivascular y el plexo coroideo, que, en conjunto, limitan el acceso de células y moléculas inmunes periféricas al SNC, aunque también actúan como sitio de entrada de patógenos, presentación o drenaje de antígenos, infiltración de células inmunes y depósito de agregados proteicos patológicos (Erickson y Banks, 2018; Kierdorf et al., 2019).

En el parénquima cerebral, las únicas células inmunes residentes son las microgliales, que, por tanto, desempeñan funciones importantes en la protección del SNC (Kierdorf y Prinz, 2017; Li y Barres, 2018). Sin embargo, los macrófagos asociados al SNC, las células dendríticas (CD) y otras células inmunes periféricas vigilan constantemente la interfaz entre la sangre y el cerebro o el LCR (Brezovakova et al., 2018).

Tanto en la EA, como en otras enfermedades neurodegenerativas, se produce una activación compleja del sistema inmune innato del SNC, conocida como neuroinflamación. Dicha respuesta conlleva importantes cambios celulares y moleculares (Zhang y Jiang, 2015), y está coordinada principalmente por la microglía y los astrocitos (Liu et al., 2014; Heneka et al., 2015; Hane et al., 2017a), aunque también por células endoteliales y otras células del sistema inmune. En conjunto, todas estas células liberan en respuesta a un daño en el SNC distintos mediadores moleculares (Liu et al., 2014; Da Mesquita et al., 2016; Domingues et al., 2017) con propiedades proinflamatorias, fagocíticas, citotóxicas y reguladoras de linfocitos T (Ubogu et al., 2006), con el fin de recuperar las condiciones fisiológicas del parénquima cerebral. Sin embargo, la continua presencia del agente desencadenante de la respuesta inmunológica, como por ejemplo los depósitos de A β (Butovsky et al., 2005; Sastre et al., 2006), puede provocar un proceso neuroinflamatorio crónico, caracterizado por un aumento creciente de estrés oxidativo, infiltración de leucocitos a través de la BHE y degeneración tisular (Sochocka et al., 2016; Schwartz y



Deczkowska, 2016), que finalmente contribuyen a la progresión de diversas patologías neurodegenerativas (Ubogu et al., 2006; Heneka et al., 2015; Ransohoff, 2016). En este sentido, la neuroinflamación se considera un componente patológico temprano y continuo en la patología del Alzheimer (Zhang y Jiang, 2015; Hane et al., 2017a; Chen, 2018; Gutierrez y Vitorica, 2018).

El papel importante de la neuroinflamación en la patogénesis de la EA está avalado por diversos estudios GWAS realizados en miles de pacientes, que han identificado numerosos polimorfismos en genes involucrados en la respuesta inmune cerebral asociados a la forma esporádica de la enfermedad, como TREM2, APOE, CR1, CD33, MS4A, ABCA7, BIN1, EPHA1, CLU, HLA-DRB5/HLA-DRB1, INPP5D, CELF1, MEF2C, ADAMTS1, ABI3, PLCG2 MAF y ZCWPW1 (Dansokho y Heneka, 2018; Sancesario y Bernardini, 2018; Pimenova et al., 2018; Kunkle et al., 2019).

3.1. Células gliales presentes en el parénquima del SNC

Los astrocitos y la microglía son los principales mediadores de la neuroinflamación. A pesar de que existen numerosos estudios que tratan de esclarecer la contribución de la neuroinflamación en la patogénesis de la EA (Heneka et al. 2015; Navarro et al., 2018; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018), el papel desempeñado por estas células no ha sido desvelado completamente. Es sabido que en el cerebro de pacientes de Alzheimer y de modelos murinos de la enfermedad, se desencadena una respuesta inflamatoria, mediada por A β y/o Tau hiperfosforilado, que implica la activación de microglía y de astrocitos, y que, en principio, trata de frenar la patología, al menos en los estadios iniciales (Jimenez et al., 2008; Heneka et al. 2015; Leyns et al., 2017; Sarlus y Heneka, 2017). Sin embargo, también se ha descrito la pérdida de la función protectora y homeostática de estas células, que, como consecuencia, podrían mediar un efecto neurotóxico (Navarro et al., 2018; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). Por lo tanto, en la EA, microglía y astrocitos podrían tener un efecto perjudicial, por una ganancia de función tóxica y/o por una pérdida de efecto neuroprotector.

3.1.1. Microglía

La microglía son células mieloides residentes del SNC, responsables principales de la respuesta inmune en el parénquima cerebral (Fani Maleki y Rivest, 2019; Geirsdottir et al., 2019; Greenhalgh et al., 2020). Fueron identificadas como una nueva entidad celular por Pío del Río-Hortega en 1919 (Figura A.9) (Río-Hortega, 1919a; Río-Hortega, 1919b; Río-Hortega, 1919c; revisado en Tremblay et al., 2015). Aunque existen células microgliales en todo el SNC (Greenhalgh et al., 2020), su distribución regional es heterogénea y más abundante en la sustancia blanca que en la gris (Mittelbronn et al., 2001). Representan entre un 0.5 y un 16.6% del total de las células del cerebro humano (Mittelbronn et al., 2001).



Figura A.9. Microglía dibujada por Pío del Río-Hortega. Imagen tomada de Tremblay et al., 2015.



Las células microgliales se originan durante la embriogénesis, a partir de células progenitoras eritropoyéticas del saco vitelino que migran al SNC (Ginhoux et al., 2010; Fani Maleki y Rivest; 2019; Geirsdottir et al., 2019). En ratones se ha demostrado que, en condiciones fisiológicas, la única fuente de recambio microglial proviene de la autorenovación de las propias células, sin que estén implicados los progenitores hematopoyéticos (Ajami et al., 2007; Askew et al., 2017; Fani Maleki y Rivest; 2019; Geirsdottir et al., 2019). De hecho, tras la depleción microglial, las células remanentes repueblan rápidamente el nicho (Bruttger et al., 2015; Najafi et al., 2018), y adquieren una especialización funcional determinada por el ambiente específico del parénquima cerebral. Por tanto, la microglía es epigenética y transcripcionalmente diferente de otros macrófagos residentes, así como de monocitos derivados de la médula ósea (Holtman et al., 2017; Bennett et al., 2018; Van Hove et al., 2019).

3.1.1.1. Funciones de la microglía

En un cerebro sano, la microglía realiza funciones esenciales para el correcto desarrollo y sustento de la homeostasis cerebral (Colonna y Butovsky, 2017). Está involucrada en la vigilancia y mantenimiento del microambiente del SNC, y en la modulación de la plasticidad sináptica, participando en la poda de sinapsis redundantes (Rajendran y Paolicelli, 2018). Además, elimina células muertas, agregados proteicos, microorganismos y otras sustancias o antígenos que puedan dañar al SNC (Colonna y Butovsky, 2017; Li y Barres, 2018; Sankowski et al., 2019; Geirsdottir et al., 2019).

En condiciones homeostáticas, la microglía tiene forma ramificada y prolongaciones altamente dinámicas (Figura A.10A) que le permiten examinar continuamente su entorno (Fani Maleki y Rivest, 2019). Ante cualquier alteración o situación patológica, la microglía se activa e inicia rápidamente una respuesta inmune con el fin de neutralizar al agente causante del daño, aunque dicha activación también puede contribuir a la progresión del daño o enfermedad (Saresella et al. 2016; Colonna y Butovsky, 2017; Greenhalgh et al., 2020). Por tanto, las células microgliales pueden modular un amplio espectro de respuestas celulares (Colonna y Butovsky, 2017), así como realizar un “efecto llamada” para reclutar células del sistema inmune periférico (Patir et al., 2019; Sankowski et al., 2019). Tradicionalmente, se ha descrito que la microglía, tras su activación, pierde ramificaciones y evoluciona a una estructura ameboide (Figura A.10B) (Kettenmann et al., 2011). Sin embargo, la morfología microglial es muy dinámica y, aunque es probable que los cambios morfológicos reflejen distintos estados funcionales, todavía no se han establecido las bases moleculares *in vivo* (Greenhalgh et al., 2020). Por tanto, no se puede atribuir una función a la microglía en base a su morfología, a excepción de la actividad fagocítica, asociada a fagosomas con estructura típica (Beccari et al., 2018). El envejecimiento origina una respuesta hiperreactiva microglial (Gomez-Nicola y Perry, 2015), caracterizada por cambios morfológicos y moleculares y una disfunción progresiva de sus funciones (Grabert et al., 2016; Colonna y Butovsky, 2017; Salter y Stevens, 2017).



3.1.1.2. Microglía en la EA

En los últimos años ha aumentado el interés de la comunidad científica sobre el papel de la microglía en la EA debido a que, como hemos comentado, (1) son células muy dinámicas, capaces de responder rápidamente al daño (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005), (2) son esenciales para el desarrollo del circuito neuronal, participando en la eliminación de sinapsis mediada por el complemento (Schafer et al., 2012; Thion y Garel, 2018) y (3) derivan del saco vitelino embrionario, lo que sugiere una divergencia temprana del sistema sanguíneo y una adaptación funcional al entorno cerebral (Ginhoux et al., 2010; Fani Maleki y Rivest; 2019; Geirsdottir et al., 2019). Además, se han identificado mediante estudios GWAS numerosos polimorfismos en genes involucrados en la función microglial que se consideran factores de riesgo de la EA esporádica (Dansokho y Heneka, 2018; Gutierrez y Vitorica, 2018; Navarro et al., 2018; Pimenova et al., 2018). Entre ellos, destacan mutaciones con pérdida de función en TREM2 y en el receptor de superficie CD33, que disminuyen la captación y el aclaramiento de A β por las células microgliales (Pimenova et al., 2018; Robinson et al., 2017).

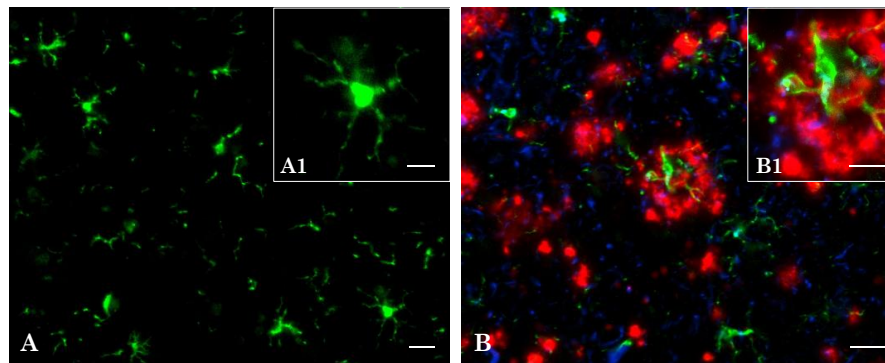


Figura A.10. Microglía en la enfermedad de Alzheimer. Inmunohistoquímica fluorescente para IBA1 (verde, población microglial total), CD68 (cian, microglía activa fagocítica), A β (rojo) y PHF1 (azul) en la corteza temporal de (A) individuo control y (B) paciente de Alzheimer. Barra de escala: (A, B) 20 μ m, (A1, B1) 10 μ m. Imagen realizada durante una estancia predoctoral en el laboratorio de los doctores Alberto Serrano-Pozo y Bradley T. Hyman.

En la EA, los depósitos amiloides están rodeados por las prolongaciones microgliales (Malm et al., 2005; Meyer-Luehmann et al., 2008), que podrían actuar como barrera física protectora frente a la toxicidad de la placa, promoviendo su compactación, y evitando su expansión y toxicidad (Yuan et al., 2016; Hansen et al., 2018). Es más, la fagocitosis activa de A β oligomérico por la microglia (Frautschy et al. 1992; Mandrekar et al., 2009), junto con la actividad proteolítica de las enzimas que secreta (Yang et al., 2011), reducen la polimerización del A β e impiden el crecimiento de la placa (Simard et al., 2006; Bolmont et al., 2008; Serrano-Pozo et al., 2013b). Pero, además, este proceso forma parte de la reacción inflamatoria que ocurre en la EA, caracterizada por la activación microglial que se inicia alrededor de las placas y que se expande con el avance de la patología por todo el parénquima cerebral (Jimenez et al., 2008, Jimenez et al., 2011). Por tanto, aunque la activación microglial podría ayudar a restringir la patología A β a edades tempranas, en los



estadios avanzados de la enfermedad, la microglía podría perder eficacia o incluso volverse perjudicial, contribuyendo así a la progresión de la patología (Gutierrez y Vitorica, 2018).

Respecto a la patología neurofibrilar, algunos estudios indican que la microglía favorece la propagación de depósitos de Tau (Hopp et al., 2018), mientras que otros sugieren que es capaz de fagocitar y degradar estos depósitos (Luo et al., 2015; Bolós et al., 2016) o, incluso, que la progresión de la patología Tau es independiente de la respuesta microglial (Zhu et al., 2020). Se ha descrito que la patología Tau puede activar a la microglía, y la consecuente producción de citoquinas inflamatorias (Bhaskar et al., 2010; Maphis et al., 2015). Además, ciertas formas solubles de Tau fosforilado parecen mediar la degeneración microglial (Streit et al., 2009; Sanchez-Mejias et al., 2016).

La microglía en respuesta a los daños típicos de la EA, puede manifestar diferentes estados funcionales, caracterizados por distinta morfología, tasa de proliferación, actividad fagocítica, capacidad de presentación de antígenos y liberación de factores proinflamatorios (Bachiller et al., 2018). Se han descrito diversos fenotipos microgliales asociados al estado de salud, envejecimiento y patologías del SNC (Stratoulis et al., 2019; Li et al., 2019a; Patir et al., 2019; Böttcher et al., 2019; Geirsdottir et al., 2019). Además, los diferentes fenotipos microgliales, determinados por factores intrínsecos y extrínsecos (Sala Frigerio et al., 2019), pueden reprogramarse en nuevos microambientes (Holtman et al., 2017; Bennett et al., 2018; Van Hove et al., 2019) y tener funciones neurotóxicas o neuroprotectoras (Fani Maleki y Rivest, 2019). Por tanto, la función microglial depende muy probablemente del contexto patológico en que se encuentre (Colonna y Butovsky, 2017). Además, es posible que las diversas funciones microgliales se realicen por subpoblaciones microgliales especializadas (Sankowski et al., 2019).

En los últimos años, se ha identificado a nivel transcripcional el perfil genético microglial en el envejecimiento (Mrdjen et al., 2018; Olah et al., 2018) y en distintos procesos neurodegenerativos, como en modelos amiloidogénicos de EA (Srinivasan et al., 2016; Keren-Shaul et al., 2017; Krasemann et al., 2017; Mrdjen et al. 2018; Mathys et al., 2017), modelos con taupatías (Friedman et al., 2018; Leyns y Holtzman, 2017), esclerosis lateral amiotrófica (Spiller et al., 2018) y esclerosis múltiple (Krasemann et al. 2017). En general, estos estudios concluyen que la activación microglial que se produce tras diversos daños y/o patologías conlleva la disminución de la expresión de genes homeostáticos (CX3CR1, P2RY12, P2RY13, TMEM119, y CD33) y la activación del programa genético DAM (del inglés, *disease-associated microglia*) (Keren- Shaul et al., 2017), caracterizado por la inducción de genes como CSF1, CLEC7A e IGF-I, así como de otros asociados con el riesgo de desarrollar EA (TREM2, APOE, TYROPB) (Lambert et al., 2013), o relacionados con rutas implicadas en fagocitosis/degradación lisosomal, respuesta inmune y endocitosis (Brown y George-Hyslop, 2017).

Más recientemente, nuevas aproximaciones metodológicas han permitido caracterizar el perfil genético de la microglía humana en la EA (Mathys et al., 2019; Srinivasan et al., 2020; Zhou et al., 2020; Nguyen et al., 2020). Estos estudios



también definen una firma microglial alterada en la patología, aunque con importantes diferencias con respecto a la microglía DAM descrita en los modelos animales de EA y en humanos con otras enfermedades neurológicas. Estos resultados ponen de manifiesto las importantes limitaciones derivadas del uso de modelos animales, que manifiestan una exacerbada activación microglial (Jimenez et al., 2008; Jimenez et al., 2011; Keren-Shaul et al., 2017) y no reproducen de forma adecuada la patología de Alzheimer. En este sentido, se ha descrito que, en cerebros de personas con EA, existen células de “microglía senescente” caracterizadas por una morfología distrófica, la pérdida o fragmentación de sus prolongaciones (citorrexis) y la incapacidad de realizar correctamente sus funciones (Streit y Xue, 2009; Streit WJ et al., 2009; Smith y Dragunow, 2014). Apoyan esta idea distintos artículos que postulan que la función y supervivencia microglial parecen estar comprometidas en pacientes de EA (Konno et al. 2014; Tada et al. 2016; Smith y Dragunow, 2014), a diferencia de lo que ocurre en modelos murinos de la patología. De hecho, en nuestro laboratorio se ha identificado en el hipocampo de pacientes de Alzheimer un proceso de degeneración microglial, mediado por la acumulación de formas tóxicas de Tau fosforilado (Sánchez-Mejías et al., 2016). Esta respuesta microglial es distinta del fenotipo hiperreactivo citotóxico mediado por A β y por otras formas de Tau, y podría estar asociada con el desarrollo de la EA (Navarro et al., 2018; Gutierrez y Vitorica, 2018; Sánchez-Mejías et al., 2016; Hansen et al., 2018; Romero-Molina et al, 2018). Por tanto, puede que no haya microglía “buena” o “mala”, sino simplemente funciones microgliales disfuncionales como consecuencia de la patología (Brown y George-Hyslop, 2017).

Aunque los métodos transcriptómicos resultan esenciales para caracterizar el perfil funcional de la microglía (Grubman et al., 2019; Li et al., 2019a; Patir et al., 2019; Sankowski et al., 2019), las pruebas realizadas “in vivo” son escasas y no concluyentes. Este hecho, sumado a las importantes diferencias observadas con modelos animales (Friedman et al., 2018; Geirsdottir et al., 2019; Navarro et al., 2018; Sanchez-Mejias et al., 2016), hace que sigan existiendo múltiples cuestiones acerca de la heterogeneidad funcional y regional de la microglía en el cerebro humano, tanto en condiciones fisiológicas como en la EA (Sankowski et al., 2019).

En definitiva, la implicación de la microglía en el desarrollo de la patología de Alzheimer parece ser dual y bastante compleja (Zhang y Jiang, 2015). La existencia de múltiples estados de activación microglial podría explicar los diversos papeles de la microglía en el desarrollo y progresión de la patología del Alzheimer (Hansen et al., 2018). En cualquier caso, la microglía parece contribuir a la patología en la EA avanzada, ya sea desempeñando un papel neurotóxico, o como consecuencia de una insuficiente capacidad protectora (Gutierrez y Vitorica, 2018; Navarro et al., 2018).

3.1.2. Astrocitos

Los astrocitos constituyen entre el 19 - 40% de las células gliales del SNC humano (von Bartheld et al., 2016), donde son mediadores importantes de la respuesta neuroinflamatoria. Fueron descritos por primera vez por Michael von Lenhossék, quien acuñó esta nomenclatura en base a su forma estrellada (van



Lenhossék, 1895). Al igual que las neuronas y los oligodendrocitos, los astrocitos derivan del neuroectodermo (Zhang y Jiang, 2015). Aunque morfológicamente son muy heterogéneos, se caracterizan por presentar una estructura estrellada con múltiples prolongaciones que conectan con vasos sanguíneos, neuronas, oligodendrocitos, microglía y otros astrocitos (Sofroniew y Vinters, 2010; Vasile et al., 2017; Farhy-Tselnicker y Allen, 2018).

Tradicionalmente se clasifican en astrocitos protoplasmáticos, característicos de la sustancia gris y con ramificaciones finas y abundantes, y astrocitos fibrosos, típicos de la sustancia blanca y con procesos más alargados (Zhang y Jiang, 2015; Cai et al., 2017; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). En los últimos años diversos estudios transcriptómicos han permitido identificar dos fenotipos diferentes de astrocitos reactivos en función del estímulo que lo genere. La neuroinflamación genera un fenotipo neurotóxico, proinflamatorio y destructor de sinapsis dependiente de microglía (Zamanian et al., 2012), que se ha caracterizado en el SNC de pacientes con diversas enfermedades neurodegenerativas, incluida la EA (Liddel et al., 2017). Por el contrario, los astrocitos inducidos por isquemia son independientes de microglía, y expresan altos niveles de factores neurotróficos promotores de la supervivencia y el crecimiento neuronal, y trombospondinas, que favorecen la reparación de sinapsis (Zamanian et al., 2012; Liddel et al., 2017). Sin embargo, esta clasificación es probablemente una simplificación de la realidad, ya que la heterogeneidad morfológica, funcional y molecular de los astrocitos es mucho más compleja (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018), como se ha descrito recientemente tanto en modelos animales (John Lin et al., 2017; Batiuk et al., 2020) como en humanos (Vasile et al., 2017; Grubman et al., 2019; Zhou et al., 2020).

3.1.2.1. Funciones de los astrocitos

Los astrocitos desarrollan múltiples funciones indispensables para el correcto mantenimiento de la homeostasis del SNC (Vasile et al., 2017; Liddel y Barres, 2017; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). Por un lado, proporcionan soporte metabólico y estructural a las neuronas (Liu et al., 2017a; Li et al., 2019b) liberando sustancias antioxidantes (Chen et al., 2020b), factores tróficos (VEGF, GDNF, bFGF), neurotransmisores (ATP, glutamato, GABA) y neuromoduladores (D-serina, ácido quinurénico) (Minter et al., 2016; Rodríguez-Arellano et al., 2016). Además, mantienen el pH y el equilibrio hidro-salino del parénquima cerebral (Covelo y Areque, 2016; Rodríguez-Arellano et al., 2016; Zulfiqar et al., 2019).

Los astrocitos también ejercen un rol esencial en la formación, maduración, función y eliminación de las sinapsis (Chung et al., 2015; Vasile et al., 2017). De hecho, en el neurodesarrollo, a pesar de que la neurogénesis precede a la astrogénesis, las sinapsis comienzan a formarse cuando aparecen los astrocitos (Farhy-Tselnicker y Allen, 2018). En las sinapsis tripartitas, la comunicación entre astrocitos y neuronas tiene gran importancia funcional. Además, un solo astrocito puede contactar con cientos o incluso miles de sinapsis (Yamazaki y Kanekiyo, 2017; Allen y Eroglu, 2017), coordinando a la vez múltiples redes neuronales (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). También participan en la eliminación de sinapsis, ya sea de



forma directa o indirecta (en este caso mediando, a través del complemento, la poda o *pruning* de sinapsis y axones innecesarios por parte de la microglía) (Chung et al., 2015). Por todo ello, participan en mecanismos de plasticidad sináptica (Vasile et al., 2017), entre los que se incluyen los procesos de aprendizaje y memoria (Chung et al., 2015). Además, como las neuronas regulan el transcriptoma de los astrocitos (Hasel et al., 2017), la función cerebral depende de manera general de la actividad coordinada de las redes astrocitos-neuronas (Covelo y Araque, 2018).

Los pies astrocitarios, junto con las células del endotelio capilar y los pericitos vasculares, rodean la membrana basal de los vasos sanguíneos cerebrales, participando en la formación, integridad y mantenimiento de la BHE (Broux et al., 2015; Li et al., 2019b). En este sentido, los astrocitos proporcionan soporte bioquímico a las células endoteliales (Liu et al., 2014), regulan el paso selectivo de sustancias al SNC (Ota et al., 2013) y contribuyen activamente a la captación de glucosa sanguínea para dar soporte energético a las neuronas a través del lactato (Zulfiqar et al., 2019). También participan, junto con los pericitos, en la coordinación del flujo sanguíneo con la actividad neuronal (Mishra et al., 2016). Los astrocitos, además, controlan el flujo de agua entre el cerebro y la circulación sanguínea a través de canales acuosos, conocidos como acuaporinas (AQP), principalmente AQP-4 y también AQP-1 (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). La AQP-4 participa en el “drenaje glinfático”, responsable del aclaramiento paravascular de metabolitos y solutos tóxicos (Iliff y Nedergaard, 2013).

Además, los astrocitos desempeñan un papel fundamental en la homeostasis energética en el SNC. Actualmente, la hipótesis de la lanzadera de lactato astrocito-neurona es el modelo más aceptado sobre el metabolismo cerebral de la glucosa. Esta hipótesis postula que la glucosa captada por los astrocitos se almacena en forma de glucógeno o se metaboliza a piruvato mediante la glucólisis. El piruvato, a su vez, se reduce a lactato y se transporta a las neuronas a través de los transportadores de ácidos monocarboxílicos. En las neuronas, el lactato vuelve a convertirse en piruvato y se emplea en el ciclo de Krebs para producir energía (Deitmer et al., 2019). A pesar de que existen múltiples evidencias sobre el uso del lactato astrocitario como soporte neuronal, esta hipótesis está sometida a debate (Yellen, 2018; Dienel, 2019), ya que probablemente corresponda a una de las múltiples vías para cubrir los requerimientos energéticos del SNC (Eraso-Pichot et al., 2018; Deitmer et al., 2019). De hecho, aproximadamente el 20% de la energía total cerebral procede en condiciones fisiológicas de la β -oxidación (Ebert et al., 2003), que en el SNC está mediada principalmente por los astrocitos (Eraso-Pichot et al., 2018). Por tanto, los astrocitos son esenciales para mantener la homeostasis lipídica cerebral (Farmer et al., 2019; Konttinen et al., 2019). Aunque las rutas de degradación de ácidos grasos y aminoácidos, y el metabolismo mitocondrial no están totalmente caracterizados en los astrocitos (McAvoy y Kawamata, 2019), parecen ser esenciales para el soporte neuronal (Bélanger y Magistretti, 2009; Bélanger et al., 2011; Liu et al., 2017a; Valori et al., 2019; Konttinen et al., 2019).

Los astrocitos también son indispensables en la respuesta inmune del SNC, ya que eliminan residuos y toxinas del LCR, liberan factores quimiotácticos, aclaran



restos celulares y participan en la reparación y cicatrización del SNC tras daños traumáticos (Liu et al., 2014; Colombo y Farina, 2016; Liddeloy y Barres, 2017). Ante cualquier insulto en el SNC, se produce una activación de los astrocitos, conocida como astrogliosis, caracterizada por diversos cambios moleculares, morfológicos y funcionales (Liddeloy y Barres, 2017; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). Entre ellos, destaca el aumento de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP; del inglés, *glial fibrillary acidic protein*) y de vimentina (VIM), que participan en el acortamiento y engrosamiento de las prolongaciones astrocitarias y en el aumento del tamaño del soma (Wilhelmsson et al., 2004; Liddeloy y Barres, 2017). Además, los astrocitos activos intervienen en la respuesta inflamatoria liberando factores neurotróficos, inflamatorios y citotoxinas (Li et al., 2019b) que pueden ejercer un efecto tanto beneficioso como perjudicial en las células de su entorno (Liddeloy et al., 2017; Dossi et al., 2018; Li et al., 2019b). En este sentido, se ha postulado que la alteración de las funciones fisiológicas de los astrocitos podría desencadenar o empeorar la disfunción neuronal que se produce en distintos procesos neurodegenerativos (Zhang y Jiang, 2015; Dossi et al., 2018).

3.1.2.2. Astrocitos en la EA

En los cerebros de pacientes de EA se produce una reactividad astrocitaria generalizada (Verkhratsky et al., 2010; Fu y Jhamandas, 2014) o “astrogliosis”, que se manifiesta en los primeros estadios de la enfermedad y progresa significativamente con la patología amiloidea y neurofibrilar (Verkhratsky et al., 2010; Heneka et al., 2015; Rodríguez-Arellano et al., 2016; Garwood et al., 2017).

La activación astrogliar se manifiesta alrededor de las placas amiloides y se desencadena por distintas formas de A β (Zhang et al., 2010; Carrero et al., 2012; Medeiros y LaFerla, 2013; Zhang y Jiang, 2015; Habib et al., 2020). Se ha propuesto que, en fases iniciales de la enfermedad, los astrocitos reactivos podrían actuar como una barrera física alrededor de las placas limitando su crecimiento y protegiendo a las neuronas cercanas de las especies oligoméricas tóxicas de A β (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). También intervienen en procesos de captación, aclaramiento y degradación de A β (Verkhratsky et al., 2010; Zhang y Jiang, 2015) ya que expresan enzimas degradadoras de A β , como ECE2, IDE, NEP y las metaloproteinasas MMP-2, -3, -6 y -9 (Verkhratsky et al., 2010; Zhang y Jiang, 2015; Ries y Sastre, 2016; Acosta et al., 2017). Sin embargo, con la progresión de la EA, se produce una alteración en los mecanismos de aclaramiento de A β , probablemente debido a una disfunción de los astrocitos (Farris et al., 2007; Tarasoff-Conway et al., 2015), lo que empeora la patología (Li et al., 2019b). Además, en la EA los astrocitos reactivos presentan predominantemente un fenotipo dependiente de microglía, neurotóxico y proinflamatorio (Liddeloy et al., 2017), secretando, junto con la microglia activa, citoquinas inflamatorias, como TNF α , IL1 β , IL6, IL8, IL10, TGF β , IFN γ e IFN δ (Morales et al., 2014; Zhang y Jiang, 2015) y especies reactivas de oxígeno (Li et al., 2019b), que podrían inducir la producción de A β en los propios astrocitos (Verkhratsky et al., 2010; Zhang y Jiang, 2015; ; Acosta et al., 2017; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018; Li et al., 2019b).



La atrofia y/o disfunción astrocitaria en fases avanzadas de la EA implica la reducción del soporte homeostático astrogliar y una regulación anormal de calcio y glutamato (Li et al., 2019b), lo que tiene graves consecuencias en la supervivencia neuronal y en el mantenimiento de las sinapsis (Verkhratsky et al., 2010; Rodríguez-Arellano et al., 2016; Verkhratsky et al., 2016; Acosta et al., 2017; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). Por otro lado, el cambio morfológico asociado a la activación astrogliar afecta a los pies de los astrocitos, pudiendo alterar la unidad neurovascular (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018) y la integridad de la BHE (Liu et al., 2014), provocando las alteraciones cerebrovasculares típicas de la EA (Verkhratsky et al., 2010; Avila-Muñoz y Arias, 2014; Verkhratsky et al., 2016; Acosta et al., 2017). Como consecuencia, aumenta la deposición de A β y disminuye su aclaramiento a través de la BHE, contribuyendo a la CAA (Ries y Sastre, 2016; Cai et al., 2017; Hubbard et al., 2018), que agrava la patología vascular de los enfermos de Alzheimer (Verkhratsky et al., 2016).

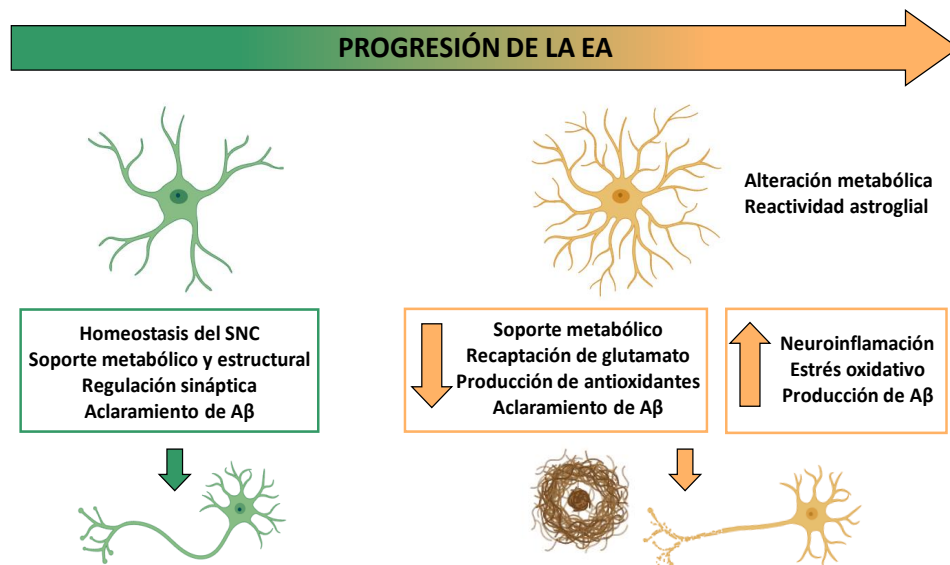


Figura A.11. Papel de los astrocitos en la EA. En condiciones fisiológicas, los astrocitos proporcionan soporte metabólico y estructural a las neuronas, manteniendo la homeostasis cerebral. Proporcionan lactato como fuente de energía, regulan las sinapsis, forman parte de la unidad neurovascular, captan el exceso de glutamato extracelular y participan en el aclaramiento de A β . Sin embargo, conforme la EA progresa, podrían producirse, a través de una cascada de eventos patológicos, alteraciones metabólicas en los astrocitos, como una reducción del metabolismo de glucosa, que conducen a una situación de estrés oxidativo y astrogliosis. Los astrocitos reactivos producen citoquinas proinflamatorias, que, junto a la microglía, participan en la respuesta neuroinflamatoria típica de la EA. Además, se produce una disminución en las funciones protectoras y homeostáticas de los astrocitos, así como una alteración de la integridad de la BHE y el flujo cerebral. Disminuye la producción astrocítica de antioxidantes, como el glutatión (GSH), contribuyendo al estrés oxidativo. También se afecta la recaptación de glutamato y el aclaramiento de A β , que se produce de forma paralela a un aumento en la producción de este péptido por parte de los astrocitos. Todo esto contribuye a un aumento en la patología amiloide, tanto en el parénquima como en la vasculatura (CAA), y disfunción sináptica, contribuyendo a la demencia. Imagen creada con BioRender.com.



Recientemente, se ha postulado que la progresión de la EA se relaciona con deficiencias metabólicas en el SNC (Verkhatsky et al., 2016; Gordon et al., 2018; Le Douce et al., 2020), en las que probablemente desempeñen un papel fundamental los astrocitos activos (Zulfiqar et al., 2019; Le Douce et al., 2020). De hecho, se ha observado que el A β afecta al metabolismo de los astrocitos (Rodríguez-Arellano et al., 2016) y a través de ellos a las funciones cognitivas (Le Douce et al., 2020). Además, la disfunción metabólica también puede contribuir a la generación de A β por parte de los propios astrocitos (Zulfiqar et al., 2019).

En definitiva, aunque sigue habiendo controversia sobre el rol (neurotóxico o neuroprotector) de los astrocitos en la EA, parece que, en los inicios de la patología, los astrocitos poseen un papel neuroprotector. Sin embargo, con la progresión de la enfermedad, puede producirse una pérdida de sus funciones normales y/o a una ganancia de función tóxica, adquiriendo una función perjudicial (Figura A.11) (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018; Zulfiqar et al., 2019). Por tanto, el término “reactivo” resulta insuficiente para definir el estado y función de los astrocitos en la EA. Así pues, y de forma similar a la microglía, se ha propuesto que los astrocitos podrían adoptar gran variedad de fenotipos funcionales dependiendo del contexto patológico en el que se encuentren (Liddeloy y Barres, 2017).

3.2. Otros componentes celulares del sistema inmune residentes en el SNC

En condiciones fisiológicas, alrededor del 20% de las células inmunes del cerebro no son microglía. La mitad de estas células se describen como macrófagos asociados al SNC (Goldmann et al., 2016; Greenhalgh et al., 2020) y el resto son monocitos, células derivadas de monocitos (CDM), células dendríticas (CD), neutrófilos, mastocitos, células linfoides innatas y linfocitos. Las células inmunes cerebrales difieren en cantidad y expresión de marcadores de las que circulan en la sangre, de las que probablemente derivan (Korin et al., 2017; Mrdjen et al., 2018; Greenhalgh et al., 2020).

En condiciones fisiológicas, la entrada de células inmunes al parénquima cerebral está restringida por estructuras celulares especializadas, como la BHE y la barrera sangre-LCR (Ludewig et al., 2016; Engelhardt et al., 2017). Sin embargo, en situaciones patológicas, las células inmunes pueden atravesar barreras intactas o comprometidas y entrar al cerebro (Engelhardt et al., 2017; Greenhalgh et al., 2020). Además, un rasgo general del envejecimiento, que se acelera en la EA, es un aumento en la permeabilidad de la BHE, lo que implica una mayor entrada de antígenos al SNC y respuestas inmunes sistémicas y locales (Ludewig et al., 2016). Los astrocitos y la microglía, en respuesta a citoquinas proinflamatorias del SNC, producen quimioquinas mediadoras de la migración de leucocitos inflamatorios desde la periferia hacia el parénquima cerebral (Ubogu et al. 2006; Kim et al., 2014; Fani Maleki y Rivest, 2019; Kierdorf et al., 2019; Robichon et al., 2020). De hecho, en el cerebro de pacientes de EA, así como en modelos murinos de esta patología, se han identificado diferentes poblaciones de leucocitos, como monocitos, linfocitos y neutrófilos (Zenaro et al., 2015).



Las células y moléculas del sistema inmune se estratifican en dos grandes grupos en función de su tiempo de respuesta, su especificidad de reconocimiento, la existencia de recombinación genética, los tipos de receptores que expresan, o incluso la aparición o no de memoria, entre otras propiedades. En este sentido podemos clasificar la respuesta inmune en **innata** o **adaptativa** (Monserrat-Sanz et al., 2017a).

3.2.1. Respuesta inmune innata

La inmunidad innata es estereotipada (independiente de la naturaleza del agresor) e inespecífica (no se basa en el reconocimiento de patrones moleculares). Su objetivo es desencadenar una rápida respuesta destinada a la eliminación del agresor, a la vez que facilitar el reconocimiento necesario para inducir una respuesta específica (Pérez, 2019).

Las respuestas inmunes innatas representan la primera línea de defensa del organismo ante un patógeno, e incluyen las barreras físicas y químicas junto con los componentes celulares y moleculares del sistema inmune (Monserrat-Sanz et al., 2017a). Este tipo de respuesta carece de memoria inmunológica por lo que para activarse no necesita la exposición previa al patógeno. Los mecanismos innatos pueden ser de dos tipos; **humoral**, formado por el sistema del complemento, proteínas de fase aguda y ciertos mediadores inflamatorios, y **celular**, formado por monocitos, CDM, CD, granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos y mastocitos), y células citotóxicas naturales o *natural killer* (Monserrat-Sanz et al., 2017a; Pérez, 2019). Todas estas células expresan receptores de inmunoglobulinas, citoquinas, complemento y mediadores lipídicos, además de ligandos para moléculas de adherencia que les capacitan para migrar al foco inflamatorio (Pérez, 2019).

Para que la respuesta inmune innata se produzca es necesario el reconocimiento del patógeno por parte de las células implicadas. Para ello, dichas células poseen una serie de receptores, denominados PRRs (del inglés, *Pattern recognition receptors*), que reconocen estructuras altamente conservadas expresadas por la mayoría de patógenos, denominadas PAMPs (del inglés, *pathogen-associated molecular patterns*), así como moléculas endógenas liberadas por las propias células dañadas, englobadas bajo el término de DAMPs (del inglés, *damage associated molecular patterns*) (Takeuchi y Akira, 2010; Zhu et al., 2019). Una vez que los PAMPs o DAMPs son reconocidos por los receptores PRRs, se activan los mecanismos necesarios para desencadenar la respuesta inmune. En función del tipo de PRR activado, se puede inducir la autofagia (Zhu et al., 2019) y/o producirse una regulación positiva de factores de transcripción involucrados en la respuesta inmune, como citoquinas proinflamatorias, interferones tipo I o quimioquinas (Takeuchi y Akira, 2010).

Las CDM, CD y neutrófilos tienen capacidad de fagocitar los agentes extraños potencialmente patógenos (Chong et al., 2018). Además, los fagocitos pueden secretar mediadores inflamatorios y actuar como células presentadoras de antígeno a los linfocitos para inducir la respuesta inmune específica (Monserrat-Sanz et al., 2017a; Pérez, 2019).



3.2.1.1. Macrófagos asociados al SNC o macrófagos asociados a barrera

En condiciones fisiológicas, el SNC alberga una población heterogénea de células mieloides residentes, que incluyen, además de a la microglía del parénquima, a los macrófagos asociados al SNC o macrófagos asociados a barrera (Jordão et al., 2019). A diferencia de la microglía, estos macrófagos no se encuentran dentro del parénquima del SNC, sino en la interfase. Las poblaciones de macrófagos asociados al SNC más estudiadas son los macrófagos perivasculares, los macrófagos leptomeníngeos y los macrófagos del plexo coroideo. Además de los macrófagos leptomeníngeos, las meninges también contienen una población de macrófagos duros. En los plexos coroideos los macrófagos incluyen dos subconjuntos, los localizados en el estroma y las células de Kolmer, que se encuentran en el epitelio coroideo (Goldmann et al., 2016; Mrdjen et al., 2018; Van Hove et al., 2019; Kierdorf et al., 2019).

Al igual que la microglía, los macrófagos asociados al SNC tienen un origen embrionario. Varios estudios sugieren que los progenitores embrionarios del saco vitelino llegan a la interfaz del SNC cuando las primeras estructuras comienzan a desarrollarse, poco después de la colonización del SNC por las células que darán lugar a la microglía (Goldmann et al., 2016; Kierdorf et al., 2019). Se ha demostrado en ratones adultos sanos que los macrófagos perivasculares, leptomeníngeos y las células del epiplexo de Kolmer se mantienen mediante autorrenovación, y la reposición proveniente de progenitores derivados de células madre hematopoyéticas es insignificante (Hashimoto et al., 2013; Goldmann et al., 2016). Sin embargo, los macrófagos duros y del plexo coroideo estromales, si pueden ser reemplazados por progenitores derivados de células madre hematopoyéticas circulantes, mediante el reclutamiento dependiente de CCR2 de monocitos sanguíneos circulantes (Goldmann et al., 2016; Van Hove et al., 2019).

Los macrófagos asociados al SNC poseen marcadores generales comunes a la microglía (Kierdorf et al., 2019), lo que dificulta su estudio diferencial. A diferencia de la microglía, expresan *Mrc1* (del inglés, *mannose receptor C-type 1*), el receptor tipo *scavenger* CD163, el receptor CD36, *Lyve1* (del inglés, *lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1*), *Pf4* (del inglés, *platelet factor 4*), *Cbr2* (del inglés, *carbonyl reductase 2*), *Ms4a7* (del inglés, *membrane spanning 4-domains A7*) y *Stab1* (del inglés, *stabilin 1*) (Zeisel et al., 2015; Faraco et al., 2017; Mrdjen et al., 2018; Jordão et al., 2019; Kierdorf et al., 2019). Sin embargo, en respuesta a la neuroinflamación, los macrófagos asociados al SNC regulan negativamente la mayoría de los genes descritos anteriormente, a excepción de *Ms4a7*, que se mantiene estable y es expresado exclusivamente en estas células (Jordão et al., 2019).

A pesar de que los macrófagos asociados al SNC comparten la mayoría de los marcadores fenotípicos (Kierdorf et al., 2019; Jordão et al., 2019), se pueden diferenciar por su posición anatómica y su morfología. Los macrófagos perivasculares y leptomeníngeos son células alargadas con una morfología relativamente simple, en



comparación con la microglía altamente ramificada en el parénquima (Zeisel et al., 2015; Goldmann et al., 2016). Los macrófagos duros muestran una estructura bipolar, aunque también puede ser dendriforme y los del plexo coroideo tienen una forma estrellada en el estroma y ameboide en el epitelio (Goldmann et al., 2016; Kierdorf et al., 2019).

3.2.1.1.1. Funciones de los macrófagos asociados al SNC

Los macrófagos asociados al SNC son importantes puntos de control en la entrada al SNC (Kierdorf et al., 2019), y en el mantenimiento de la homeostasis cerebral (Chong et al., 2018).

Estas células son capaces de eliminar antígenos, metabolitos y otras moléculas potencialmente peligrosas evitando su entrada en el SNC (Da Mesquita et al., 2018), función mediada, al menos en parte, por MRC1 (del inglés, *mannose receptor C-type 1*), y por el *scavenger* receptor CD163 (Kierdorf et al., 2019).

También se ha propuesto que los macrófagos asociados al SNC modulan la entrada de células inmunes en el cerebro (Chong et al., 2018) interactuando estrechamente con células circundantes (astrocitos, células endoteliales, células musculares lisas vasculares, pericitos, etc.). De hecho, los factores producidos por estos macrófagos son capaces de iniciar una respuesta inflamatoria en la vasculatura del SNC (Kierdorf et al., 2019). Además, los macrófagos perivasculares intervienen en el control de la permeabilidad de la BHE (Serrats et al., 2010; He et al., 2016) y la angiogénesis (Fantin et al., 2010).

Por otra parte, los macrófagos asociados al SNC parecen participar en la regulación de la homeostasis metabólica cerebral. En este sentido, se ha propuesto que los macrófagos perivasculares regulan los niveles de glucosa cerebral mediante la liberación del factor de crecimiento endotelial (VEGF), que aumenta la expresión del transportador de glucosa 1 (GLUT1) en las células endoteliales (Jais et al., 2016). También intervienen en el transporte de lípidos circulantes y en el control de los niveles de hierro en el SNC (Zeisel et al., 2015; Kierdorf et al., 2019).

3.2.1.1.2. Macrófagos asociados al SNC en la EA

Los macrófagos asociados al SNC parecen participar en enfermedades neuroinflamatorias y neurodegenerativas como la EA (Prinz et al., 2017, Figura A.12), controlando el intercambio de diversas moléculas entre el torrente sanguíneo y el SNC (Kierdorf et al., 2019). Además, podrían modular la entrada y el fenotipo de células inmunes, e intervenir en varios procesos inmunopatológicos, como la presentación de antígenos a los linfocitos circulantes (Brendecke y Prinz, 2015; Jordão et al., 2019).

Estudios en modelos animales proponen que los macrófagos asociados al SNC podrían mejorar la CAA típica de los pacientes de EA, facilitando la eliminación del β -amiloide insoluble (Hawkes y McLaurin, 2009; Da Mesquita et al., 2018). Sin embargo, no se ha descrito ni activación ni alteración en el número de los macrófagos perivasculares en el cerebro de pacientes con EA en comparación con controles sanos



(Kierdorf et al., 2019). Por tanto, aunque estas células podrían ser beneficiosas en estadios iniciales de la EA, posteriormente podrían volverse disfuncionales, e incluso actuar como una fuente de moléculas potencialmente dañinas, empeorando la patología (Park et al., 2017). Por ello, los depósitos de amiloide vascular podrían ser consecuencia, al menos en parte, de un aclaramiento deficiente en los espacios perivascuales (Thériault et al., 2015).

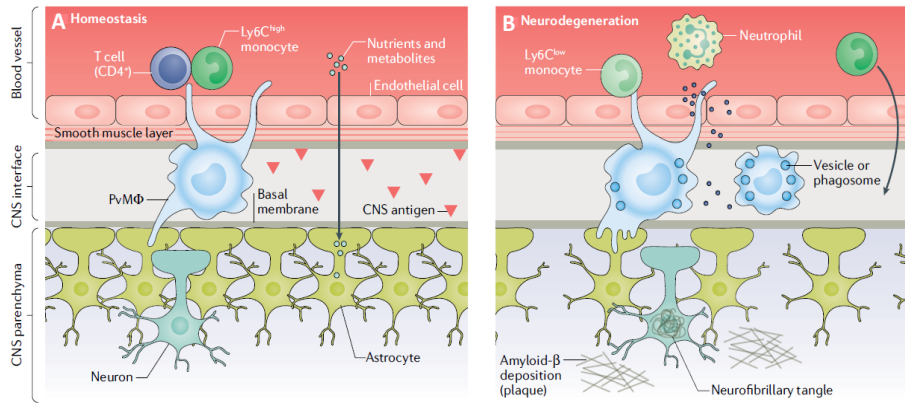


Figura A.12. Macrófagos asociados al SNC en condiciones homeostáticas y en la EA. (A) En homeostasis, los macrófagos perivascuales participan en la vigilancia inmunológica, regulan la permeabilidad de la BHE y controlan la entrada de células, moléculas y metabolitos al SNC. (B) En la EA, los macrófagos perivascuales tienden a acumularse en la vasculatura próxima a los depósitos de Aβ, y parecen contribuir a su aclaramiento en estadios iniciales. Sin embargo, con la progresión de la EA estas células podrían volverse disfuncionales y empeorar la patología, permitiendo la entrada de células inmunes periféricas, y/o liberando citoquinas proinflamatorias. Imagen tomada de Kierdorf et al., 2019.

3.2.1.2. Monocitos y células derivadas de monocitos (CDM)

Los monocitos y células derivadas de monocitos (CDM) pertenecen al sistema fagocítico mononuclear. Se localizan en la circulación sanguínea o infiltrados en tejidos periféricos, y actúan iniciando la respuesta inflamatoria y/o eliminando directamente los patógenos. Expresan numerosos receptores en su superficie, que, tras su activación, inducen la producción de grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno, prostaglandinas y citoquinas proinflamatorias (Monserrat-Sanz et al., 2017a).

Los monocitos se originan en la médula ósea a partir de las células madre hematopoyéticas pluripotenciales (Collin y Bigley, 2016; Fani Maleki y Rivest, 2019) y, tras su diferenciación, se liberan al torrente circulatorio, donde permanecen un tiempo que oscila entre pocas horas a tres días máximo (Male et al., 2014). Estos monocitos pueden ser reclutados a los tejidos y originar CDM, como macrófagos e, incluso, células dendríticas (Ginhoux y Jung, 2014). Actualmente no existen métodos analíticos para diferenciar macrófagos de células dendríticas derivadas de monocitos, por lo que ambos tipos celulares, a pesar de que pueden tener propiedades funcionales diferentes, se consideran células derivadas de monocitos (Guilliams et al., 2014).



La población de monocitos es muy heterogénea. En humanos se clasifican en función de la expresión de CD14 y CD16 en: monocitos clásicos o inflamatorios (CD14⁺⁺CD16⁻), intermedios (CD14⁺⁺CD16⁺), y no clásicos o circulantes (CD14⁺CD16⁺⁺) (Ferrer et al., 2014; Thomas et al., 2017; van Uden et al., 2019). De forma similar, en ratones, se distinguen dos poblaciones en función de los niveles de expresión de receptores de quimioquinas y de Ly6c: monocitos clásicos o proinflamatorios (CX3CR1^{low}CCR2⁺Ly6C^{hi}), y no clásicos o “patrolling” (CX3CR1^{high}CCR2⁻Ly6C^{low}) (Chong et al., 2018; Teh et al., 2019).

3.2.1.2.1. Funciones de los monocitos y CDM

Los monocitos clásicos pueden infiltrarse en los tejidos, producir citoquinas proinflamatorias y diferenciarse en macrófagos inflamatorios (van Uden et al., 2019; Fani Maleki y Rivest, 2019). Estos monocitos realizan su función efectora predominantemente durante la inflamación (Chong et al., 2018), expresan varios PRR y tienen un papel fundamental en la fagocitosis (van Uden et al., 2019). Los monocitos clásicos también expresan CCR2, esencial en la migración de monocitos hacia los tejidos (Kim y Cho, 2016).

Los monocitos intermedios también producen citoquinas proinflamatorias y especies reactivas de oxígeno (Rana et al., 2018; van Uden et al., 2019) y pueden presentar antígenos e inducir la activación de linfocitos T (Wong et al., 2011; Rana et al., 2018).

Finalmente, los monocitos no clásicos custodian el lumen de los vasos sanguíneos, examinando el endotelio en busca de señales de peligro y promoviendo la reparación de tejidos (Wong et al., 2012; van Uden et al., 2019), por lo que poseen un importante papel homeostático (Chong et al., 2018). Además, participan en el reclutamiento y la activación de neutrófilos (Carlin et al., 2013; Finsterbusch et al., 2016), y son capaces de diferenciarse a macrófagos residentes en condiciones fisiológicas, o a macrófagos antiinflamatorios durante la inflamación, para contribuir a la reparación de los tejidos dañados (van Uden et al., 2019).

En condiciones fisiológicas, los monocitos y las células derivadas de monocitos no se infiltran en el parénquima cerebral, aunque pueden mediar algunos efectos en el SNC por mecanismos indirectos o por una mínima infiltración a través de los plexos coroideos (Prinz y Priller, 2017).

3.2.1.2.2. Monocitos y CDM en la EA

En situaciones patológicas, los monocitos clásicos pueden migrar a través de la BHE e infiltrarse en el parénquima cerebral (Figura A.13). Para ello utilizan un mecanismo dependiente de CCR2 (El Khoury et al., 2007; Naert y Rivest, 2013; Zenaro et al., 2017), que se activa tras la liberación por células residentes de varias citoquinas y quimioquinas, como CCL2 o CXCL1 (Kim et al., 2014; Fani Maleki y Rivest, 2019; Kierdorf et al., 2019; Robichon et al., 2020). De hecho, tanto en cerebros de pacientes de EA como de modelos animales de la enfermedad se produce un aumento en la expresión de CCL2 (Zenaro et al., 2017). Además, el avance de la EA se acompaña de un aumento en la expresión de genes proinflamatorios en los



monocitos periféricos sanguíneos (Thome et al., 2018). Puesto que las CDM inflamatorias participan en mecanismos de fagocitosis, probablemente median la eliminación de A β desempeñando un papel beneficioso en la EA (El Khoury et al., 2007; Naert y Rivest, 2013; Zenaro et al., 2017). En este sentido, se ha descrito en modelos de EA que las CDM son más eficientes que la microglía eliminando depósitos cerebrales de A β (Thériault et al., 2015). Sin embargo, recientemente se ha publicado que estas células podrían originar déficits sinápticos y cognitivos, presentando un papel perjudicial en la patología de Alzheimer (Hohsfield et al., 2020). Otros autores afirman que, en modelos animales, las células mieloides asociadas a placas derivan exclusivamente de la microglía, sin que contribuyan los monocitos periféricos (Shukla et al., 2019; Reed-Geaghan et al., 2020). Este hecho, sumado a artículos previos que cuestionan la capacidad de los monocitos infiltrados para fagocitar A β (Varvel et al., 2015; Prokop et al., 2015), ha aumentado la controversia sobre el tema.

Por otra parte, se ha propuesto que los monocitos circulantes también parecen participar en la EA debido a su capacidad para transportar microagregados de A β desde la microvasculatura cerebral hacia la circulación sanguínea (Figura A.13, Michaud et al., 2013; Kierdorf et al., 2019).

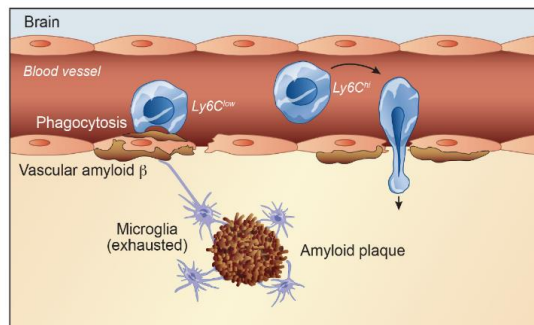


Figura A.13. Monocitos y CDM en la EA. La existencia de una microglía disfuncional alrededor de las placas de A β , junto a la disfunción cerebrovascular que sufren la mayoría de los pacientes de EA y que compromete la integridad de la BHE, podrían promover la entrada de monocitos clásicos (Ly6c^{high}) al parénquima cerebral. Estos monocitos, una vez infiltrados, pueden exacerbar o aliviar la progresión de la enfermedad. Los monocitos circulantes (Ly6c^{low}) son capaces de internalizar A β y transportarlo desde la microvasculatura del cerebro a la circulación sanguínea. Imagen tomada de Fani Maleki y Rivest, 2019.

En resumen, aunque los monocitos y las CDM son poblaciones inmunes periféricas muy estudiadas en la EA (Salani et al., 2019), sigue existiendo gran controversia sobre su posible infiltración en el parénquima cerebral y sobre su función en la patología.



3.2.1.3. Células dendríticas (CD)

Las células dendríticas (CD) son fagocitos mononucleares que coordinan la respuesta innata y adaptativa, actuando como células presentadoras de antígenos a través del Complejo Mayor de Histocompatibilidad I y II (MHC I y II; del inglés, *major histocompatibility complex*) (Pérez, 2019). Proceden de precursores de células madre hematopoyéticas distintos de los que originan monocitos y macrófagos (Guilliams et al., 2014). Además, en condiciones inflamatorias los monocitos también pueden originar CD (Ginhoux y Jung, 2014, Ludewig et al., 2016, van Uden et al., 2019).

Las CD cuando reconocen al antígeno, se activan y migran en busca de linfocitos T, iniciando así la respuesta inmune contra el patógeno (Ludewig et al., 2016; Villani et al., 2017; Chong et al., 2018). Además de las CD, los monocitos, CDMs y microglía también pueden expresar MHC II y actuar como células presentadoras de antígenos. Sin embargo, las CD tienen mayor capacidad para presentar antígenos y migrar a nodos linfáticos en busca de linfocitos T *naive* (Ludewig et al., 2016). Las CD tienen además función fagocítica (Villani et al., 2017; Chong et al., 2018).

3.2.1.3.1. Funciones de las CD

Las CD son heterogéneas y se clasifican en múltiples subtipos con funciones únicas. En la sangre, podemos encontrar CD convencionales (CDc) y CD plasmacitoides (CDp). Las CDc, identificadas por CD11c y HLA-DR (van Uden et al., 2019), presentan antígenos a las células T CD4 + y CD8+ (Villani et al., 2017). Se dividen en dos subtipos, CDc tipo 1 (CDc1), caracterizadas por expresar CD141, y CDc tipo 2 (CDc2), positivas para CD1c. Los CDc1 tienen alta capacidad intrínseca para realizar presentaciones cruzadas de antígenos a través de MHC I a las células T CD8+ y promover las respuestas de linfocitos T colaboradores o *helper* (Th) tipo 1 (Th1) y de células *natural killer* a través de IL-12. Sin embargo, las CDc2 humanas pueden secretar niveles más elevados de IL-12 por lo que también pueden realizar presentaciones cruzadas. Su activación se asocia con respuestas de linfocitos Th1, Th2, Th17, T CD8+ y T reguladores (Treg). Además, las CDc2 igual que los monocitos presentan un amplio rango de PRRs (Collin y Bigley, 2018; van Uden et al., 2019).

Por otra parte, las CDp se encuentran de forma normal en los tejidos linfoides y en la sangre, no expresan CD11c, pero sí HLA-DR y CD123. Durante la inflamación, las CDp se dirigen hacia los tejidos periféricos, producen IFN tipo I y promueven la activación de las células inmunes tipo B (Reizis, 2019; van Uden et al., 2019), y la generación de células plasmáticas en respuesta a infecciones virales (Ludewig et al., 2016). Se ha demostrado que las CDp maduras inducen la diferenciación de las células T CD4 *naive* a linfocitos Treg. Por lo tanto, las CDp pueden inducir respuestas inmunogénicas de células T o mostrar funciones tolerogénicas favoreciendo la deleción de linfocitos T CD8+, la anergia de células T CD4+ y la diferenciación de Treg (Swiecki y Colonna, 2015; Ludewig et al., 2016).



A pesar de esta clasificación clásica, mediante la utilización de secuenciación de ácido ribonucleico (ARN) de célula única, se han identificado seis poblaciones de CD en sangre humana, revelando un nuevo subconjunto dentro de las CDc1 y redefiniendo las CDp (Villani et al., 2017). Por lo tanto, aún no está claro cuántos subtipos de CD existen, cómo están relacionados entre sí y cómo difieren de otros fagocitos mononucleares.

En condiciones fisiológicas, las CD están ubicadas estratégicamente en regiones en contacto con el LCR, como ventrículos y plexo coroideo, además de en las meninges (Mrdjen et al., 2018). Sin embargo, existen discrepancias sobre la existencia de CD en el parénquima del SNC humano (Brezovakova et al., 2018). La identificación de estas células en el parénquima ha estado limitada por varios factores, como la consideración de que el cerebro era un órgano inmunoprivilegiado, la caracterización incompleta de las CD, y la similitud en la expresión de marcadores de diferentes células inmunes. En este sentido se ha descrito que la microglía en condiciones inflamatorias puede expresar marcadores de superficie de las CD, como CD11c y MHC II (Kamphuis et al., 2016; Dando et al., 2016).

3.2.1.3.2. CD en la EA

A día de hoy es tema de debate la posible presencia de CD en el parénquima cerebral de pacientes de EA (Brezovakova et al., 2018). El descenso de CDc en sangre periférica de enfermos de Alzheimer (Ciaramella et al., 2016) ha planteado la posibilidad de su posible reclutamiento al cerebro (Brezovakova et al., 2018).

Las CD podrían entrar en contacto con los péptidos de A β excretados a través de la BHE, madurar y migrar a los ganglios linfáticos cervicales para activar a los linfocitos T *naive* (Ludewig et al., 2016). En modelos transgénicos de EA, cuando las CD periféricas se infiltran en el parénquima cerebral participan en la eliminación de placas amiloides (Butovsky et al., 2007). Sin embargo, estudios *in vitro* demuestran que en presencia de A β 42 las CD adquieren un fenotipo inflamatorio y una menor capacidad para presentar antígenos (Ciaramella et al., 2009; Ciaramella et al., 2010). Además, la función neurotrófica de las CD está alterada en pacientes de EA, pudiendo contribuir a la neurotoxicidad que ocurre en la patología (Ciaramella et al., 2013).

También existe controversia sobre el origen de estas células. Por una parte, se ha demostrado que las células microgliales pueden expresar marcadores de superficie característicos de CD. También es posible que en situaciones patológicas los monocitos se infiltren en el SNC y originen CD derivadas de monocitos. Además, las CD del plexo coroideo, ventrículos y meninges podrían migrar al parénquima cerebral en condiciones patológicas, como la EA. También podría producirse una entrada directa de CD a través del sistema linfático (Ludewig et al., 2016).

En resumen, aunque se ha descrito la presencia de células presentadoras de antígenos con fenotipo similar a las CD en el parénquima cerebral de enfermos de Alzheimer (Serrano-Pozo et al., 2013a; Ludewig et al., 2016), a día de hoy sigue sin aclararse su origen, que podría ser microglial y/o periférico, y su función.



3.2.1.4. Neutrófilos

Los neutrófilos son células circulantes de vida relativamente corta y acción muy rápida, capaces de fagocitar y producir enzimas líticas y agentes reactivos. Una peculiaridad de los neutrófilos es su función antibacteriana extracelular, mediada por la liberación de su contenido a los tejidos infectados (NET, del inglés, *Neutrophil Extracellular Traps*) (Pérez, 2019).

Los neutrófilos son células altamente reactivas que liberan ROS, enzimas, NETs y citoquinas, y, por lo tanto, ante una situación inflamatoria crónica pueden causar un importante daño tisular, aunque su número sea reducido. De hecho, la simple adhesión a la pared de un vaso es suficiente para inducir lesiones endoteliales (Zarbock y Ley, 2008; DiStasi y Ley, 2009; Zenaro et al., 2017).

Se ha descrito por varios investigadores la presencia de neutrófilos en el cerebro de EA (Savage et al., 1994; Zenaro et al., 2015; Katayama, 2020). Además, se ha propuesto que, en los cerebros de pacientes y modelos de EA, los neutrófilos se adhieren intravascularmente y migran hacia áreas del parénquima con depósitos de A β , lo que sugiere que el A β determina el reclutamiento y el posicionamiento de los neutrófilos en el cerebro de EA (Savage et al., 1994; Baik et al., 2014; Zenaro et al., 2015; Zenaro et al., 2017). Los neutrófilos extravasados producen NET e IL-17 que pueden dañar la BHE y las células neurales (Zenaro et al., 2015; Zenaro et al., 2017).

En los modelos animales de EA, la infiltración de los neutrófilos se inicia antes del declive cognitivo y alcanza niveles máximos cuando aparece la pérdida de memoria, lo que sugiere su posible contribución en el fallo cognitivo, que, además, se restaura tras la depleción de los mismos (Zenaro et al., 2015).

3.2.2. Respuesta inmune adaptativa

La inmunidad adquirida es adaptativa (dependiente de la naturaleza del agresor) y específica (se basa en el reconocimiento específico de la estructura molecular del patógeno). El resultado final es la inmunización, cuyo fin es proporcionar una protección rápida y eficaz frente a un patógeno reconocido tras una primera agresión. Esta especificidad puede permanecer indefinidamente en virtud de un fenómeno conocido como memoria inmunitaria, según el cual la inmunidad específica frente a un patógeno permanece latente hasta que vuelva a ocurrir la exposición.

Gracias a su capacidad para reconocer antígenos específicos, los linfocitos son las células especializadas en la respuesta inmune adaptativa. Procedentes de los precursores hematopoyéticos de la médula ósea, los linfocitos se diferencian en dos subpoblaciones que maduran en los órganos linfoides primarios: los linfocitos B, en la médula ósea, y los linfocitos T, en el timo (Pérez, 2019).

La inmunidad innata activa los mecanismos que generan inmunidad adaptativa, por lo que ambas son interdependientes. La estimulación de los linfocitos comienza con la presentación del antígeno a los receptores de los linfocitos *naive*, lo que induce su transformación linfoblástica y la consecuente proliferación celular con



especificidad antigénica. Tras la estimulación, los linfocitos pueden asumir el rol de célula efectora, y producir una respuesta celular en el caso de los linfocitos T, humoral por parte de los linfocitos B, o el rol de célula de memoria (Pérez, 2019). Las células de memoria permanecen en estado latente en espera de una nueva exposición al antígeno, garantizando la memoria inmunológica y aumentando la eficacia del sistema inmune (Kielian, 2006).

Las principales moléculas que participan en la inmunidad adquirida son las inmunoglobulinas que actúan reconociendo específicamente a los patógenos. Además, el complemento y las citoquinas también están involucrados en los mecanismos de la inmunidad adquirida (Pérez, 2019).

3.2.2.1. Linfocitos B

Son los mediadores de la respuesta inmune adaptativa humoral. Se generan en la médula ósea como linfocitos B inmaduros (inactivos), y sufren una serie de diferenciaciones hasta convertirse en formas activas. Para que un linfocito B se active es necesario que entre en contacto con un antígeno, lo que desencadena una serie de vías de señalización que concluyen con la producción de anticuerpos específicos contra ese antígeno (Montserrat-Sanz et al., 2017b).

Una vez activadas, las células B proliferan y se diferencian con la misma especificidad antigénica, lo que se conoce como selección clonal (Pérez, 2019). Tras este proceso, se producen linfocitos B productores de IgM (inmunoglobulina M), responsables de la respuesta inmune primaria, y linfocitos B de memoria, que tras una segunda exposición al antígeno activan la producción de anticuerpos IgG de alta afinidad (respuesta inmune secundaria) (Fettke et al., 2014). Estas células B diferenciadas encargadas de la síntesis de inmunoglobulinas se denominan células plasmáticas (Pérez, 2019).

Además de su función principal como productores de anticuerpos específicos, los linfocitos B pueden actuar como células presentadores de antígeno para iniciar la respuesta inmune de los linfocitos T a través de los receptores transmembrana BCR (del inglés, *B cell receptors*). Otra función de los linfocitos B es la modulación de la respuesta de linfocitos T y células dendríticas mediante la producción de citoquinas inmunomoduladoras (Kristensen, 2016).

3.2.2.2. Linfocitos T

Son los encargados de desarrollar la respuesta inmune adaptativa celular. Estas células se producen en los órganos linfoides como células T inactivas, y al igual que los linfocitos B, se activan y diferencian cuando entran en contacto con el antígeno. Para interactuar con el resto de las células, los linfocitos T presentan receptores de membrana TCR (del inglés, *T cell receptor*) que forman un complejo con el correceptor CD3 (Montserrat-Sanz et al., 2017b).

Las células T se clasifican en linfocitos T colaboradores o *helper* (Th) y linfocitos T citotóxicos (Tc), en base a su función, receptores de superficie y a las citoquinas que producen (Pérez, 2019). Los primeros expresan el correceptor CD4,



mientas que los linfocitos Tc son CD8+. Estas proteínas transmembranas de la familia de las IgR, se expresan en la superficie celular, y median la interacción entre los receptores TCR y el MHC que desencadena la respuesta inmune mediada por linfocitos T (Overgaard et al., 2015).

3.2.2.2.1. Linfocitos T colaboradores o *helper* (Th)

Colaboran, mediante la liberación de citoquinas, con los linfocitos B, otros linfocitos T, y otras células inmunes para que se desarrolle correctamente la respuesta inmune adaptativa.

Los linfocitos Th son CD4+, reconocen el MHC de clase II y generalmente responden a antígenos extracelulares. Según su perfil de citoquinas y función se clasifican en varios subtipos: Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh y Treg (Pérez, 2019; Ní Chasaide y Lynch, 2020). Los linfocitos proinflamatorios y citotóxicos Th1, producen Interferón- γ (IFN- γ), Interleuquina-12 (IL-12) y Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α), y los Th17 producen IL-17, IL-6 y TNF- α , entre otras citoquinas. En sentido opuesto, los linfocitos Th2, que expresan mayoritariamente IL-4, se consideran antiinflamatorios y protectores, ya que suprimen la respuesta mediada por los linfocitos Th1. Los linfocitos Treg son FOXP3+, y liberan citoquinas regeneradoras como TGF- β (del inglés, *Transforming growth factor- β*) e IL-10, y son capaces de suprimir la respuesta inflamatoria-citotóxica (Allegra et al., 2019; Feng et al., 2015).

3.2.2.2.2. Linfocitos T citotóxicos (Tc)

Estos linfocitos son CD8+ y reconocen el MHC de clase I (Pérez, 2019). Los linfocitos Tc participan en la citotoxicidad celular, mediante la producción y liberación de proteínas citotóxicas como IFN- γ , perforinas y granzimas, con el fin de eliminar al patógeno causante de la respuesta inflamatoria. Una vez eliminado el patógeno la mayoría de los linfocitos Tc mueren, aunque una pequeña proporción se conserva como “linfocitos Tc de memoria” y pueden llegar a mantenerse a lo largo de toda la vida del individuo (Gray et al., 2014).

3.2.2.3. Linfocitos en la EA

En condiciones fisiológicas, los linfocitos son relativamente escasos en el SNC, a pesar de que su alta capacidad para secretar factores moduladores los coloca en una buena posición para influir en las células residentes del SNC (Greenhalgh et al., 2020). En tejido *post mortem* de individuos con EA, así como en modelos de esta patología, existen linfocitos T CD4+ y CD8+, tanto en el endotelio vascular como en el parénquima cerebral (Ferretti et al., 2016; Unger et al., 2018; Merlini et al., 2018), principalmente en las áreas más afectadas como el hipocampo y otras estructuras límbicas (Zenaro et al., 2017; Pietronigro et al., 2019). Además, los pacientes con MCI y fases iniciales de EA tienen en LCR un mayor número de linfocitos T CD4+ y CD8+ activos que los controles, lo que sugiere que estas células migran de la sangre al cerebro durante la patología (Lueg et al., 2015).

Se han propuesto distintos mecanismos implicados en la entrada de los linfocitos en el cerebro de pacientes de Alzheimer. Una posibilidad es que el aumento



en la producción de ciertas quimioquinas (CCL3, CXCL10, CCR5) (McManus et al., 2014; Ní Chasaide y Lynch, 2020) por parte de la microglía, astrocitos o células endoteliales origine un gradiente quimiotáctico que los atraiga (Zenaro et al., 2017; Li et al., 2019b). TGF- β también podría ser determinante, ya que interviene en la activación endotelial y la deposición de A β (Yang et al., 2013). Se ha descrito que la amiloidosis cerebral promueve la migración de linfocitos T al cerebro y la expresión de moléculas de adhesión en los vasos (Ferretti et al., 2016). También se ha propuesto que la inflamación periférica favorece la entrada de linfocitos T activados al cerebro (McManus et al., 2014). Por último, hay que considerar que los enfermos de EA pueden presentar alteraciones en la BHE.

Existen numerosos estudios en modelos animales que tratan de esclarecer la función de los linfocitos en la EA. A día de hoy, no existe nada concluyente al respecto, y, mientras algunos autores atribuyen a estas células un rol perjudicial (Browne et al., 2013; McManus et al., 2014; Späni et al., 2015), otros sugieren que son beneficiosos (Marsh et al., 2016; Dansokho et al., 2016).



B. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



El impacto sociosanitario que supone la EA exige una terapia eficaz urgente para evitar en los próximos años un problema más grave de salud mundial. Hasta la fecha, la mayoría de las terapias utilizadas en los ensayos clínicos se han dirigido contra las patologías amiloide y Tau, pero han resultado ineficaces (Muñoz-Castro et al., 2020). En los últimos años está cobrando importancia la hipótesis de que la respuesta inmune mediada por las células gliales (microglía y astrocitos) desempeña un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad (Heneka et al., 2015).

Nuestro laboratorio lleva más de una década caracterizando las alteraciones moleculares en el hipocampo y corteza frontal de distintos modelos transgénicos con sobreexpresión de A β y/o Tau, y, más recientemente, de pacientes de Alzheimer, con el fin de identificar biomarcadores y dianas terapéuticas de interés. Actualmente, nuestro objetivo principal es descifrar el papel de la respuesta inmune y, en concreto, de las células de la microglía y la astrogliosis durante la progresión de la enfermedad. En este sentido, es clave entender los diferentes fenotipos y perfiles funcionales (neuroprotector, neurotóxico y/o degenerativo) de dichas células gliales.

En la EA la microglía activa se ha asociado clásicamente a la producción de factores inflamatorios y neurotóxicos (Heneka et al., 2015), que podrían contribuir al daño neuronal y al deterioro cognitivo (Holmes et al., 2009; Navarro et al., 2018). Esta idea deriva de los resultados obtenidos en modelos transgénicos, muchos de ellos descritos por nuestro laboratorio (Jimenez et al., 2008; Moreno-Gonzalez et al., 2009; Baglietto-Vargas et al., 2017; Gutierrez y Vitorica, 2018). Sin embargo, nuestros resultados en el hipocampo de pacientes de Alzheimer demuestran una respuesta microglial leve y tardía (Navarro et al., 2018), junto a una importante degeneración microglial, promovida posiblemente por formas solubles de Tau hiperfosforilada (Sanchez-Mejias et al., 2016). De forma similar, en el modelo ThyTau22, con importante acumulación de formas solubles de Tau hiperfosforilada, no se produce activación, pero sí degeneración microglial (Romero-Molina et al., 2018). Estos resultados reflejan que existen importantes diferencias en la respuesta microglial entre modelos animales y pacientes de Alzheimer (Navarro et al., 2018), y nos llevan a hipotetizar que también se produzcan diferencias entre las distintas regiones cerebrales humanas, con distintos perfiles de acumulación de A β y Tau (Jucker y Walker, 2011).

Los astrocitos por su parte desempeñan importantes funciones neuroprotectoras en condiciones no patológicas (Vasile et al., 2017; Liddeloy y Barres, 2017; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018), aunque se desconoce su papel específico en el desarrollo de la EA. Se ha demostrado que los astrocitos se activan alrededor de las placas de A β (Zhang et al., 2010; Medeiros y LaFerla, 2013; Zhang y Jiang, 2015), pero no se han detallado sus patrones de expresión génica, ni cómo los factores que secretan contribuyen al desarrollo de la patología. Basándonos en estudios previos del laboratorio en modelos animales de EA (Sanchez-Mico, 2019), en este proyecto postulamos que, en el entorno patológico de la EA, los astrocitos reactivos median una respuesta exacerbada del complemento y alteran su metabolismo, lo que probablemente implique la pérdida de su capacidad neuroprotectora. La modulación de la respuesta inflamatoria hacia un efecto



protector en lugar de citotóxico podría constituir una buena diana terapéutica. Sin embargo, esta hipótesis de trabajo se basa en datos obtenidos en modelos de EA, que obligatoriamente tienen que ser refrendados en pacientes de Alzheimer. Además, se desconocen las causas (entre las que podrían estar A β y/o formas fosforiladas de Tau) y consecuencias de esta activación astrogliar. Por tanto, se requiere una caracterización detallada y profunda de la respuesta y firma astrogliar en pacientes de la EA.

En condiciones fisiológicas las células gliales son las principales mediadoras de la respuesta inmune en el parénquima del SNC (Liu et al., 2014; Heneka et al., 2015; Hane et al. 2017a). Según nuestra hipótesis, en la EA estas células podrían perder capacidad protectora y ganar funciones tóxicas (Navarro et al., 2018; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018; Sánchez-Mejías et al., 2016), mediando un ambiente proinflamatorio y la liberación de quimioquinas que facilitarían, unido a las posibles alteraciones en la BHE, la entrada de células del sistema inmune periférico, como ocurre en otras patologías neurodegenerativas (Bogie et al., 2014; Zondler et al., 2016; Engelhardt et al., 2017, Prinz y Priller, 2017; Sevenich, 2018). Sin embargo, a día de hoy, no está claro si en el cerebro de enfermos de Alzheimer se produce infiltración de células mieloides periféricas (Hohsfield y Humpel, 2015; Prinz y Priller, 2017; Sweeney et al., 2018; Fani Maleki y Rivest, 2019), debido principalmente a la dificultad para diferenciarlas de la microglía (Bennett et al., 2016). Las células derivadas de monocitos (CDM), una vez infiltradas, podrían contribuir al ambiente proinflamatorio y citotóxico o, por el contrario, realizar funciones protectoras, y ayudar a las células gliales disfuncionales, incapaces de frenar *per se* la patología. Además, las CDM infiltradas, podrían modularse a nivel periférico, y ser una diana terapéutica potencial. Por ello resulta indispensable aclarar si las CDM son capaces de acceder al SNC de enfermos de Alzheimer, y, en caso afirmativo, desvelar su función.

En el presente proyecto planteamos, por tanto, un nuevo escenario patogénico en la enfermedad de Alzheimer que pretende dar respuestas al continuo fallo de traslación de los estudios en modelos a la clínica humana. En conjunto, nuestra **hipótesis** de trabajo propone que las células gliales manifiestan gran heterogeneidad fenotípica y regional en el cerebro de enfermos de Alzheimer, y que probablemente la progresión de la patología esté asociada a la disfunción de dichas células. En este sentido, resulta esencial determinar los perfiles funcionales (neuroprotector, neurotóxico y/o degenerativo) de la microglia y los astrocitos con la evolución de la enfermedad de Alzheimer.

Basándonos en la hipótesis anteriormente expuesta, los **objetivos principales** de este trabajo de Tesis doctoral son, por una parte, definir la firma molecular de microglía y astrocitos en pacientes de Alzheimer, así como caracterizar su heterogeneidad morfológica, regional y funcional, y, por otra, determinar si se produce infiltración de células inmunes periféricas en el SNC de dichos pacientes. Los resultados de este proyecto van a permitir desvelar nuevos mecanismos implicados en la EA y, a su vez identificar posibles dianas de interés terapéutico que podrán ser utilizadas en el desarrollo de nuevas estrategias



neuroprotectoras. De forma más detallada, durante este proyecto abordamos los siguientes objetivos:

1. Caracterización de la patología y de la respuesta microglial en la corteza frontal de pacientes de Alzheimer.

Pretendemos analizar los principales rasgos neuropatológicos en muestras de corteza frontal de individuos clasificados en función del estadio Braak, con el fin de compararlos con los que se producen en el hipocampo, región estudiada en detalle por nuestro grupo de investigación en los últimos años. Este objetivo se divide en dos subapartados:

1.1. Estudio de las alteraciones patológicas en la corteza frontal en relación con el hipocampo en la EA.

Cuantificaremos los niveles de A β y Tau por western blot, y la pérdida a nivel de ARNm de neuronas GABAérgicas PV+ en corteza frontal respecto al hipocampo. Además, estudiaremos el efecto de las especies de A β y Tau sobre la supervivencia de estas neuronas PV+.

1.2. Análisis de la respuesta microglial en la corteza frontal de pacientes de Alzheimer.

Determinaremos la expresión de diferentes genes de población microglial, tanto homeostáticos como del fenotipo DAM, y estudiaremos su evolución con la progresión de la patología, el genotipo APOE y la patología amiloide.

2. Estudio de la respuesta astrogliar en la patología de Alzheimer.

Para definir la firma molecular y función de los astrocitos en la EA establecemos diferentes subobjetivos:

2.1. Análisis de la reactividad astrogliar en muestras *post mortem* de pacientes de Alzheimer.

Analizaremos la expresión de genes de astrocitos reactivos con la progresión de la patología de Alzheimer, tanto en hipocampo como en corteza frontal, así como la relación entre la reactividad astrogliar y ciertos parámetros característicos de la EA, como el genotipo APOE, la neurodegeneración GABAérgica y las patologías A β y Tau.

2.2. Estudio de la respuesta del complemento en el hipocampo y la corteza frontal de pacientes de EA.

Analizaremos la expresión de genes relacionados con el sistema del complemento en muestras de hipocampo y corteza frontal humanas clasificadas en función de su estadio Braak, y su posible relación con la reactividad astrogliar, el genotipo APOE, la neurodegeneración GABAérgica y las patologías A β y Tau.



2.3. Estudio de la alteración del metabolismo y función neuroprotectora de los astrocitos en el contexto patológico de la EA.

Para entender las causas y consecuencias del fenotipo hipometabólico de los astrocitos en el contexto de la patología de Alzheimer, caracterizaremos el efecto de formas solubles de A β y Tau fosforilado sobre el metabolismo de los astrocitos primarios *in vitro*, así como su repercusión sobre cultivos neuronales. Además, evaluaremos, si es posible, el estado metabólico de los astrocitos aislados de modelos murinos amiloidogénicos. Por último, con el fin de evaluar la disfunción metabólica astrogliar en astrocitos humanos, determinaremos la expresión, mediante técnicas transcriptómicas, de genes que codifican enzimas claves del metabolismo astrogliar en el hipocampo de pacientes de Alzheimer.

3. Análisis de la posible infiltración de células inmunes en el parénquima cerebral de pacientes de Alzheimer.

Realizaremos distintos abordajes experimentales que permitan diferenciar las células mieloides periféricas de la microglía con el fin último de aclarar si las células inmunes se infiltran o no en el parénquima cerebral de modelos animales y de pacientes de Alzheimer. En caso afirmativo, estudiaremos en el hipocampo de pacientes de Alzheimer la relación de la infiltración con la historia clínica y otros parámetros característicos de la EA, como la acumulación de A β /Tau, genotipo APOE y pérdida de neuronas GABAérgicas, entre otros.

4. Caracterización de diferentes subpoblaciones o estados de astrocitos y microglía en pacientes de Alzheimer mediante inmunohistoquímica fluorescente múltiple.

Para ello utilizaremos una novedosa aproximación experimental que permite analizar, por primera vez, la heterogeneidad fenotípica de las células gliales en pacientes de Alzheimer con elevada resolución y manteniendo la celularidad, morfología y distribución espacial en el tejido. Esta parte del proyecto se ha realizado durante una estancia predoctoral en el laboratorio de los doctores Alberto Serrano-Pozo y Bradley Hyman, en el *Massachusetts General Hospital (Harvard Medical School)*, Estados Unidos).



C. MATERIALES Y MÉTODOS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



1. Muestras humanas *post mortem*

Las muestras de hipocampo y corteza frontal utilizadas en este trabajo proceden de necropsias de individuos control y pacientes en diferentes estadios de la EA. La clasificación de estos pacientes se ha realizado de acuerdo con la patología de Tau presente en el cerebro, según los estadios de Braak (Braak y Braak, 1991) (Ver Introducción, Apartado A.2). Las muestras controles, denominadas en este trabajo Braak 0, proceden de individuos sin ninguna enfermedad psiquiátrica o neurológica conocida, y carecen de lesiones neuropatológicas.

En la Tabla 1, se especifica el número de muestras de hipocampo y corteza frontal utilizadas, clasificadas según su estadio Braak. Se especifican los porcentajes de individuos de cada género y genotipo APOE, así como los datos medios de edad y tiempo *post mortem* transcurrido desde la muerte hasta la toma de muestra.

Estadio Braak	Edad (años)	Género (%)		Genotipo APOE (%)				Tiempo <i>post mortem</i> (h)
		Masculino	Femenino	ε2ε3	ε3ε3	ε3ε4	ε4ε4	
Hipocampo								
Braak 0 (n=8)	49,50 ± 5,95	62,50	37,50	0,00	66,67	0,00	33,33	7,19 ± 3,29
Braak II (n=26)	77,50 ± 8,81	53,85	46,15	9,09	77,27	9,09	4,55	8,33 ± 5,05
Braak III-IV (n=15)	79,42 ± 12,37	50,00	50,00	7,69	61,54	30,77	0,00	5,42 ± 4,80
Braak V-VI (n=44)	77,98 ± 12,48	43,18	56,82	5,56	69,44	22,22	2,78	8,99 ± 4,55
Corteza frontal								
Braak 0 (n=18)	55,22 ± 11,64	72,22	27,78	11,11	77,78	11,11	0,00	8,46 ± 5,72
Braak II (n=14)	76,64 ± 8,27	50,00	50,00	14,29	57,14	28,57	0,00	7,77 ± 5,11
Braak III-IV (n=12)	86,58 ± 6,24	33,33	66,67	0,00	66,67	33,33	0,00	5,50 ± 3,83
Braak V-VI (n=27)	76,48 ± 13,29	44,44	55,56	7,41	66,67	25,93	0,00	8,94 ± 4,29

Tabla C.1. Datos referentes a las muestras humanas de hipocampo y corteza frontal empleadas en el presente estudio. Los individuos se clasifican según el estadio Braak, indicándose el número de muestras en cada grupo, los porcentajes de individuos de cada género y genotipo APOE y los datos medios ± desviación estándar de la edad y el tiempo *post mortem* transcurrido desde la muerte hasta la toma de muestra.

Las muestras proceden, siguiendo las normas generales de la legislación española y del comité ético local, del Banco de Tejido para Investigación Neurológica (BTIN) de Madrid, perteneciente a la Fundación CIEN del Instituto de Salud Carlos III; del Banco de Tejidos Neurológicos del Servicio de Anatomía Patológica,



perteneciente al IDIBELL-Hospital Universitario de Bellvitge, de Barcelona; del Banco de Tejidos Neurológicos BioBanc del Hospital clínico-IDIBAPS, en Barcelona; y del Banco de Cerebros de la Región de Murcia del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, en Murcia. Este proyecto ha sido aprobado por el Portal de Ética de la Investigación Biomédica de Andalucía (PEIBA) de la Consejería de Salud, así como por los propios Comités Éticos de los respectivos Bancos de Tejidos y el Comité Ético de Investigación de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena-Virgen del Rocío.

El tejido, una vez extraído, se mantiene a -80°C hasta su uso, para evitar la degradación de proteínas y ARN. Las muestras de la necropsia se dividen aún congeladas en secciones de 70-90 mg para la extracción de proteínas, ARN y ADN (Apartado C.10).

2. Animales de experimentación

En el presente trabajo, hemos utilizado ratones de entre 2 y 18 meses de edad, de las líneas transgénicas APP_{751SL} (APP) y TAU P301S (TAU). Como controles, hemos usado los correspondientes ratones no transgénicos (WT, del inglés *wild type*) con el mismo fondo genético (C57BL/6J) y edad. En cada diseño experimental, las muestras de diferentes genotipos y edades se procesan de forma simultánea. Además, se han utilizado ratones no transgénicos con fondo genético CD1 en etapas embrionarias y neonatales para la generación de cultivos celulares primarios (Apartado C.3).

Los ratones APP sobreexpresan el gen APP751 humano con las mutaciones *Swedish* (KM670/671NL) y *London* (V717I) de Alzheimer familiar, bajo el control del promotor Thy-1. Estos ratones han sido suministrados por Sanofi-Aventis (Paris, Francia).

Los ratones TAU (Línea PS19) expresan la forma humana de Tau con 4 repeticiones y un inserto N-terminal (4R/1N), con la mutación P301S, bajo el control del promotor de la proteína priónica (Prnp) (Yoshiyama et al., 2007). Este modelo procede de Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine).

Los animales se crían y mantienen, hasta su uso, en los animalarios del Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla y del Servicio de Producción y Experimentación Animal del Instituto de Biomedicina de Sevilla. Se mantienen a temperatura media de 21°C con un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 de oscuridad. Todos los animales, durante la permanencia en el animalario, disponen de libre acceso al agua y una dieta estándar.

Todos los experimentos se han realizado de acuerdo con las directrices del Parlamento Europeo y del Consejo (Directiva 2010/63/UE), siguiendo la normativa española (Real Decreto 53/2013), para la protección de animales utilizados en experimentación. Además, los experimentos han sido aprobados por el Comité Ético de Uso de Animales para la Investigación de la Universidad de Sevilla. El número de animales empleados, así como el estrés y sufrimiento de éstos durante la



manipulación y experimentación, se ha reducido al máximo, de acuerdo con la regla de las 3R (reemplazar, reducir y refinar).

3. Cultivos celulares primarios

En todos los casos, las células se incuban a 37°C, en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂, y su manipulación se lleva a cabo bajo condiciones de esterilidad, utilizando una campana de flujo laminar y material estéril.

3.1. Cultivos mixtos de microglía y astrocitos

Los cultivos primarios de microglía y astrocitos se realizan tal y como se describe en Jimenez et al. (2008) a partir de la disgregación mecánica y química de la corteza y el hipocampo de ratones CD1 neonatales (P1-P3). Tras la decapitación de los ratones, extraemos el cerebro y retiramos las meninges. Separamos cortezas e hipocampos del resto del cerebro y se mantienen en PBS (Biowest) frío con antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (Biowest)). Homogenizamos el tejido suavemente con tijeras de cirugía en Tripsina-EDTA 1x (Biowest) en PBS, empleando 500 µl por cada dos cerebros, e incubamos a 37°C durante 5 minutos. Este proceso se repite hasta que el tejido queda completamente homogeneizado. Posteriormente, añadimos medio completo con suero fetal bovino inactivado (SFB; Biowest), para inhibir la tripsina, y la suspensión de células obtenida se pasa por un filtro de nylon con diámetro de poro de 40 µm (Fisher Scientific). Sembramos las células en placas de 24 pocillos, a una densidad de 500.000 células por pocillo (área por pocillo: 1,77cm²; Nunc). Estas placas de cultivo son tratadas previamente con poli-D-lisina (Sigma-Aldrich) a 100 µg/ml, durante un mínimo de 2 horas a 37°C, y lavadas con agua destilada.

Las células se mantienen en medio completo de mixtos, compuesto por DMEM-F12 (Biowest), suplementado con SFB 10%, aminoácidos no esenciales 1x (Biowest), 10 µg/ml de gentamicina (Biowest), 2mM de L-Glutamina (Biowest), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. A los 2 días, retiramos la mitad del medio y reponemos con medio nuevo. Cada 4 días, renovamos el medio completamente.

3.1.1. Aislamiento de astrocitos

La obtención de cultivos enriquecidos en astrocitos se realiza entre los días 20 y 25 del cultivo mixto. En primer lugar, retiramos el medio de cultivo, que se encuentra condicionado por los factores liberados por las células, aunque lo reservamos para volver a añadir a la placa enriquecida en microglía al final. Lavamos la placa con PBS estéril para retirar restos de suero y añadimos medio de aislamiento, compuesto por Tripsina 0,25%-EDTA 1 mM (Biowest) y DMEM-F12 en una proporción 1:3. Las células se incuban durante 10-45 min a 37°C, tiempo en el que los astrocitos se despegan de la placa de cultivo, mientras que la microglía mantiene su adherencia a la misma. Una vez los astrocitos se han despegado, añadimos medio de cultivo completo para inactivar la tripsina y recogemos el sobrenadante, donde se encuentran los astrocitos. La placa original, en la que queda principalmente microglía, se lava con PBS y se le añade el medio condicionado



retirado previamente mezclado con medio de cultivo nuevo en proporción 1:1. Por otro lado, los astrocitos se centrifugan a 800 x g durante 5 minutos, se suspenden en medio completo y se cultivan a una densidad de 500.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos, previamente tratadas con poli-D-lisina.

3.2. Cultivos de neuronas

Los cultivos primarios de neuronas se realizan según se describe en García-Junco-Clemente et al. (2010). Estas células se obtienen a partir del hipocampo de fetos de ratones CD1, cuando la madre se encuentra en el día 17 de gestación (T17). Tras la extracción de las crías y su decapitación, obtenemos el cerebro, retiramos las meninges y aislamos el hipocampo, manteniéndose en medio de disociación frío compuesto de Hanks' Balanced Salt solution (HBSS; Biowest), glucosa 10mM (Sigma-Aldrich) y HEPES 10mM (Sigma-Aldrich). Una vez extraídos los hipocampos, se incuban durante 3 minutos, a 37°C y agitación suave en una solución de papaína 41 U/ml (Worthington) con L-cisteína 0.06% (p/v) (Sigma-Aldrich) en medio de disociación. Posteriormente, lavamos 3 veces con Inhibidor de Tripsina 1mg/ml (Sigma-Aldrich) en medio de disociación, e incubamos con dicho inhibidor durante 4 minutos, a 37°C y agitación suave. A continuación, disgregamos mecánicamente el tejido en presencia de medio compuesto por DMEM-F12 suplementado con glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1%, glucosa 20 mM y suero de caballo inactivado 10% (HS; Biowest). Finalmente, las células se siembran en placas de 24 pocillos, en las que se han depositado lamelas de 12 mm de diametro tratadas con poli-D-lisina, en las condiciones previamente indicadas, a una densidad de 50.000 células por pocillo. Tras dos horas, sustituimos el medio por medio de neuronas, compuesto por Neurobasal (Gibco), B27 2% (Gibco), Glutamax 2 mM (Gibco), 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina. Cada 2-3 días, retiramos la décima parte del medio y añadimos el equivalente a una cuarta parte del total de medio de neuronas nuevo.

4. Aislamiento de proteínas solubles (S1)

Este método nos permite separar la fracción soluble de proteínas extracelulares y citosólicas mediante ultracentrifugación diferencial en medio acuoso y en ausencia de detergentes. Para ello, los ratones se anestesian con una dosis letal de tiopental (Braun, 90-120mg/Kg peso ratón) y se perfunden transcárdialmente con PBS estéril frío durante 5 minutos a un flujo continuo de 10 ml/minuto, utilizando una bomba de perfusión (DINKO Mod. D-25V). Tras este paso, se procede a decapitar a los animales y a extraer la corteza, que puede utilizarse directamente o congelarse, como etapa intermedia, a -80°C. Disgregamos el tejido cortical en tampón isotónico Tris-salino [NaCl 140 mM en Tris-HCl 20 mM (PanReac AppliChem), pH 7,4], al que se añade un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche) y fosfatasas (Sigma-Aldrich). La disgregación se realiza usando tijeras apropiadas hasta que el tejido queda totalmente fraccionado. A continuación, la suspensión de tejido resultante se pasa a un homogeneizador Dounce (Wheaton) y se somete a 15 pases con el pistilo de menor diámetro (paso de luz: 0,089-0,14 mm) y 15 pases con el de mayor diámetro (paso de luz: 0,025-0,076 mm). El homogenado se centrifuga a 100.000 x g durante 1



hora a 4°C (Optima Max, Beckman Coulter). El sobrenadante obtenido de esta ultracentrifugación corresponde a la fracción proteica soluble o S1, mientras que en el precipitado quedan los restos de membranas, agregados proteicos y proteínas insolubles (P1). Las proteínas de la fracción S1 se cuantifican mediante el método de micro-Lowry (Apartado C.13), y se conservan a -80°C hasta su uso.

5. Estudio del metabolismo de los astrocitos primarios mediante Seahorse

El fenotipo energético de los astrocitos primarios se determina empleando el analizador de flujo extracelular Seahorse XFp (Agilent), que permite medir la velocidad de consumo de oxígeno (OCR, del inglés *oxygen consumption rate*) y la velocidad de acidificación extracelular (ECAR, del inglés *extracellular acidification rate*) de células vivas en tiempo real. Por tanto, podemos estudiar la **respiración mitocondrial**, ligada al consumo de oxígeno, y la **glucólisis** en condiciones basales, ya que la acidificación del medio depende de la producción de lactato por esta vía.

Además, hemos analizado la OCR y la ECAR tras la inyección de diferentes compuestos para modular el metabolismo. En concreto, en este trabajo hemos empleado de forma secuencial cuatro inhibidores mitocondriales: oligomicina, carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP; del inglés, carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazine), rotenona y antimicina A (Figura C.1).

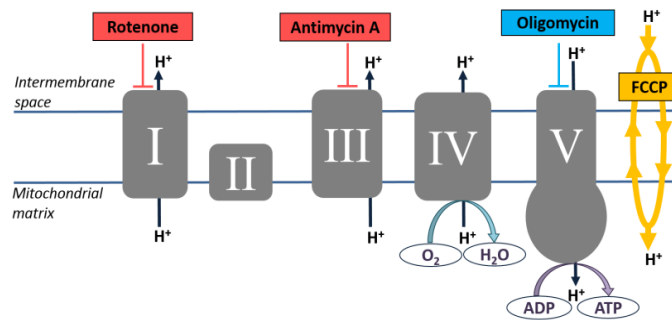


Figura C.1. Esquema de los complejos de la cadena de transporte de electrones. La oligomicina inhibe a la ATP sintasa o complejo V, el FCCP desacopla el consumo de oxígeno de la producción de ATP, y la rotenona y antimicina A inhiben a los complejos I y III, respectivamente. Imagen tomada de Agilent Technologies.

Tras medir las condiciones metabólicas basales, añadimos oligomicina, que inhibe la ATP sintasa y, como consecuencia disminuye la cadena de transporte de electrones y la OCR. La disminución en la OCR respecto al nivel basal correlaciona con la **respiración mitocondrial asociada a la producción de ATP** en condiciones normales. En ausencia de trabajo o consumo de ATP (relación ATP/ADP elevada), la respiración mitocondrial está controlada por la entrada pasiva de H⁺ a través de la membrana mitocondrial interna o *proton leak*. En esta situación, la velocidad de respiración se adecuará a la pérdida de gradiente, de modo que se mantenga la fuerza protón motriz necesaria para el funcionamiento de los procesos



biológicos dependientes de dicha fuerza. Posteriormente, se añade FCCP, que disipa el gradiente de protones, disminuyendo el potencial de la membrana interna mitocondrial y, como consecuencia, desacopla la cadena de transporte de electrones de la síntesis de ATP. El tratamiento con FCCP conlleva la aceleración de la cadena respiratoria hasta su **capacidad máxima**, incrementando el consumo de oxígeno del complejo IV a su máximo nivel. Por último, se adiciona una mezcla de rotenona y antimicina A. La rotenona inhibe la transferencia de electrones desde el complejo I mitocondrial a la ubiquinona, mediante el bloqueo del sitio de unión de la ubiquinona. La antimicina A interrumpe el flujo de electrones mediante la inhibición del complejo III mitocondrial. La combinación de ambos inhibe la respiración mitocondrial y permite el cálculo del consumo de oxígeno asociado a la **respiración no mitocondrial** (Figuras C.1 y C.2).

Como se ha indicado previamente, de forma paralela a la medida de OCR, el equipo mide la ECAR. En condiciones basales, este dato proporciona información sobre la glucólisis basal. Además, al inhibir la respiración con oligomicina y FCCP, se produce una respuesta compensatoria en glucólisis, lo que refleja el **flujo glucolítico máximo**.

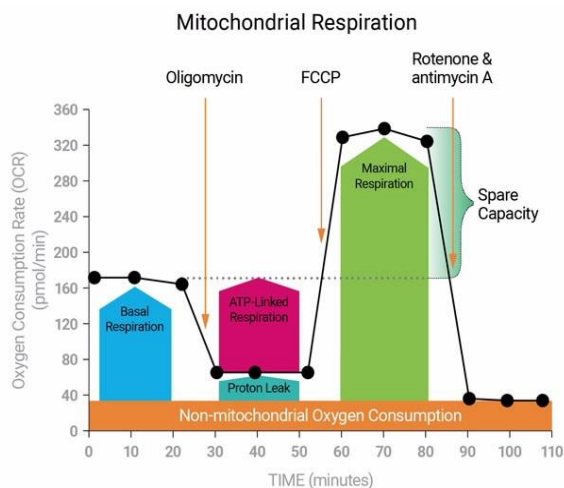


Figura C.2. Parámetros claves de la respiración mitocondrial obtenidos en el analizador Seahorse Xfp a partir de la OCR, en condiciones basales, y tras el tratamiento con oligomicina, FCCP y rotenona/antimicina A. La respiración basal (*Basal Respiration*) refleja la demanda energética de la célula en condiciones basales. La respiración asociada a la producción de ATP (*ATP Production*) es la fracción de respiración basal que se emplea para producir ATP en condiciones basales. El *proton leak* o flujo de protones es la respiración basal no acoplada a la producción de ATP. La capacidad máxima respiratoria (*Maximal Respiration*) muestra la máxima OCR que la célula puede alcanzar. La medida de *Spare Capacity* es un indicador de la capacidad de la célula para responder a la demanda energética. La respiración no mitocondrial (*Non-mitochondrial Oxygen Consumption*) se refiere al consumo de oxígeno que persiste a pesar de la inhibición mitocondrial. Imagen tomada de Agilent Technologies.



5.1. Procedimiento

Una vez aislados y contados los astrocitos como se indica en el apartado C.3.1.1, se cultivan 35.000 células/pocillo en una placa específica (Seahorse XFp Cell Culture Miniplates, Agilent), previamente tratada con poli-D lisina. Estas placas poseen 8 pocillos de 3.81 mm de radio. Solo cultivamos células en seis de ellos, dejando dos pocillos únicamente con medio de cultivo completo, que usaremos como blancos para el análisis posterior. La placa se mantiene 1 hora a temperatura ambiente, para garantizar que las células se adhieran de forma homogénea por todo el pocillo. Posteriormente, incubamos durante 24 horas a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂.

Al día siguiente, realizamos el tratamiento de los astrocitos con 0,1 µg/µl de S1 procedente de animales APP de 12 meses en medio de neuronas sin B27. Este tratamiento se mantiene durante 24 o 48 horas, en función del experimento, reponiendo la mitad del medio con la misma dosis de S1 a las 24 horas.

Tras el tratamiento de los astrocitos, se sigue el protocolo comercial proporcionado por Agilent. Para ello empleamos los medios de cultivo, reactivos y materiales proporcionados por esta casa comercial. De forma breve, el medio de tratamiento se sustituye, tras varios lavados, por medio seahorse [medio Seahorse XF DMEM, suplementado con Glucosa 17,5 mM, Piruvato 0,5 mM, L-Glutamina 4,5 mM y HEPES 5 mM, pH 7,4]. Este medio, formulado en base al medio de cultivos común DMEM, se caracteriza por carecer de bicarbonato y rojo fenol. Los astrocitos se incuban en una estufa a 37°C durante 1 hora. En este periodo, cargamos los reactivos en el cartucho de Seahorse, previamente hidratado e incubado a 37°C con la solución calibradora. En este trabajo, tratamos los astrocitos con una dosis de 2 µM de oligomicina, 2 µM de FCCP y 0,5 µM de rotenona y antimicina A (preparadas a partir del Seahorse XFp Cell Mito Stress Test Kit). Introducimos el cartucho en el analizador Seahorse XFp para su calibración. A continuación, introducimos la placa con los astrocitos en el analizador para obtener las correspondientes medidas de OCR y ECAR en cada uno de los pocillos.

Una vez finalizadas las medidas, recogemos las células en dodecilsulfato sódico (SDS; PanReac AppliChem) al 4% en PBS, y cuantificamos sus proteínas mediante Western blot (Apartado C.14), utilizadas para normalizar los valores de OCR y ECAR obtenidos.

6. Ensayos de supervivencia neuronal

En este trabajo de Tesis doctoral se han realizado diferentes ensayos de supervivencia neuronal. Por una parte, hemos estudiado la vulnerabilidad específica de las neuronas parvalbúmina (PV) positivas tras el tratamiento con neurosinaptosomas (NS) procedentes de animales WT, APP y TAU. Además, hemos estudiado la interacción astrocito-neurona utilizando diversas variantes de medio condicionado por astrocitos. Las condiciones específicas se detallan en cada experimento.



En torno al día 18 del cultivo de neuronas (Apartado C.3.2), añadimos 200 μ l del correspondiente medio (en función del experimento), previamente calentado a 37°C, por cada 50.000 células. En todos los experimentos hemos empleado medio de neuronas con B27 como control de viabilidad, y medio de neuronas sin B27 como control de muerte. Una vez adicionado el medio, mantenemos el cultivo a 37°C durante 24 o 48 horas, en una atmósfera con un 5% de CO₂. Transcurrido el tiempo de tratamiento, las células se fijan con paraformaldehído (PFA) 4% (Scharlau) durante 20 min a temperatura ambiente. Se realizan 3 lavados con PBS en agitación suave y se mantienen a 4°C, en presencia de etanol al 70% en PBS, hasta su posterior estudio mediante inmunofluorescencia (Apartado C.7).

6.1. Aislamiento de neurosinaptosomas (NS)

Los neurosinaptosomas (NS) son terminales aislados, con elementos pre y postsinápticos, que se individualizan de los terminales axonales cuando el tejido se homogeniza. En este trabajo, hemos aislado neurosinaptosomas de ratones sin patología (WT), con patología A β (APP) y con patología Tau (TAU), para utilizarlos como control o como fuentes de A β y Tau hiperfosforilado. Para la obtención de dichos NS hemos adaptado el protocolo usado por Puighermanal et al. (2016) para preparar neurosinaptosomas estriatales a partir de ratones adultos.

Tras sacrificar al animal mediante dislocación cervical, extraemos el cerebro y diseccionamos la corteza. Por cada hemicorteza, añadimos 1 ml de Tampón de neurosinaptosomas [CaCl₂ 2,5 mM (Sigma), NaCl 124 mM, KCl 3,2 mM, KH₂PO₄ 1,06 mM (Merck), NaHCO₃ 26 mM (Merck), MgCl₂ 1,3 mM (Sigma), D(+)Glucosa 10 mM y HEPES 20 mM, pH=7,4]. Homogeneizamos el tejido, sometiéndolo a 10 pases con un homogeneizador Dounce's con el pistilo de menor diámetro (paso de luz: 0,089-0,14 mm) y, posteriormente, otros 10 pases con el de mayor diámetro (paso de luz: 0,025-0,076 mm). El homogenado se filtra de forma secuencial a través de 3 filtros de Nylon con un tamaño de poro de 100 μ m (Millipore) y, después, a través de una membrana de filtro Mitex de un tamaño de poro de 10 μ m (Millipore). A continuación, centrifugamos durante un minuto a 4.000 x g y el sobrenadante se somete a otra centrifugación de 14.000 x g, durante 4 min. El pellet obtenido se suspende en un volumen final de 300 μ l con Tampón de neurosinaptosomas y se mantiene a 4°C hasta su uso, anterior a 24 horas, para el tratamiento de las neuronas primarias en medio de neuronas (3:1.000).

6.2. Obtención de medio condicionado por astrocitos

En este trabajo de Tesis doctoral hemos utilizado diversas variantes de medio condicionado por astrocitos. En primer lugar, se aíslan los astrocitos (Apartado C.3.1.1) y se dejan estabilizar 24 horas, tras las que lavamos los astrocitos con PBS, para eliminar restos de medio, y añadimos medio de neuronas nuevo a una razón de 250 μ l por cada 500.000 células. En función del experimento, este medio contendrá o no B27, así como fracciones S1 de diferentes modelos de EA (Apartado C.4). Las condiciones específicas de medio y tiempo utilizadas se indican en cada experimento. Una vez recogido el medio, se centrifuga a 0,5 x g durante 10 minutos para eliminar posibles células y congelamos el sobrenadante a -20°C hasta su uso.



6.3. Filtración de medio condicionado por astrocitos

Para ello añadimos el medio condicionado por los astrocitos al concentrador 5 K MWCO (Agilent Technologies), centrifugamos 3 veces a 5.000 x g durante 10 minutos obteniendo un filtrado, que contiene las moléculas con masa molecular inferior a 5.000 Da, y un retenido, con las moléculas mayores de 5 KDa. A ambos, se les adiciona medio de neuronas sin B27 hasta igualar el volumen de partida y mantener así la concentración original. Estos medios, denominados en este trabajo medio condicionado con moléculas de masa inferior a 5.000 Da (MC < 5.000 Da) y medio condicionado con moléculas de masa superior a 5.000 Da (MC > 5.000 Da), se utilizan para realizar ensayos de supervivencia neuronal, en las condiciones anteriormente descritas.

7. Inmunofluorescencia para células de cultivo

Las técnicas inmunocitoquímicas permiten detectar la presencia de moléculas de interés en las células de estudio, gracias a la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo. En este trabajo hemos realizado estudios de visualización y conteo de células en neuronas primarias en cultivo. Las células, una vez fijadas tras los diferentes tratamientos (Apartado C.6), se procesan siempre en paralelo, con el fin de minimizar la variabilidad en el inmunomarcaje. Además, también de manera paralela, se realizan controles negativos omitiendo la incubación con anticuerpos primarios para demostrar la especificidad de los anticuerpos empleados. En ningún caso, los controles negativos producen inmunotinción, por lo que no existen uniones inespecíficas de anticuerpos secundarios en las muestras estudiadas.

7.1. Marcaje inmunofluorescente doble para células de cultivo

Este protocolo se lleva a cabo sobre las neuronas, ya fijadas, obtenidas en los diferentes ensayos de supervivencia descritos en el Apartado C.6. Todos los lavados de este procedimiento se realizan durante 10 minutos en agitación suave. Sin embargo, las diferentes incubaciones (permeabilización, bloqueo y anticuerpos) se realizan en estático. En primer lugar, realizamos 3 lavados con PBS para eliminar los restos de etanol. Posteriormente, llevamos a cabo la permeabilización de las membranas celulares, para que los anticuerpos puedan acceder al interior celular, mediante la incubación con PBT [0,1% Tritón X-100 (Sigma) (v/v) en PBS] durante 1 hora a temperatura ambiente. Realizamos una incubación con la solución de bloqueo (5% albúmina de suero bovina (BSA; Fisher Scientific) en PBT), durante 3 horas a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, incubamos, a la concentración adecuada, con los anticuerpos primarios correspondientes (NeuN y, en función del ensayo, MAP2 o PV) (Tabla C.2), en presencia de BSA 1% en PBT durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, realizamos 3 lavados con PBT e incubamos con los anticuerpos secundarios (Tabla C.2), también en presencia de BSA 1% en PBT, durante 1 hora a temperatura ambiente. A partir de este momento, todos los pasos se realizan en oscuridad, ya que los anticuerpos secundarios llevan acoplados fluorocromos, que son sensibles a la luz. Después, realizamos 3 lavados con PBT, para evitar uniones inespecíficas, un lavado de 5 min con PBS y otro con H₂O milliQ, para eliminar las posibles sales que puedan quedar. Por último, montamos en un portaobjetos con el



medio de montaje *Dako Fluorescent Mounting Medium* (Dako). Las muestras se conservan a 4°C y en oscuridad hasta su visualización.

7.2. Obtención de imágenes mediante Microscopía Confocal

Las imágenes de fluorescencia se han obtenido con el microscopio confocal ZEISS LSM 7 DUO, del Servicio de Microscopía del Centro de Investigación Tecnológica e Innovación de la Universidad de Sevilla (CITIUS). Se trata de un microscopio óptico confocal que tiene acoplado un láser como fuente de iluminación, así como un sistema electrónico que permite la obtención de imágenes digitales. Hemos utilizado el software ZEN 2011 para la adquisición de imágenes.

7.3. Procesamiento de imágenes y cuantificación de neuronas

Por último, las imágenes digitales se han procesado mediante el programa informático ImageJ. La cuantificación del número de neuronas totales se realiza mediante el estudio de MAP2 y NeuN, mientras que para la cuantificación del número de neuronas PV+ empleamos PV y NeuN. MAP2 es una proteína de citoesqueleto asociada a microtúbulos que participa en el crecimiento de los procesos neuronales y la plasticidad sináptica (D'Andrea et al., 2017), por lo que permite visualizar la neurona completa, con todas sus ramificaciones (neuropilo). NeuN es una proteína del núcleo neuronal (Gusel'nikova y Korzhevskiy, 2015). De tal forma que, con este marcaje es posible visualizar y cuantificar de forma específica las neuronas del cultivo tratado, pudiendo evaluar la supervivencia neuronal mediante la comparación del número de neuronas existente tras los tratamientos realizados. Así pues, para la cuantificación del número de neuronas totales (NeuN+ y MAP2+) se utiliza la herramienta "Cell Counter" de ImageJ. De forma similar, hemos cuantificado el número de neuronas GABAérgicas PV+ con respecto a la población neuronal total, reconocida mediante NeuN.

8. Inmunohistoquímica

Las condiciones empleadas en la Inmunohistoquímica fluorescente múltiple se detallan en el apartado D.4 de los Resultados. Esta técnica se ha puesto a punto y se ha empleado posteriormente en el laboratorio de los doctores Alberto Serrano-Pozo y Bradley Hyman, en el Massachusetts General Hospital (Harvard Medical School, Estados Unidos) durante una estancia predoctoral.

Por otra parte, en colaboración con el laboratorio de la Dra. Antonia Gutierrez (Universidad de Málaga), se han realizado estudios inmunohistoquímicos del tejido hipocámpal y cortical de muestras *post mortem* de controles y pacientes de Alzheimer, tal y como se describe en Sanchez-Mejias et al. (2016). De forma rutinaria, las muestras de los diferentes estadios Braak se procesan de forma paralela para minimizar la variabilidad, y la especificidad de la tinción se comprueba omitiendo el anticuerpo primario.

De forma breve, una vez desparafinadas e hidratadas las muestras, realizamos una mejora o aumento de la exposición del antígeno mediante el pretratamiento con calor (80°C) en tampón citrato sódico (50 mM, pH=6; Panreac)



durante 20 minutos. A continuación, en caso de utilizar el método de la peroxidasa para el revelado de la inmunorreacción (inmunoperoxidasa), las secciones se tratan con una solución de H₂O₂ (Panreac) al 3% y metanol (Panreac) al 10% en PBS durante 20 minutos para inactivar a la peroxidasa endógena y evitar tinción de fondo no deseada. Posteriormente, bloqueamos la avidina, la biotina y las proteínas de unión a biotina que se encuentran en el tejido de manera endógena, mediante el kit de bloqueo de avidina-biotina (Vector Labs) durante 30 minutos en cada solución. Para evitar reacciones inespecíficas, bloqueamos con suero normal de cabra (Sigma-Aldrich) o de caballo (Sigma-Aldrich), en función del anticuerpo empleado, al 5% en PBS durante 1 hora. Tras el bloqueo, incubamos con el anticuerpo primario en PBS con 0,2% Tritón X-100 (Sigma-Aldrich) y 0,1% azida sódica (Panreac), en las condiciones detalladas en la Tabla C.2.

Anticuerpo	Diana	Especie huésped	Dilución, Tiempo y Temperatura de incubación	Clon/Referencia (Proveedor)
Anticuerpos primarios				
CD163	Receptor CD163	Ratón	1:200, 72 h, 22°C	10D6 (Leica biosystems)
CD45	Receptor CD45 o PTPRC	Conejo	1:1000, 48 h, 22°C	ab10558 (Abcam)
IBA1	IBA1 o AIF1, proteína de unión a calcio	Conejo	1:1.000, 24 h, 22°C	019-19741 (Wako Chemicals)
Map2	Proteína asociada a microtúbulos	Conejo	1:1.000, 24 h, 4°C	Ab5622 (Millipore)
MRC1	Receptor MRC1	Conejo	1:1000, 48 h, 22°C	HPA004114 (Sigma-Aldrich)
NeuN	Núcleo neuronas maduras	Ratón	1:1.000, 24 h, 4°C	A60 (Chemicon)
OC	Aβ fibrilar	Conejo	1:5.000, 24 h, 22°C	AB2286 (Millipore)
PV	Parvalbúmina	Conejo	1:1.000, 24 h, 4°C	PV27 (Swant)
Anticuerpos secundarios				
Anti-IgG conejo biotinilado	Anticuerpo primario producido en conejo	Cabra	1:500, 70 min, 22°C	Vector Lab
Anti-IgG ratón biotinilado	Anticuerpo primario producido en ratón	Cabra	1:500, 70 min, 22°C	Vector Lab
Anti-IgG conejo AF546	Anticuerpo primario producido en conejo	Burro Cabra	1:500, 1 h, 22°C 1:1.000, 1 h, 22°C	NanoProbes Molecular Probes
Anti-IgG ratón AF488	Anticuerpo primario producido en ratón	Burro Burro	1:500, 1 h, 22°C 1:1.000, 1 h, 22°C	NanoProbes Molecular Probes

Tabla C.2. Relación de anticuerpos empleados en los estudios de inmunocitoquímica e inmunohistoquímica. Se indica el antígeno diana reconocido por dichos anticuerpos, la especie del huésped en la que se han producido, la dilución empleada en este trabajo y la casa comercial o proveedor.



Para las imágenes de microscopía óptica de campo claro, transcurrido el periodo de incubación en el anticuerpo primario, las secciones se incuban en el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente (Tabla C.2), en el mismo tampón que el anticuerpo primario, durante 75 minutos a temperatura ambiente. A continuación, incubamos los cortes en el complejo estreptavidina-peroxidasa de rábano (Extravidin®; Sigma-Adrich) a una dilución 1/2.000 en tampón PBS con Tritón al 0,2 % durante 90 minutos y a temperatura ambiente. Finalmente, el producto de la inmunorreacción se visualiza introduciendo el tejido en una solución de 3-3'-diaminobencidina tetrahidro-clorhídrico (DAB) (Sigma-Aldrich) al 0,05% en tampón Tris clorhídrico (Trizma®, Sigma-Aldrich), conteniendo 0,03% de sulfato amónico de níquel (Farmitalia Carlo Erba) para intensificar el producto de la reacción de la peroxidasa (precipitado de color azul) y, 0,03% de peróxido de hidrógeno como sustrato de la enzima. Para inmunomarcaje doble, tras el primer revelado, incubamos las secciones en suero normal de cabra o de caballo, y posteriormente con el segundo anticuerpo primario, que se revela de forma similar, aunque omitiendo la adición de níquel a la solución de DAB, por lo que este segundo marcaje se visualiza en marrón. Tras cubrir las secciones, las analizamos en un microscopio óptico Nikon, modelo Eclipse 80i, con una cámara fotográfica digital Nikon DS-5M de 5 megapíxeles. Esta cámara se encuentra conectada a un ordenador que contiene el software ACT-2U (Auto Camera Tame To You; Imaging Software, Nikon Corporation 2004).

Respecto a las imágenes de inmunofluorescencia, tras incrementar la antigenicidad del tejido, bloquear con suero normal de cabra o caballo e incubar con el primer anticuerpo primario, incubamos con el segundo anticuerpo primario. Posteriormente, incubamos, también de forma consecutiva, con los anticuerpos secundarios correspondientes durante 1 hora y, para eliminar la autofluorescencia del tejido, empleamos el eliminador de autofluorescencia (Merck Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante. Por último, obtenemos las imágenes en el microscopio láser confocal Leica Sp5 II, conectado a un ordenador que ejecuta el programa Leica TCSNT.

9. Aislamiento de células a partir del cerebro de modelos de EA

En este proyecto hemos aislado astrocitos, microglía, CDM y linfocitos a partir del cerebro de animales WT y diferentes modelos de EA. Para ello, hemos empleado y optimizado diferentes protocolos de aislamiento y separación celular basados en la citometría de flujo.

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas e individuales a través de un capilar, a velocidad constante y dentro de un flujo laminar, por delante de un haz de luz láser focalizado. De este modo, podemos medir y cuantificar simultáneamente múltiples características físicas y químicas de una sola célula, que produce una señal individual al interferir con dicha fuente de luz (Barrera-Ramirez et al., 2004). Cuando el haz incide sobre una célula, se genera una luz dispersada policromática, producida por los diferentes



fluorocromos unidos a los anticuerpos específicos empleados para detectar antígenos de las células de interés. Dicha luz es captada por los detectores de gran sensibilidad del citómetro, generando numerosa información sobre cada célula individual, que es analizada por el software del citómetro. Así pues, la luz dispersada hacia delante y lateralmente provee información sobre el tamaño y la complejidad/granularidad de la célula, respectivamente, pero también podemos obtener información de las características antigénicas (inmunofenotipo) de las células, e incluso de diferentes procesos o funciones celulares (ciclo celular, proliferación, apoptosis, fagocitosis, etc.) específicos de cada célula.

Algunos citómetros de flujo poseen, además, una función denominada "clasificación de células activada por fluorescencia" o FACS (del inglés, *Fluorescence-activated Cell Sorting*). Esta técnica permite clasificar y separar las células con alta pureza en función del tipo de marcaje fluorescente que presenten, permitiendo su posterior uso en experimentos funcionales. Para ello, las células individualizadas pasan entre dos placas que establecen un campo eléctrico, proporcionando una carga determinada a las gotas en función de los parámetros analizados. La trayectoria de caída de las gotas cargadas se desvía hacia la placa que tenga polaridad opuesta, de modo que pueden separarse diferentes poblaciones de células en función de su marcaje específico con los anticuerpos y fluoróforos utilizados (Figura C.3, Male et al., 2014).

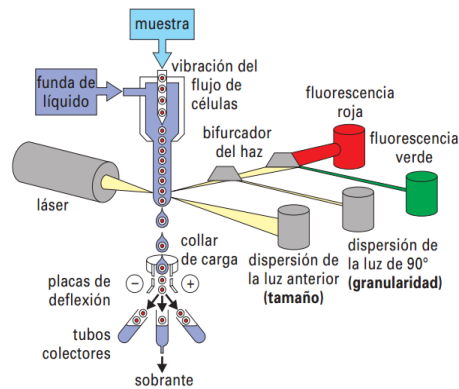


Figura C.3. Esquema del funcionamiento del FACS. Imagen tomada de Male et al., 2014.

En este trabajo de Tesis Doctoral se ha utilizado el Separador Celular FACS Aria Fusion (Becton Dickinson), del Servicio de Citometría de Flujo y Separación Celular del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS).

9.1. Aislamiento de astrocitos *ex vivo* a partir del cerebro de ratones APP

Para el aislamiento de astrocitos viables presentes en la corteza cerebral y el hipocampo de ratones APP de 12 meses, y sus respectivos controles WT, empleamos una modificación del protocolo desarrollado por Miltenyi Biotec, usando el *Adult Brain Dissociation Kit, mouse and rat* (Miltenyi Biotec).

Mix 1		Mix 2	
Enzima P	Buffer Z	Enzima A	Buffer Y
50 µl	1900 µl	20 µl	20 µl

Tabla C.3. Composición de los mix 1 y 2 empleados en la digestión del tejido de corteza e hipocampo, empleando los reactivos suministrados por Miltenyi Biotec. Las cantidades especificadas corresponden al volumen empleado por cada centro extraído (corteza e hipocampo).



En primer lugar, sacrificamos los ratones y extraemos el cerebro, que se lava con PBS. Aislamos corteza e hipocampo y los troceamos de forma conjunta con un bisturí. A continuación, realizamos una disgregación mecánica con micropipeta en presencia del mix 1 del kit comercial indicado anteriormente. Tras 15 minutos de digestión enzimática, en los que incubamos a 37°C en agitación, disgregamos el tejido con micropipeta y añadimos el mix 2 (Tabla C.3). Incubamos 10 minutos en agitación a 37°C, disgregamos el tejido mecánicamente e incubamos de nuevo en las mismas condiciones. Pasados los 10 minutos, centrifugamos la muestra a 300 x g durante 5 minutos a 4°C.

A partir de aquí, el procedimiento se realiza manteniendo las muestras y reactivos en frío. El pellet resultante de la centrifugación anterior se resuspende y lava con PBS. Pasamos la suspensión de células a través de un filtro de nylon con diámetro de poro de 100 µm y centrifugamos a 300 x g durante 10 minutos a 4°C. El pellet se resuspende en PBS, posteriormente se mezcla con *Debris removal solution*, y se crea un gradiente de densidad mediante la adición de PBS frío. Este se centrifuga a 3.000 x g durante 10 minutos a 4°C y sin freno, dando lugar a tres fases. Descartamos las dos fases superiores; y lavamos con PBS la inferior, donde se encuentran las células. Centrifugamos a 1.000 x g durante 10 minutos a 4°C y el pellet resultante se resuspende en 100 µl de PBS con 0,5% de BSA. En esta suspensión se encuentran diferentes tipos celulares presentes en la corteza e hipocampo del ratón utilizado.

Para aislar los astrocitos de manera específica, la suspensión de células se incubaba, en las condiciones indicadas, con los diferentes anticuerpos recogidos en la Tabla C.4 durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Además, se utilizan los correspondientes isotipos como control negativo para descartar las uniones inespecíficas de los anticuerpos.

Las células, una vez marcadas, se lavan y pasan por el Separador Celular FACS Aria Fusion, que detecta las diferentes poblaciones en base a la expresión de cada marcador, considerando además la complejidad y tamaño celular. En primer lugar, realizamos una selección de células (población P1), mediante la representación de SSC (Side Scatter) frente a FSC (Forward Scatter), que proporciona información sobre la complejidad y el tamaño celular, respectivamente, y permite descartar los debris y restos celulares. A continuación, descartamos los dobletes, seleccionando las células individuales (población P2), que muestran una relación lineal en la representación FSC-H vs. FSC-A. Distinguimos la población de células viables mediante el marcaje 7-AAD, un agente intercalante del ADN que es incapaz de atravesar membranas íntegras. Posteriormente, mediante inmunomarcaje fluorescente con CD45-PE y CD11b-CF-Blue, distinguimos dos poblaciones claramente definidas. Por una parte, la población CD11b+/ CD45+ que corresponde a las células microgliales. Por otra, la población no microglial (CD45-/CD11b-), a partir de la cual es posible seleccionar las células astrogliales (ACSA2^{high}). La proteína de superficie ACSA2 (del inglés, *astrocyte cell surface antigen 2*) es específica de astrocitos, por lo que este protocolo permite purificar astrocitos viables de manera altamente efectiva, sensible y específica (Kantzer et al., 2017). Tras este



procedimiento se aíslan tres poblaciones celulares diferentes: astrocitos (CD45-/CD11b-/ACSA2^{high}), microglia (CD11b+/ CD45+) y otros tipos celulares del SNC (CD45-/CD11b/ACSA2-). Con el fin de comprobar el correcto aislamiento de cada tipo celular, realizamos la extracción de ARN, retrotranscripción y el estudio de marcadores específicos de cada población celular (ALDH1L1, GFAP, AQP-4, para astrocitos; IBA1, TMEM119, TREM2, para microglía) mediante RT-PCR en tiempo real (protocolos detallados en Apartados C.10, 11 y 12, respectivamente).

ANTICUERPO	DIANA	DILUCIÓN EMPLEADA	FLUOROCROMO	CLON (PROVEEDOR)
Anti-ACSA2-APC	Proteína de superficie ACSA2 (del inglés, astrocyte cell surface antigen 2)	1:50	Allophycocyanin (APC) $\lambda_{\text{excitación}} = 650 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{emisión}} = 660 \text{ nm}$	IH3-18A3 (Miltenyi Biotec)
Anti-CD45-PE	Proteína de superficie CD45	3:100	R-phycoerythrin (PE) $\lambda_{\text{excitación}} = 496 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{emisión}} = 578 \text{ nm}$	HI30 (Immunostep)
Anti-CD11b-CF-Blue	Proteína de superficie CD11b	1:20	CF-Blue $\lambda_{\text{excitación}} = 401 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{emisión}} = 452 \text{ nm}$	M1/70 (Immunostep)
7-aminoactinomicina D (7-AAD)	Agente intercalante del ADN fluorescente	1:20	7-AAD $\lambda_{\text{excitación}} = 546 \text{ nm}$ $\lambda_{\text{emisión}} = 647 \text{ nm}$	- (BD Pharmingen™)

Tabla C.4. Relación de anticuerpos empleados para el aislamiento de astrocitos *ex vivo* a partir del cerebro de ratones APP mediante FACS. Se especifica la diana, el clon del anticuerpo, la casa comercial o proveedor, el fluorocromo al que va unido y la dilución empleada de cada uno de ellos.

En definitiva, este protocolo proporciona la selección y el aislamiento eficaz de la población de astrocitos viables presentes en corteza e hipocampo de ratones transgénicos APP. Las células, una vez aisladas, se centrifugan a 0,5 x g durante 10 minutos y se congelan en nitrógeno líquido, para su posterior análisis metabólico (realizado en colaboración con la Dra. Coral Barbas de la Universidad San Pablo CEU).

9.2. Aislamiento de microglía, CDM y linfocitos *ex vivo* del cerebro de modelos APP y TAU

En este trabajo, hemos realizado el aislamiento y cuantificación de la microglía, CDM y linfocitos presentes en la corteza y/o hipocampo de ratones transgénicos APP y TAU de 12 meses de edad. Se han incluido como controles ratones APP de 6 meses y TAU de 4 meses, respectivamente, así como animales WT.



En primer lugar, los ratones se anestesian con una dosis letal de tiopental (Braun, 90-120mg/Kg peso ratón) y se perfunden transcárdialmente con PBS estéril frío durante 5 minutos a un flujo continuo de 10 ml/minuto, utilizando una bomba de perfusión (DINKO Mod. D-25V). Tras este paso, se procede a decapitar a los animales y a extraer la corteza y el hipocampo.

Una vez extraídos, homogeneizamos mecánicamente el tejido cortical y/o hipocámpal, en función del experimento. Cortamos el tejido con la ayuda de un bisturí y, mediante el paso por una aguja de 21G, disgregamos en HBSS con un 10% de FBS. El homogeneizado se pasa a través de un filtro de nylon con un diámetro de poro de 100 µm (Fisher Scientific) y se centrifuga a 155 x g durante 10 minutos a 4°C (Centrifuge 5702 R, Eppendorf).

El pellet obtenido se resuspende en Percoll al 30% y creamos un gradiente de densidad mediante la adición de HBSS frío. Centrifugamos a 800 x g durante 15 minutos a 4°C y sin freno, con el fin de separar la mielina de las células, que sedimentan y forman el pellet. Para eliminar los restos de Percoll, lavamos con PBS y centrifugamos a 800 x g durante 10 minutos a 4°C. Tras resuspender el pellet resultante en 100 µl de PBS, obtenemos una suspensión con los diferentes tipos celulares presentes en la corteza y/o el hipocampo del modelo utilizado.

ANTICUERPO	DIANA	DILUCIÓN EMPLEADA	FLUOROCROMO	CLON (PROVEEDOR)
Anti-CD11b-APC	Proteína de superficie CD11b	3:100	Allophycocyanin (APC) λ _{excitación} = 650 nm λ _{emisión} = 660 nm	M1/70 (Immunostep)
Anti-CD45-PE	Proteína de superficie CD45	3:100	R-phycoerythrin (PE) λ _{excitación} = 496 nm λ _{emisión} = 578 nm	HI30 (Immunostep)
Anti-Ly6c/Ly6g-FITC	Proteínas de superficie Ly6c y Ly6g	3:100	Fluorescein isothiocyanate (FITC) λ _{excitación} = 492 nm λ _{emisión} = 518 nm	RB6-8C5 (Immunostep)

Tabla C.5. Relación de anticuerpos empleados para el aislamiento de microglía, CDM y linfocitos *ex vivo* del cerebro de modelos de la EA mediante FACS. Se especifica la diana, el clon del anticuerpo, la casa comercial o proveedor, el fluorocromo al que va unido y la dilución empleada de cada uno de ellos.

Para el aislamiento específico de microglía, CDM y linfocitos, se emplean, en la concentración indicada, los anticuerpos recogidos en la Tabla C.5. Las células se incuban durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Además, utilizamos como control negativo los isotipos correspondientes para descartar las uniones inespecíficas de los anticuerpos. Este protocolo está basado en el diferente perfil de expresión de CD11b y CD45 en cada tipo celular (Ford et al., 1995; Chiu et al., 2013; Goldmann et al., 2016; Rosenzweig et al., 2019). Además, utilizamos el



anticuerpo anti-Ly6c con el fin de confirmar y garantizar una adecuada separación de las CDM con respecto a la microglía activa.

Tal y como se ha indicado previamente, las células, una vez marcadas, se lavan y pasan por el Separador Celular FACS Aria Fusion a 4°C, que detecta las diferentes poblaciones en base a la expresión de cada marcador, considerando además la complejidad y el tamaño celular. Una vez descartados los debris y dobletes celulares seleccionamos las células individuales, y distinguimos las tres poblaciones de interés mediante el inmunomarcaje fluorescente de CD45-PE y CD11b-APC. Por una parte, diferenciamos la población de linfocitos (CD11b-/ CD45^{high}). Además, observamos dos poblaciones positivas para CD11b y CD45, pero con diferente expresión de este último. La población CD11b+/ CD45^{medium} corresponde a las células microgliales, mientras que las CDM son CD11b+/ CD45^{high}. Sin embargo, puesto que en la microglía activa aumenta la expresión de CD45, también utilizamos el marcaje de Ly6c para garantizar una adecuada separación de las CDM (Ly6c+) respecto a toda la población microglial (Ly6c-). Este marcador ha confirmado que la separación realizada únicamente en base a CD11b y CD45 estaba siendo adecuada. De tal forma que con este procedimiento se aíslan tres poblaciones celulares: microglía (CD11b+/CD45^{medium}/Ly6c-), CDM (CD11b+/CD45^{high}/Ly6c+) y linfocitos (CD11b-/CD45^{high}).

Con el fin de comprobar el correcto aislamiento de cada tipo celular, se realiza la extracción de ARN, retrotranscripción y el estudio de marcadores específicos de cada población celular mediante RT-PCR en tiempo real (protocolos detallados en Apartados C.10, 11 y 12, respectivamente).

10. Aislamiento de ARN, ADN y proteínas

El método empleado para la extracción de ARN, ADN y proteínas se basa en la diferente solubilidad de las distintas biomoléculas (ARN, ADN, proteínas y lípidos) en disolventes orgánicos (fenol y cloroformo). El proceso se lleva a cabo usando el reactivo TRIsure™ (Bioline), que contiene tiocianato de guanidina, un agente caotrópico que rompe las membranas y desnaturaliza las proteínas, incluyendo proteasas, ADNasas y ARNasas. Estas últimas son muy resistentes a la mayoría de los agentes físicos, y su desnaturalización es fundamental para evitar la degradación del ARN.

Para garantizar una adecuada extracción de ARN, es esencial minimizar la actividad ribonucleasa durante la extracción. Para ello, es importante que tanto los reactivos como el material de trabajo utilizados estén libres de ARNasas. El agua es tratada con dietilpirocarbonato (DEPC; Sigma-Aldrich) a una concentración del 0,1% (p/v) (Fedorcsak y Ehrenberg, 1966), durante 12 horas. Tras este periodo se autoclava para eliminar el DEPC, ya que éste puede alterar el ARN por carboximetilación. Todos los reactivos y material fungible de origen comercial utilizados durante este proceso se adquieren libres de ARNasas. En lo que respecta al material físico no fungible (como pinzas o tijeras), es esterilizado antes de utilizarlo. Además, todo el procedimiento se realiza en una campana extractora, que



es limpiada con RNAase ZAP™ (Sigma-Aldrich) de forma previa, para evitar el contacto del operador con el TRIsure™.

10.1. Procedimiento

El proceso comienza añadiendo 1 ml del reactivo TRIsure™ por cada 50-100 mg de tejido o 0,5 ml de TRIsure™ por cada 10⁶ células aproximadamente, ya sean procedentes de cultivo o del aislamiento por separación celular mediante FACS. En el caso de los tejidos, es necesario un paso adicional de homogeneización de la muestra con un homogeneizador (Polytron; Heidoph), durante 15 segundos a la máxima potencia.

A continuación, en ambos casos, el homogeneizado se deja incubar 10 minutos a temperatura ambiente, para permitir una disociación completa de los complejos núcleo-proteicos. Posteriormente, añadimos 0,2 ml de cloroformo (Sigma-Aldrich) por cada ml inicial de TRIsure™ añadido. Agitamos vigorosamente e incubamos a temperatura ambiente durante otros 10 minutos. A continuación, centrifugamos a 12.000 x g a 4°C durante 15 minutos, obteniéndose una solución trifásica. La fase superior acuosa corresponde al ARN, mientras que las proteínas, lípidos y ADN se encuentran en la interfase y fase inferior orgánica. Por tanto, a partir de esta solución trifásica, podemos aislar el ARN (Subapartado 10.1.1), el ADN genómico (ADNg) (Subapartado 10.1.2) y las proteínas (Subapartado 10.1.3), aunque estas últimas se encuentran desnaturalizadas.

10.1.1. Aislamiento de ARN

Para aislar el ARN, extraemos la fase superior acuosa cuidadosamente y procedemos de forma diferente en función del tipo de muestra.

En general, una vez extraída la fase acuosa, añadimos 0,5 ml de isopropanol (Sigma-Aldrich) por cada ml inicial de TRIsure™ y 0,4 µl de glicógeno (Thermo Scientific), que ayudará a la precipitación del ARN, manteniéndolo a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente, incubamos a temperatura ambiente durante 10 minutos, y centrifugamos a 12.000 x g, durante 15 minutos a 4°C. El pellet de ARN obtenido se lava con 1 ml de etanol (Scharlau) preparado al 75% (v/v) con agua tratada con DEPC. Volvemos a centrifugar a 12.000 x g, durante 15 minutos a 4°C y el pellet obtenido se deja secar y se resuspende en agua tratada con DEPC.

Por otra parte, las muestras humanas no han sido obtenidas en las condiciones idóneas para obtener un ARN de alta integridad. Las necropsias no son inmediatas, como puede ocurrir con muestras de células o de modelos. Además, las muestras, una vez obtenidas, son congeladas y almacenadas en los Bancos de Tejidos durante varios años. En consecuencia, para las muestras humanas decidimos emplear el protocolo comercial del RNeasy Mini Kit (Quiagen), que garantiza mejores resultados en cuanto a purificación e integridad del ARN. De forma breve, una vez extraída la fase acuosa, añadimos 0,7 mL de etanol (Scharlau) al 75% en agua tratada con DEPC, incubándolo a -20°C durante 6-12 horas, para proporcionar las condiciones ideales de unión. Tras lo cual, transferimos la muestra a una columna, donde quedará retenido el ARN. Realizamos diferentes lavados para



eliminar cualquier tipo de contaminación y finalmente el ARN se eluye en 50 µl de agua tratada con DEPC.

En ambos casos, el ARN purificado se cuantifica en un espectrofotómetro (NanoDrop; Thermo Scientific), aprovechando la capacidad de las bases nitrogenadas de absorber a una longitud de onda de 260 nm. Además, es conveniente determinar la razón de absorbancia a 260 nm/280 nm (longitud de onda a la que absorben los aminoácidos aromáticos), lo que nos permite conocer el nivel de contaminación de proteínas presentes en la muestra de ARN purificado. Una razón de 2.1 indica que la muestra de ARN no presenta prácticamente contaminación de proteínas.

Para comprobar la integridad del ARN purificado utilizamos Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies) como soporte electroforético y Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) como instrumento de detección y análisis. Este sistema permite llevar a cabo una electroforesis en gel mediante el uso de un chip, sobre el cual se carga la matriz del gel, el fluoróforo que permitirá llevar a cabo la visualización del ARN y la muestra correspondiente. Tras la electroforesis, el sistema de análisis recoge la fluorescencia emitida por la muestra, previamente estimulada con láser, creando un electroferograma (fluorescencia/tiempo). El electroferograma permite conocer la calidad del ARN proporcionando el RIN (Número de Integridad del ARN; del inglés, *RNA Integrity Number*), mediante el uso de un software específico. El RIN establece una clasificación numérica de la calidad del ARN que comprende valores del 1 al 10, siendo 1 el RIN de un ARN totalmente degradado y 10 el RIN de un ARN perfectamente conservado. Tras llevar a cabo el análisis de integridad de ARN de nuestras muestras humanas hemos obtenido un RIN medio de $5,66 \pm 1,06$, indicando una calidad media del ARN utilizado en este trabajo.

Una vez se ha purificado, cuantificado y comprobado su integridad, el ARN es almacenado a -80°C hasta su posterior utilización.

10.1.2. Aislamiento de ADN

A partir de la solución trifásica anterior, utilizamos la fase intermedia y la fase orgánica inferior para extraer ADN y proteínas totales. En primer lugar, se lleva a cabo la precipitación del ADN genómico (ADNg). Para ello, añadimos 300 µl de etanol al 100%, por cada ml inicial de TRIsure™ e invertimos el tubo varias veces para mezclarlo. Después, incubamos la muestra durante 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir que el ADN precipite. Centrifugamos a $2.000 \times g$ durante 5 minutos a 4°C y el sobrenadante (donde están las proteínas) se lleva a un tubo nuevo (Subapartado C.10.1.3).

Por su parte, el pellet de ADN obtenido se lava con 1 ml de citrato de sodio 0,1M (Sigma-Aldrich) en 10% de etanol. Agitamos durante 30 minutos a temperatura ambiente y centrifugamos a $2.000 \times g$ durante 5 minutos a 4°C . Tras lo cual, volvemos a lavar en las mismas condiciones. Posteriormente, añadimos 1,5 ml de etanol al 75%, agitamos durante 20 minutos y centrifugamos a $2.000 \times g$ durante 5 minutos a 4°C . El pellet obtenido se deja secar y se resuspende en hidróxido de sodio 8 mM



(Acros Organics™), EDTA 1 μM (Sigma-Aldrich), pH=7,5. Se mantiene en agitación durante 12-18 horas, garantizando la disolución del ADNg, y centrifugamos a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C, para eliminar los restos de material insoluble que puedan permanecer. El sobrenadante, con el ADNg, se pasa a un tubo nuevo y se mantiene a -25°C hasta su uso (Apartado C.12.3).

10.1.3. Aislamiento de proteínas

Para precipitar las proteínas, al sobrenadante aislado en el apartado anterior añadimos 1,5 ml de isopropanol. Tras invertir varias veces el tubo, se deja en agitación durante unos 20 minutos a temperatura ambiente y centrifugamos 10 minutos a 12.000 x g a 4°C. Lavamos el precipitado con 2 ml de guanidina (Sigma-Aldrich) 0,3 M en 95% (v/v) de etanol, agitamos fuertemente y lo mantenemos en agitación durante 20 minutos a temperatura ambiente, para después centrifugar a 7.500 x g durante 5 minutos a 4°C. Este proceso de lavado se repite dos veces más, y, luego, realizamos un último lavado similar, pero empleando etanol absoluto, con el fin de eliminar los restos de guanidina. Finalmente, dejamos secar el precipitado unos 10 minutos, hasta que se evapora todo el alcohol.

Para solubilizar las proteínas, resuspendemos el precipitado, una vez seco, en urea 8M (PanReac AppliChem) y SDS 4%, tamponado con 40mM Tris (PanReac AppliChem)-HCl (PanReac AppliChem) pH=7,5, e incubamos toda la noche en agitación a temperatura ambiente. Al día siguiente, se procede a su cuantificación por el método de Lowry (Apartado C.13). Las proteínas solubilizadas y cuantificadas se congelan en diferentes alícuotas a -80°C hasta su uso. Estas proteínas se encuentran desnaturalizadas, por lo que solamente se utilizaran para estudios en western blot (WB) (Apartado C.14).

11. Retrotranscripción

La retrotranscripción o transcripción inversa es el proceso por el cual obtenemos ADN complementario (ADNc) a partir de ARN mensajero (ARNm). El ADNc es una biomolécula mucho más estable que el ARN, por lo que nos permite un manejo más cómodo y seguro de la muestra. Este ADNc se consigue a partir de un molde de ARN en presencia de cebadores aleatorios y desoxirribonucleótidos, mediante la actividad de la enzima transcriptasa inversa que, en las condiciones óptimas, sintetiza una hebra de ADN complementaria y genera un híbrido ARN-ADN, el cual, por degradación del ARN, quedará como ADN monocatenario. Posteriormente, se forma una doble hélice de ADN, mucho más estable que el ARN de partida.

11.1. Procedimiento

Para realizar la retrotranscripción, partimos de 4 μg de ARN resuspendido en agua con DEPC (Apartado C.10.1.1). Este ARN se somete a 65°C durante 10 minutos para su desnaturalización en un termociclador (MasterCycler Gradient, Eppendorf). Transcurrido este tiempo, llevamos la muestra inmediatamente a 4°C para evitar la renaturalización del ARN.



Preparamos una mezcla de reacción, mediante la combinación de los componentes del “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystem), que contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo la transcripción inversa (Tabla C.6). Una vez preparada, la mezcla de reacción se combina con la muestra de ARN en proporción 1:1, de manera que cada reactivo queda a una concentración final 1X y la enzima retrotranscriptasa a 2,5 U/μl.

Por último, introducimos la muestra en el termociclador e incubamos durante 10 minutos a 25°C, para permitir la hibridación de los cebadores con sus secuencias complementarias, seguido de 2 horas a 37°C, para que tenga lugar la reacción de retrotranscripción y, en definitiva, sintetice el ADNc a partir del ARNm. Dicho ADNc obtenido se conserva a -25°C hasta su utilización.

Reactivos	Volumen de la mezcla de reacción	Concentración final
Cebadores aleatorios (10X)	20%	2X
Tampón de Retrotranscripción (10X)	20%	2X
Mezcla de Desoxirribonucleótidos (dNTP) (25X)	8%	2X
Enzima Transcriptasa Inversa (50 U/μl)	10%	5 U/μl
H2O tratada con DEPC	42%	-

Tabla C.6. Relación de los reactivos suministrados por Applied Biosystems. Se indica el porcentaje del volumen total que supone cada uno de ellos en la mezcla de reacción y la concentración final de los mismos para la reacción de retrotranscripción.

Con el fin de comprobar que la cantidad de ADNc obtenida tras la reacción de retrotranscripción es la misma en todas las muestras, llevamos a cabo la amplificación de uno o varios genes *housekeeping* (*GAPDH*, *18S*, *β-ACTINA*, *CYC1*, *RPL13*, *UBE2D2*, *HPRT1*, *UBC*). En general, hemos obtenido una expresión similar, con poca variabilidad, de cada gen *housekeeping* en todas las muestras, independientemente de su origen. En cualquier caso, su expresión se ha empleado rutinariamente como control interno en todos los experimentos con la finalidad de normalizar posibles cambios en la cantidad de ADNc de partida en las reacciones de PCR (Apartados C.12.1 y C.12.2).

12. PCR en tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica muy utilizada en biología molecular debido a sus numerosas aplicaciones, ya que permite amplificar de forma exponencial, cientos o millones de veces, secuencias específicas de ADN, presentando una elevada sensibilidad. Se denomina RT-PCR cuando se parte de ADNc, obtenido a partir de ARN mensajero (ARNm) mediante retrotranscripción (Apartado C.11). A diferencia de otras técnicas convencionales de PCR, donde se requiere una técnica adicional para observar los resultados, las PCR en tiempo real son PCR cuantitativas (qPCR). El análisis de las muestras se produce durante el mismo proceso de amplificación, monitorizando una señal fluorescente asociada al producto de PCR. En este sentido, la RT-qPCR es una técnica muy útil para la cuantificación de cantidades pequeñas de ARN, con elevada precisión y sin la necesidad de una acción posterior.



Para ello, se utilizan termocicladores que son capaces de amplificar y detectar la fluorescencia simultáneamente, como el termociclador de tiempo-real ABI Prism 7900 (Applied Biosystems) y el equipo ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™), utilizados en el presente trabajo. Estos sistemas combinan un termociclador, un detector de fluorescencia y un software específico de amplificación.

12.1. Cuantificación de la expresión génica mediante sondas Taqman

En este trabajo, para cuantificar la expresión de ARNm se han utilizado sondas de hidrólisis o sondas Taqman. Las sondas Taqman son sondas de hibridación específicas que permiten la detección exclusiva de una determinada secuencia. Se tratan de oligonucleótidos de 20-24 bases de longitud, que se unen de forma complementaria a una secuencia interna dentro del fragmento de ADN a amplificar. Estas sondas están marcadas en el extremo 5' con un fluoróforo donador (*reporter*), como FAM, y en el extremo 3' con un aceptor o sustancia absorbente (*quencher*), normalmente TAMRA, que absorbe la fluorescencia liberada por el donador (Figura C.4). De esta forma, el espectro de emisión del primero ha de solapar con el espectro de absorción del segundo. Mientras que la sonda está intacta, no se detecta fluorescencia ya que la energía se transfiere vía Transmisión de Energía de Resonancia (FRET; del inglés, *Fluorescent Resonance Energy Transfer*) del fluoróforo de baja longitud de onda en un extremo (*reporter*) al fluoróforo de alta longitud de onda en el otro extremo (*quencher*), apantallando la fluorescencia de baja longitud de onda. Durante la fase de elongación, la sonda que ha hibridado con su secuencia complementaria va a estar unida a una cadena simple de ADN, y flanqueada por cebadores específicos de la secuencia estudio. Cuando la Taq-polimerasa alcanza la sonda, su actividad exonucleasa 5'-3' libera al fluoróforo donador, que comienza a emitir fluorescencia al estar separado del *quencher*. Esta fluorescencia es captada por el detector y su intensidad, por tanto, es proporcional a la presencia de secuencias diana en la muestra analizada.

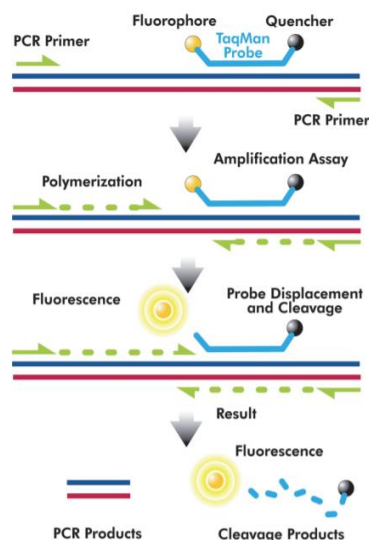


Figura C.4. Representación esquemática del funcionamiento de una sonda Taqman. Los cebadores y la sonda se unen a su secuencia diana. Aunque el fluoróforo es excitado, el *quencher* absorbe la energía evitando que se detecte la fluorescencia. A partir del cebador, la ADN polimerasa copia la secuencia complementaria hasta llegar a la sonda. Entonces, esta es hidrolizada por el extremo 5', liberando al fluoróforo y permitiendo que el aumento de fluorescencia, que antes estaba siendo apantallado, sea detectado. Finalmente, la enzima hidroliza el resto de la sonda, completando la copia de la secuencia diana.



Las reacciones de RT-PCR en tiempo real se caracterizan por el momento en el proceso de amplificación en el que la señal fluorescente se registra como estadísticamente significativa, distinguiéndose del ruido de fondo o señal *background*. A mayor número de copias iniciales, antes se detectará un aumento significativo en la fluorescencia (Bustin, 2000; Ginzinger, 2002; Bustin, 2002). Este punto se define como ciclo threshold (Ct) y siempre ocurre durante la fase exponencial de amplificación. De esta forma la cuantificación no se afecta porque alguno de los componentes de la reacción se vuelva limitante, y los replicados muestran resultados uniformes y reproducibles. La señal registrada se normaliza con la fluorescencia de referencia o calibradores para permitir correcciones en las fluctuaciones de fluorescencia provocadas por cambios en la concentración o el volumen, y se obtiene un valor de Ct para cada muestra.

12.1.1. Procedimiento

Para llevar a cabo la RT-PCR, preparamos la mezcla de reacción ($V_r=20 \mu\text{l}$) que contiene $10 \mu\text{l}$ de iTaq™ Universal Probes Supermix (Bio-Rad) (2X), $1 \mu\text{l}$ de Taqman™ Gene Expression Assay (Applied Biosystem) (20X), $8 \mu\text{l}$ de agua milliQ y $1 \mu\text{l}$ de ADNc. La iTaq está compuesta por la enzima Taq polimerasa, los dNTPs y el medio adecuado para que ocurra la reacción. El vial comercial Taqman™ Gene Expression Assay, contiene los cebadores específicos del gen que se pretende cuantificar y una sonda Taqman MGB, marcada con FAM™ en el extremo 5' y el *quencher*, además de una unión al surco menor (MGB, del inglés *minor groove binder*), en el 3'. Esta MGB aumenta la temperatura de fusión (T_m , del inglés *melting temperature*) de la sonda y estabiliza el híbrido sonda-diana. La concentración dentro del vial es de $18 \mu\text{M}$ para cada primer y $5 \mu\text{M}$ para la sonda. Las sondas suministradas por Applied Biosystems han pasado previamente controles de calidad que garantizan la especificidad por la secuencia diana y la eficiencia de amplificación. Las sondas Taqman utilizadas para cuantificar la expresión de ARNm de los diferentes marcadores analizados en este trabajo se encuentran detalladas en la Tabla C.7.

Una vez preparada esta mezcla de reacción en cada pocillo, introducimos la placa de 96 pocillos en el ABI PRISM Sequence Detection Systems 7900, donde se llevará a cabo la amplificación, siguiendo el programa detallado en la Tabla C.8. El análisis de los resultados se realiza con el programa ABI Prism 7900 SDS Software, obteniéndose un valor de Ct para cada muestra.

Para la cuantificación de los niveles de ADNc, hemos utilizado el método de comparación de Ct (Ramos et al., 2006), usando un *housekeeping* (GAPDH, normalmente), como gen de referencia. Los valores de Ct son calculados con el software proporcionado por Applied Biosystems (SDS 1.7). Según este método, la cantidad de ADNc (unidades de expresión de la diana estudiada), normalizada con el *housekeeping* viene dada por la siguiente ecuación: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001).



Sonda (Humano)	Referencia	Sonda (Humano)	Referencia
ALDH1L1	Hs01003842_m1	MKI67	Hs01032443_m1
AQP-4	Hs00242342_m1	MSR1	Hs00234007_m1
β -actina	Hs99999903_m1	MRC1	Hs00267207_m1
CCL2	Hs00234140_m1	NPY	Hs00173470_m1
CCL3	Hs00234142_m1	PDGFRB	Hs01019589_m1
CCL4	Hs99999148_m1	PECAM1	Hs01065279_m1
CCL5	Hs00982282_m1	PFKM	Hs01075411_m1
CCR1	Hs00174298_m1	PGM1	Hs01071897_m1
CCR2	Hs00704702_s1	PILRA	Hs00603661_g1
CCR5	Hs00152917_m1	PKM	Hs00761782_s1
CD11b	Hs00355885_m1	PU.1	Hs02786711_m1
CD11c	Hs00174217_m1	PV	Hs00161045_m1
CD163	Hs00174705_m1	PYGB	Hs00765686_m1
CD3e	Hs01062241_m1	P2RX4	Hs00602442_m1
CD45	Hs04189704_m1	P2RY12	Hs01881698_m1
CD68	Hs02836816_g1	RPL13	Hs00744303_s1
CD74	Hs00269961_m1	SELE	Hs00174057_m1
CLEC7A	Hs01902549_s1	SST	Hs00356144_m1
CPT1A	Hs00912671_m1	S100 β	Hs00902901_m1
CSF1	Hs00174164_m1	TMEM119	Hs01938722_u1
CSF1R	Hs00911250_m1	TNF α	Hs00174128_m1
CX3CR1	Hs01922583_s1	TREM2	Hs00219132_m1
CYC1	Hs00357717_m1	UBE2D2	Hs00366152_m1
C1S	Hs00156159_m1	VIM	Hs00185584_m1
C1R	Hs00354278_m1	18S	Hs03003631_g1
C3	Hs00163811_m1		
C4a-b	Hs00246758_m1		
Sonda (Ratón)	Referencia		
FN1	Hs00365052_m1	Aldh1l1	Mm03048957_m1
GAPDH	Hs03929097_g1	Aqp-4	Mm00802131_m1
GFAP	Hs00909236_m1	Ccr2	Mm00438270_m1
HMGCR	Hs00168352_m1	Cd3	Mm01179194_m1
IBA1	Hs00610419_g1	Cx3cr1	Mm02620111_s1
IDH2	Hs00953879_m1	Gapdh	Mm99999915_g1
IDH3a	Hs00194253_m1	Gfap	Mm01253033_m1
IFITM3	Hs03057129_s1	Iba1	Mm00479862_g1
IL1 β	Hs01555410_m1	Ly6c	Mm00841873_m1
IL6	Hs00985639_m1	Tmem119	Mm00525305_m1
LGALS3	Hs00173587_m1	Trem2	Mm04209424_g1

Tabla C.7. Relación de sondas Taqman utilizadas para humanos y ratón en el análisis de expresión de ARNm mediante RT-PCR.

Condiciones de la RT-PCR			
Fase Previa		Ciclo (40 repeticiones)	
Activación de la Taq	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Hibridación y Elongación
2 min - 50°C	10 min - 95°C	15 s - 95°C	1 min - 60°C

Tabla C.8. Condiciones de tiempo y temperatura de la RT-PCR en tiempo real para la cuantificación de expresión génica según el protocolo proporcionado por Applied Biosystems. Como los amplicones son pequeños, se combina la fase de hibridación y elongación, usando una temperatura de 60°C.



Además, en las muestras humanas, con el fin de comprobar que no se producen alteraciones en los niveles de expresión de GAPDH como consecuencia de la patología, género u algún otro factor (Preece y Cairns, 2003), hemos llevado a cabo la amplificación de otros cinco genes *housekeeping* (β -actina, 18S, UBE2D2, CYC1 y RPL13). Observamos una adecuada correlación entre ellos y con GAPDH, lo cual es indicativo de que las ligeras variaciones en los niveles de expresión de estos genes entre diferentes muestras es consecuencia de pequeños cambios en la cantidad total de ADNc, validándose como buenos genes de referencia (Gutala y Reddy, 2004; Rydbirk et al., 2016).

12.2. Cuantificación de la expresión génica mediante TaqMan® Array Cards

Para cuantificar la expresión de varios genes específicos de monocitos o CDM, microglía y macrófagos asociados al SNC en muestras de tejido humano *post mortem*, hemos utilizado TaqMan® Array Cards, de Thermo Fisher Scientific, también llamadas TLDA (Taqman Array Microfluidic Cards). Estas permiten realizar RT-PCR en tiempo real de varias sondas Taqman simultáneamente, presentando, por tanto, una mayor capacidad para cuantificar la expresión de múltiples genes en varias muestras de manera paralela, sencilla y rápida. Además, minimiza la manipulación y, por tanto, el error que puede llevar asociado.

Custom Taqman® Array Cards			
Sonda	Referencia	Sonda	Referencia
GAPDH	Hs02786624_g1	HLA-dr	Hs04192463_mH
MRC-I	Hs00267207_m1	LILRB2	Hs00275975_m1
Siglec1	Hs00224991_m1	CXCL16	Hs00222859_m1
CD163	Hs00174705_m1	Nur77	Hs00374226_m1
IFITM2	Hs00829485_sH	HPRT1	Hs99999909_m1
IFITM3	Hs03057129_s1	Trem2	Hs00219132_m1
F13A1	Hs01114178_m1	MEF2a	Hs01050409_m1
TAGLN2	Hs00761239_s1	SMAD3	Hs00969210_m1
FTH1	Hs01694011_s1	AXL	Hs01064444_m1
NPC2	Hs00197565_m1	SALL1	Hs01548765_m1
18S	Hs03003631_g1	CST-7	Hs00175361_m1
HLA-dqa1	Hs03007426_mH	UBC	Hs00824723_m1

Tabla C.9. Relación de las 24 sondas Taqman para muestras humanas incluidas en las Taqman® Array Cards prediseñadas. Se incluyen genes específicos de microglía, monocitos o CDM y macrófagos asociados al SNC, así como 4 genes *housekeeping*.

En este trabajo, hemos utilizado Custom TaqMan® Array Cards, diseñadas con 24 sondas de interés previamente seleccionadas, correspondiendo 4 de ellas a genes control o *housekeeping* (Tabla C.9). La tarjeta presenta 8 puertos de entrada en los que se depositan las diferentes muestras (8 muestras/placa). Cada uno de estos puertos de entrada se conecta con 48 pocillos donde se encuentran las sondas Taqman®. Puesto que las tarjetas utilizadas presentan 384 pocillos, cada una de ellas permite detectar la expresión de 24 genes distintos por duplicado para 8 muestras (Figura C.5).



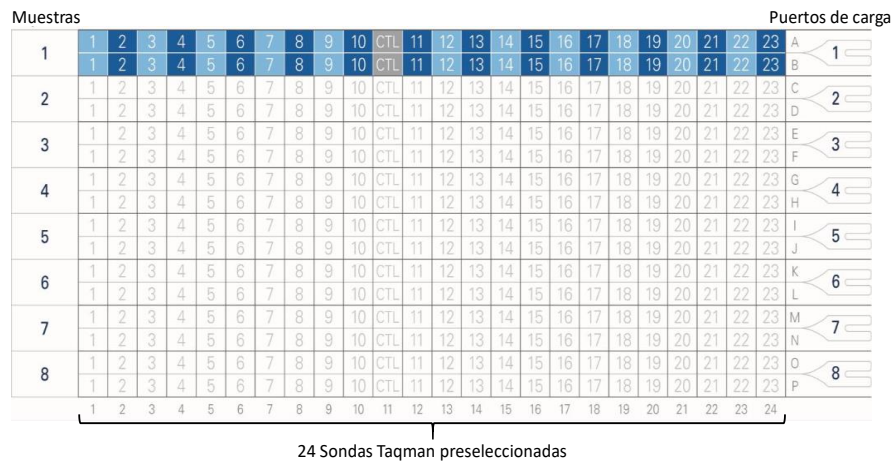


Figura C.5. Esquema de una TaqMan® Array Card (Formato 24). Se trata de una placa con 384 pocillos prediseñada para medir la expresión de 24 genes, en 8 muestras diferentes, por duplicado. La muestra se añade en su respectivo puerto de carga y, mediante centrifugación, se distribuye de forma homogénea por los 48 pocillos correspondientes.

12.2.1. Procedimiento

En cada puerto de carga (Figura C.5), introducimos 100 µl de una mezcla compuesta por 50 µl de una mastermix comercial Taqman® (Thermo Scientific), 25µl de agua miliQ y 25 µl de ADNc, a una concentración final de 10 ng/µl. Posteriormente, centrifugamos la placa verticalmente a 1.200 rpm durante 2 minutos en una centrífuga Sorvall ST40R (Thermo Scientific), para que toda la muestra se distribuya de forma homogénea, quedando 1 µl de muestra por pocillo. A continuación, sellamos la placa y cortamos los puertos de carga. Finalmente, introducimos la placa en el equipo ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™). Mediante el software ViiA7 RUO, seleccionamos el programa de amplificación (Tabla C.8). Este equipo amplifica el ADNc y detecta la intensidad de fluorescencia, proporcionando un valor de Ct, de igual forma que una RT-PCR en tiempo real convencional basada en el uso de sondas Taqman (Apartado C.12.1).

En las TaqMan® Array Cards, hemos utilizado cuatro genes *housekeeping* (GAPDH, 18S, HPRT1 y UBC), a partir de los cuales obtuvimos la media geométrica, mediante la raíz cuarta del producto de los valores de Ct obtenidos para cada uno de estos genes. De forma similar que en la RT-PCR en tiempo real, para cuantificar los niveles de ADNc hemos utilizado el método de comparación de Ct. En este caso, la cantidad de ADNc o unidades de expresión se normaliza con la media geométrica de los *housekeeping* y viene dada por: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

12.3. Identificación del genotipo APOE

Para la identificación del genotipo APOE, hemos empleado ensayos de identificación de genotipo de polimorfismo de nucleótido único (SNP; del inglés, *single-nucleotide polymorphism*) Taqman®. Estos ensayos se emplean para amplificar y detectar determinados alelos en el ADNg. Cada ensayo contiene dos cebadores (directo e inverso) preoptimizados y sin marcar, y dos sondas Taqman, con



las características previamente descritas (Apartado C.12.1). Cada una de las sondas reconoce de forma específica a uno de los polimorfismos. Una de ellas está marcada con FAM y otra con VIC, permitiendo así la discriminación alélica.

El funcionamiento de los ensayos de identificación de genotipo SNP Taqman® es similar al de cuantificación de la expresión génica (Apartado C.12.1). De forma breve, los cebadores y las sondas se unen, en caso de estar presente, a su secuencia diana. La ADN polimerasa amplifica la secuencia complementaria y, cuando llega a la sonda, hidroliza el extremo 5', liberando al fluoróforo y emitiendo una señal que es captada por el detector. De forma que, únicamente detectaremos fluorescencia para FAM y/o VIC si la respectiva sonda se ha unido a su secuencia diana específica. En consecuencia, si únicamente observamos una curva de amplificación para el fluoróforo FAM o VIC, el individuo será homocigoto para el correspondiente alelo. Sin embargo, si amplifican ambas señales, el individuo es heterocigoto.

12.3.1. Procedimiento

Preparamos la mezcla de reacción ($V_r=10 \mu\text{l}$) que contiene $5 \mu\text{l}$ de Taqman™ Genotyping Master Mix (Applied Biosystems) (2X), $0,2 \mu\text{l}$ de Taqman™ SNP Genotyping Assay (Applied Biosystem) (50X), $4 \mu\text{l}$ de agua milliQ y $1 \mu\text{l}$ de ADNg. Para realizar la discriminación entre los alelos ϵ_2 , ϵ_3 y ϵ_4 , hemos identificado los polimorfismos del gen APOE rs429358 y rs7412 (Tabla C.10).

SNP	Taqman™ SNP Genotyping Assay	Amplicón [VIC/FAM]	Alelo		
			ϵ_2	ϵ_3	ϵ_4
rs429358	C_3084793_20	GCTGGGCGCGGACATGGAGGACGTG[C/T] GCGGCCGCTGGTGCAGTACCGCGG	T	T	C
rs7412	C_904973_10	CCGCGATGCCGATGACCTGCAGAAG[C/T] GCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGC	T	C	C

Tabla C.10. Polimorfismos del gen APOE detectados en este trabajo. Se indican los ensayos Taqman™ empleados y la región amplificada (delimitada por los cebadores). En el amplicón observamos en rojo los posibles nucleótidos del polimorfismo, que son detectados de forma específica por diferentes sondas, marcadas respectivamente con VIC o FAM. También se indica el nucleótido presente en los alelos ϵ_2 , ϵ_3 y ϵ_4 para cada SNP.

Una vez preparada la mezcla de reacción en cada pocillo, introducimos la placa de 96 pocillos en el ABI PRISM Sequence Detection Systems 7900, donde se llevará a cabo la amplificación, siguiendo el programa detallado en la Tabla C.11. El análisis de los resultados para la discriminación alélica se realiza con el programa ABI Prism 7900 SDS Software.

	Condiciones de la PCR para la identificación del genotipo APOE			
	Fase Previa		Ciclo (50 repeticiones)	
	Activación de la Taq	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Hibridación y Elongación
rs429358	2 min - 50°C	10 min - 95°C	15 s - 95°C	1 min - 64°C
rs7412	2 min - 50°C	10 min - 95°C	15 s - 95°C	1 min - 61°C

Tabla C.11. Condiciones de tiempo y temperatura de la PCR en tiempo real para la identificación de los polimorfismos del gen APOE rs429358 y rs7412.



13. Cuantificación de proteínas: Método de Lowry

La determinación de la concentración de proteínas se realiza utilizando el método de Lowry (Lowry et al., 1951), que se basa en un mecanismo de dos pasos. En primer lugar, los iones cobre forman, en medio básico, un complejo con los nitrógenos de los enlaces peptídicos. Posteriormente, el reactivo de Folin-Ciocalteu se reduce, produciendo un compuesto azulado con absorbancia máxima a 750 nm. Este método tiene un rango de sensibilidad de 5-100 µg (Noble y Bailey, 2009). La cantidad de proteína en la muestra puede ser estimada utilizando una curva patrón con una solución de una proteína estándar, en este caso, hemos empleado la BSA en un rango de 10 a 50 µg. Para la cuantificación de proteínas totales, solubilizadas en SDS 4% y urea 8M, añadimos a la curva patrón el mismo porcentaje de urea y SDS que presentan las diluciones de las muestras a las que se le va a medir la absorbancia.

Por otra parte, en el caso de muestras con una limitada concentración de proteínas o con un pequeño volumen disponible, utilizamos una variante denominada micro-lowry (modificación de Fryer et al., 1986), diseñada para su uso en placas de poliestireno cristalino con 96 pocillos. En este caso, la curva patrón presenta un rango de 1 a 10 µg, y la muestra se diluye entre 10 y 40 veces en un volumen final de 100 µl. A cada reacción, añadimos 25 µl de la mezcla cobre-tartrato, en una razón 1:1:100 de CuSO₄ al 5% (PanReac AppliChem), NaKTartrato al 10% (Sigma-Aldrich) y Na₂CO₃ al 10% (PanReac AppliChem) en NaOH 0.5N. Con esta solución incubamos a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, añadimos el reactivo de Folin&Ciocalteu (Sigma-Aldrich) diluido en agua (1:1), e incubamos de nuevo a temperatura ambiente, durante 20 minutos. Finalmente, procedemos a la lectura de la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 595 nm y la realización de la curva patrón para el cálculo de la concentración de proteínas en cada una de las muestras.

Una vez conocida la concentración de proteínas, preparamos un stock de proteínas a una concentración de 1 µg/µl y lo congelamos en diferentes alícuotas a -20°C hasta su uso.

14. Western Blot

La técnica de Western Blot permite la detección y cuantificación de proteínas específicas presentes en una mezcla de proteínas. Los geles de poli(acrilamida) constituyen el soporte de elección a la hora de llevar a cabo la separación de las proteínas presentes en una muestra en función de su movilidad electroforética, y, por tanto, de su tamaño. Entre las diversas técnicas de electroforesis en gel de poli(acrilamida) (PAGE), probablemente la más usada es aquella que se lleva a cabo en condiciones desnaturizantes según el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Esta electroforesis tiene lugar en presencia del detergente aniónico SDS, que se caracteriza por su capacidad para dispersar agregados proteicos, así como para desnaturizar proteínas. Además, la presencia de este detergente, tanto en los geles como en los tampones de electroforesis y transferencia, nos garantiza que las proteínas se encuentren en todo momento desnaturizadas y cargadas



negativamente, lo que nos permite separarlas exclusivamente en función de su tamaño.

La poliacrilamida se forma a partir de la copolimerización entre los reactivos acrilamida (Serva) y bis-acrilamida (N,N'-metilén-bis-acrilamida; Sigma-Aldrich), en presencia de PSA (persulfato de amonio; Sigma-Aldrich), que actúa como catalizador de la polimerización, y TEMED (Tetrametiletildiamina; Sigma-Aldrich), que inicia la reacción. En estos geles, podemos variar el diámetro de poro fácilmente cambiando las concentraciones de acrilamida y bis-acrilamida, lo que nos permite resolver proteínas de diferentes tamaños. En este trabajo, los geles preparados han variado entre 4-20% de acrilamida.

14.1. Procedimiento

Para llevar a cabo la electroforesis, las proteínas deben estar preparadas con un tampón específico, denominado tampón de carga, que contiene SDS 2,3%, β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) 10%, glicerol (Sigma-Aldrich) 20% y azul de bromofenol (Sigma-Aldrich) 0,005%, en tampón 10 mM Tris-HCl a pH 6,8.

Para la preparación del gel, empleamos el sistema Mini Protean 3 (Bio-Rad), que permite preparar geles a la concentración deseada, combinando los reactivos descritos anteriormente, y con el número de pocillos que sean necesarios, según las condiciones de cada experimento. La electroforesis se lleva a cabo en tampón 25 mM Tris-HCl a pH 8,4 con Glicina 0,19 M (PanReac AppliChem) y SDS 0,1% (p/v), someténdola a un voltaje constante de 90 V. Para el estudio de las diferentes formas de Tau, hemos utilizado geles de gradiente de concentración de entre 4 y 20% de acrilamida (Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ Protein Gels, Bio-Rad), que permite realizar una adecuada separación de proteínas con un amplio rango de tamaños de forma simultánea. En el caso del péptido A β , debido a su bajo peso molecular (4,5 KDa), hemos optado por utilizar geles de poliacrilamida al 16%, y el pH del gel de empaque se ha modificado hasta un valor de 8,45. Además, hemos empleado un tampón de electroforesis que contiene tricina 100 mM (PanReac AppliChem) pH 8,45. La tricina tiene un pKa de 8,15 y la glicina de 9,6, por lo que, en las condiciones de experimentación descritas, la tricina se encuentra predominantemente en forma aniónica y migra mucho más rápido de lo que lo haría la glicina en el gel de empaque. En consecuencia, las proteínas con un peso molecular más bajo se empaquetan y migran mejor durante la electroforesis, permitiendo una mejor separación.

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas retenidas en el gel de poliacrilamida se transfieren a una membrana. En este trabajo, hemos empleado membranas de nitrocelulosa (Hybond-C extra, Amersham) y de PVDF (Inmobilon-P, Millipore), ambas con 0.45 micras de diámetro de poro. El sistema de soporte utilizado permite realizar la transferencia sumergida en el tampón de transferencia [glicina 190 mM, metanol 20% (v/v) (Scharlau), SDS 0,005%, en 25 mM Tris-HCl, pH 8,4], a 310 mA constante durante 90 minutos. En el caso de las membranas de PVDF, es necesario su activación en metanol de forma previa a la transferencia.



ANTICUERPO	DIANA	ESPECIE HUÉSPED	DILUCIÓN EMPLEADA	BANDA RECONOCIDA	PROVEEDOR
Anticuerpos primarios					
AT8	Fosfo-Tau (Ser199/202-Thr205)	Ratón	1:1.000	50-80 kDa	Thermo Scientific
AT100	Fosfo-Tau (Thr212-Ser214)	Ratón	1:1.000	50-80 kDa	Innogenetics
AT180	Fosfo-Tau (Thr231)	Ratón	1:1.000	50-80 kDa	Thermo Scientific
A11	Formas oligoméricas de A β	Conejo	1:2.000	27, 54 y 99 kDa	Thermo Scientific
β-ACTINA	Proteína <i>housekeeping</i>	Ratón	1:10.000	42 kDa	Sigma-Aldrich
GAPDH	Proteína <i>housekeeping</i>	Conejo	1:10.000	37 kDa	Cell Signalling
OC	Formas fibrilares de A β	Conejo	1:5.000	86 kDa	Merck-Millipore
TAU46	Tau (total)	Ratón	1:1.000	50-80 kDa	Cell Signalling
82E1	A β	Ratón	1:2.000	4,5 kDa (1-mer)	IBL
Anticuerpos secundarios					
Anti-IgG conejo	Anticuerpo primario producido en conejo	Caballo	1:10.000	-	Cell Signalling
Anti-IgG ratón	Anticuerpo primario producido en ratón	Cabra	1:10.000	-	Cell Signalling

Tabla C.12. Relación de anticuerpos utilizados en las técnicas de Western blot y Dot blot. Se indica el antígeno diana reconocido por dichos anticuerpos, la especie huésped donde se han producido, la dilución empleada en este trabajo, la masa molecular de la diana y la casa comercial.

Al terminar la transferencia, las membranas de PVDF requieren un paso adicional en el cual se hierven en PBS durante 5 minutos. Las membranas se tiñen con solución de Rojo Ponceau's (Sigma-Aldrich), preparado al 0,1% con ácido acético 5% (PanReac AppliChem) en agua, para observar las proteínas transferidas. Después, lavamos con TPBS [Tween-20 (Sigma-Aldrich) 0,1% (v/v) en PBS] y



bloqueamos con leche desnatada al 5% en TPBS, durante 30-60 minutos a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, incubamos la membrana con el anticuerpo primario correspondiente en TPBS durante toda la noche a 4°C. En la Tabla C.12, se detallan los anticuerpos y concentración empleados, así como algunas de las características más relevantes.

Al día siguiente, retiramos el exceso de anticuerpo mediante tres lavados de 5 minutos con TPBS e incubamos la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente (Cell Signalling), durante una hora a temperatura ambiente. Estos se unen de forma específica al anticuerpo primario y se encuentran conjugados a peroxidasa de rábano (Tabla C.12). Tras la incubación, lavamos con TPBS para retirar el exceso de anticuerpo secundario. Finalmente, para visualizar las proteínas marcadas, usamos el reactivo Pierce ECL 2 Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) que contiene el sustrato de la peroxidasa y, por tanto, dará lugar a una señal quimioluminiscente que será proporcional a la cantidad de la proteína de interés en la muestra. Esta señal es registrada mediante el sistema de captación ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-rad) y, posteriormente, cuantificada empleando el software Image Lab (Bio-Rad).

15. Dot blot

Esta técnica permite la detección de conformaciones proteicas, sin necesidad de separar las proteínas por su tamaño, y en condiciones no desnaturizantes, de manera que se mantiene la integridad estructural de las mismas. Por tanto, para esta técnica, las proteínas se encuentran en un tampón isotónico no desnaturizante.

15.1. Procedimiento

Colocamos una gota de la solución proteica, con el volumen y concentración adecuados, sobre una membrana de nitrocelulosa y su absorción hace que las proteínas interaccionen y se adhieran a ella. Dejamos secar para asegurar su adhesión a la membrana. Tras lo cual, esta se trata con el mismo procedimiento que se ha descrito para el Western blot (Apartado C.14). De forma breve, bloqueamos durante 30-60 min a temperatura ambiente; incubamos con el anticuerpo primario correspondiente a 4°C durante toda la noche, y con el respectivo anticuerpo secundario a temperatura ambiente durante 1 hora. Los anticuerpos utilizados se detallan en la Tabla C.12. Finalmente, revelamos la señal quimioluminiscente.

16. Análisis de datos y *clustering*

El análisis de los datos se realiza de forma no supervisada empleando el entorno y lenguaje de programación de dominio público R (versión 3.6.0). En primer lugar, estudiamos la correlación entre los diferentes genes analizados. Posteriormente, obtenemos el valor de expresión normalizado o tipificado (*z-score*), para garantizar que todas las variables tengan el mismo peso en el análisis. Aplicamos el método VAT (del inglés, *Visual Assessment of cluster Tendency*), que nos permite evaluar visualmente si los datos muestran indicios de algún tipo de agrupación, confirmando que nuestros datos presentan una estructura inherente de



grupos. Por tanto, aplicamos un análisis de clúster o *clustering* a nuestros datos normalizados para clasificar de forma no supervisada los genes analizados en grupos denominados conglomerados o clústeres, de forma que las observaciones pertenecientes a un grupo sean similares entre sí (homogeneidad dentro del grupo) y diferentes del resto (heterogeneidad entre grupos), tal y como visualizamos mediante el análisis de componentes y dendogramas. Para decidir la mejor aproximación, comparamos, mediante diversas medidas de validación interna, diferentes algoritmos de *clustering* y número de clústeres.

17. Análisis estadístico

Todos los experimentos de este trabajo se han repetido un mínimo de 3 veces. El método de análisis estadístico varía según las muestras empleadas y se ha desarrollado con los programas GraphPad Prism 8, IBM® SPSS® Statistics y mediante el entorno y lenguaje de programación de dominio público R (versión 3.6.0).

En el estudio de las muestras humanas, los datos no siguen una distribución normal, por tanto, empleamos pruebas no paramétricas. Para comparaciones múltiples, usamos la prueba de Kruskal Wallis, seguida de un test de Dunn y en comparaciones independientes entre dos grupos, la prueba U de Mann Whitney. Para comparar muestras relacionadas empleamos la prueba de Friedman. Los datos se representan utilizando un diagrama que refleja los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. De esta forma, podemos conocer la distribución que siguen los datos dentro de cada grupo. Los análisis estadísticos de correlaciones entre variables se han realizado mediante el coeficiente de correlación de Spearman, seguidos por un análisis de regresión lineal.

Para las muestras que se ajustan a una distribución normal, comparamos los datos mediante el test ANOVA (del inglés, *analysis of variance*), seguido del test de comparación múltiple Tukey, si comparamos varios grupos entre sí, o mediante el test “t de Student”, si se trata de dos poblaciones independientes. Los resultados mostrados reflejan el valor medio de los experimentos realizados respecto al grupo control, representándose la media del grupo \pm la desviación estándar (SD).

Para estudiar la relación entre variables cualitativas empleamos la prueba de chi-cuadrado.

En cualquier caso, consideramos que las diferencias son estadísticamente significativas cuando obtenemos un valor $p < 0,05$, y mostramos el nivel de significación de la siguiente manera: $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) o $p < 0,0001$ (****).



D. RESULTADOS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



1. CARACTERIZACIÓN DE LA PATOLOGÍA Y LA RESPUESTA MICROGLIAL EN LA CORTEZA FRONTAL DE PACIENTES DE ALZHEIMER

Estudios previos del laboratorio han caracterizado la respuesta microglial en el hipocampo de pacientes de Alzheimer. A diferencia de la importante activación microglial descrita en modelos transgénicos de A β (Jimenez et al., 2008; Moreno-Gonzalez et al., 2009; Heneka et al., 2015; Baglietto-Vargas et al., 2017; Gutierrez y Vitorica, 2018) y en el modelo Tau P301S (Romero-Molina et al., 2018), en el hipocampo de pacientes de EA existe una activación microglial muy limitada que se localiza exclusivamente rodeando a las placas amiloides. Además, se produce un proceso de degeneración microglial, con un patrón regional definido, que está mediado por formas tóxicas fosforiladas de Tau (Sanchez-Mejias et al., 2016). Por otra parte, como hemos mencionado previamente, en la EA existe gran heterogeneidad regional en la acumulación de las proteínas A β y Tau (Braak y Braak, 1991; Jucker y Walker, 2011; Jucker y Walker, 2013). Así pues, en el hipocampo la patología neurofibrilar precede a la acumulación de A β , mientras que en la corteza frontal la patología amiloide es anterior a la neurofibrilar. Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este proyecto analizamos las principales características patológicas y la respuesta microglial en la corteza frontal de individuos en diferentes estadios de la EA, y comparamos los resultados con los previamente obtenidos en el hipocampo.

1.1. Caracterización de la patología amiloide y neurofibrilar en la corteza frontal en relación con el hipocampo en la EA

La patología A β aumenta con la progresión de la EA tanto en áreas corticales como hipocampales. Sin embargo, mientras que el aumento en la carga de A β monomérico es significativo en el hipocampo sólo en el estadio Braak V-VI, en la corteza frontal se manifiesta desde el estadio Braak III-IV. De hecho, existe una diferencia significativa entre ambas áreas cerebrales de estos individuos (corteza frontal, mediana=9,903; rango intercuartílico de 2,848 a 20,75; hipocampo, mediana=4,024, rango intercuartílico de 0 a 6,945). Además, en pacientes Braak V-VI la acumulación de este péptido es significativamente mayor en corteza frontal (mediana=18,17, rango intercuartílico de 10,71 a 44,03) que en hipocampo (mediana=5,097, rango intercuartílico de 1,841 a 9,023) (Figura D.1 C). En la figura D.1 D se observa que, los pacientes de EA con al menos un alelo $\epsilon 4$ poseen en la corteza frontal niveles más elevados de A β monomérico que los homocigóticos para $\epsilon 3$.

Además, hemos realizado una caracterización preliminar de la patología Tau (Figura D.2), comprobando que, tanto en hipocampo como en corteza frontal de pacientes de EA, se produce un aumento de formas agregadas y fosforiladas de Tau. Futuros experimentos determinarán diferencias entre ambas regiones cerebrales.



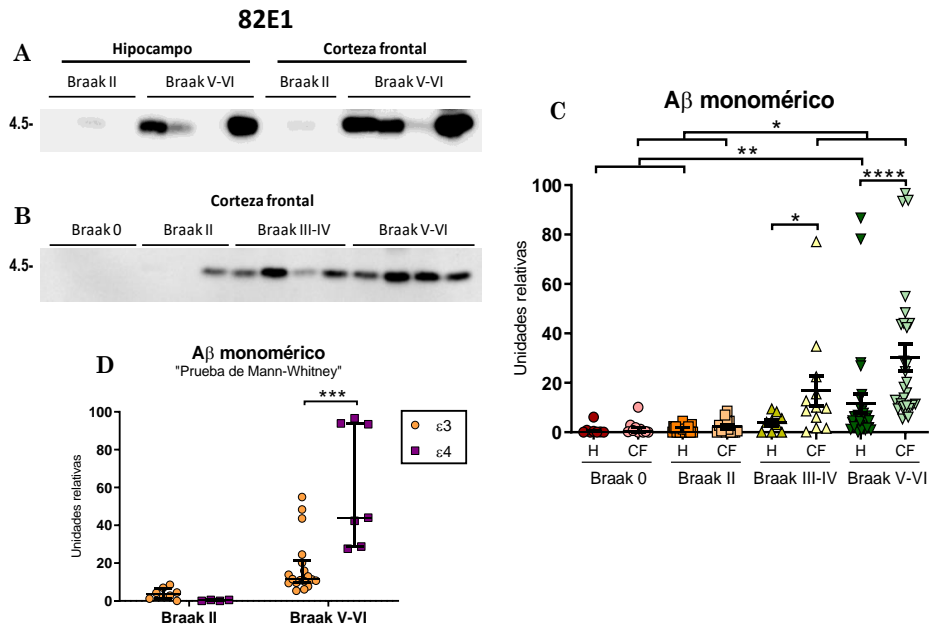


Figura D.1. En la corteza frontal de pacientes de Alzheimer se produce una acumulación mayor y más temprana de Aβ que en el hipocampo. **(A)** Análisis mediante western blot de la cantidad de Aβ en muestras de hipocampo y corteza frontal pertenecientes a los mismos individuos Braak II y Braak V-VI. **(B)** Cantidad de Aβ monomérico con la progresión de la patología de Alzheimer en muestras de corteza frontal. **(C)** Cuantificación mediante western blot de la carga de Aβ monomérico con la progresión de la patología en hipocampo (Braak 0, n=8; Braak II, n=21; Braak III-IV, n=9; Braak V-VI, n=30), y corteza frontal (Braak 0, n=10; Braak II, n=14; Braak III-IV, n=12; Braak V-VI, n=27). Las muestras de hipocampo han sido cuantificadas por la Dra. Victoria Navarro Garrido. Se indican los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. Los grupos de muestras de hipocampo y corteza frontal se analizan de forma independiente mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn ($p < 0.0001$, en ambos casos). La significancia entre las muestras de hipocampo y corteza frontal para un mismo estadio Braak se analizan mediante la prueba U de Mann-Whitney ($*p < 0,5$; $**p < 0,01$; $****p < 0,0001$). **(D)** Cuantificación de los niveles de Aβ monomérico en la corteza frontal de individuos Braak II ($\epsilon 3$, n=8; $\epsilon 4$, n=4) y V-VI ($\epsilon 3$, n=18; $\epsilon 4$, n=7). Los individuos agrupados como $\epsilon 3$ son homocigóticos para este alelo y los $\epsilon 4$ son homo o heterocigóticos para el alelo $\epsilon 4$. Se indican los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia entre diferentes genotipos se ha analizado mediante la prueba de U de Mann-Whitney ($**p < 0,01$; $****p < 0,0001$). **Abreviaturas:** H=hipocampo, CF= corteza frontal.



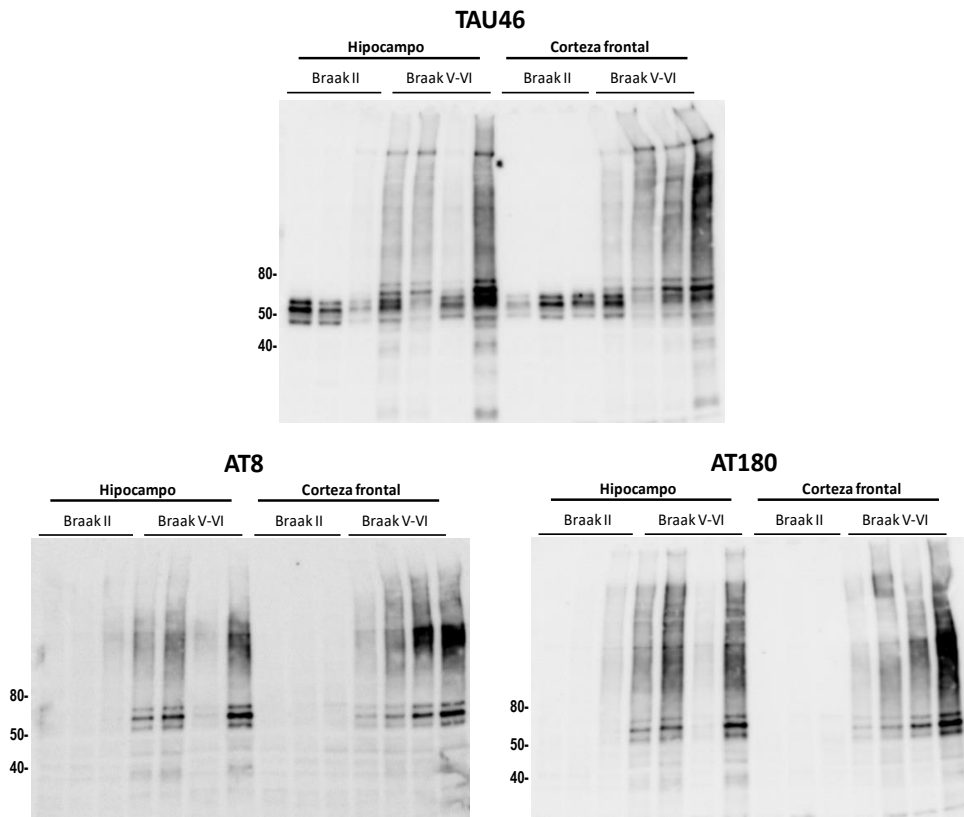


Figura D.2. Aumento de la patología Tau con la progresión de la EA en hipocampo y corteza frontal. Análisis mediante western blot de la cantidad de Tau total medido con el anticuerpo TAU46 y formas fosforiladas de Tau detectadas por el anticuerpo AT8 y AT180 en muestras de hipocampo y corteza frontal de los mismos individuos Braak II y Braak V-VI.



1.2. Degeneración de neuronas parvalbúmina (PV) positivas en la corteza frontal y el hipocampo en la EA

Otro rasgo neuropatológico típico de la EA es la neurodegeneración GABAérgica hipocampal, que afecta principalmente a las neuronas parvalbúmina (PV) positivas. En la corteza frontal, nuestros resultados muestran que la expresión de PV es mayor que en el hipocampo en todos los estadios Braak, y que dicha expresión también disminuye significativamente en pacientes de EA (Figura D.3).

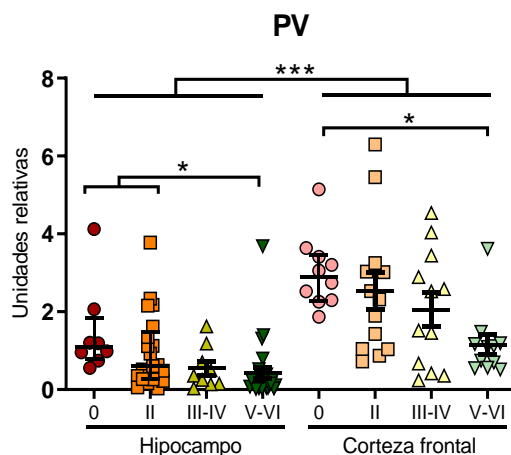


Figura D.3. Degeneración de neuronas GABAérgicas PV+ en el hipocampo y corteza frontal de pacientes de Alzheimer. Expresión relativa de PV, analizada mediante RT-PCR en tiempo real, con la progresión de la patología en hipocampo (Braak 0, n=8; Braak II, n=21; Braak III-IV, n=9; Braak V-VI, n=28), y corteza frontal (Braak 0, n=10; Braak II, n=13; Braak III-IV, n=12; Braak V-VI, n=11). Se indican los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. Los grupos de muestras de hipocampo y corteza frontal se analizan de forma independiente mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn (hipocampo, $p=0,0009$; corteza frontal, $p=0,0169$). La significancia entre las muestras de hipocampo y corteza frontal se analizan mediante la prueba de Friedman para muestras relacionadas ($p<0,0005$) (* $p<0,5$; *** $p<0,001$).

Para estudiar si esta neurodegeneración podría estar causada o mediada por las patologías amiloide y/o neurofibrilar, presentes en ambas regiones cerebrales, realizamos un ensayo de supervivencia neuronal en presencia de neurosinaptosomas (NS) aislados de los modelos APP y TAU, que contienen diferentes formas de A β y Tau, respectivamente (Figura D.4 A). A pesar de que los cultivos de neuronas primarias presentan una gran variabilidad, nuestros resultados muestran que, en presencia de patología Tau, se produce una degeneración selectiva y muy significativa de neuronas PV+, sin que se afecte el número total de neuronas. Por otra parte, no observamos diferencias en el número de neuronas PV+ tratadas con NS de modelos APP (Figura D.4). Por tanto, la patología Tau podría ser responsable, al menos en parte, de la severa degeneración de estas neuronas GABAérgicas que se produce en la EA.



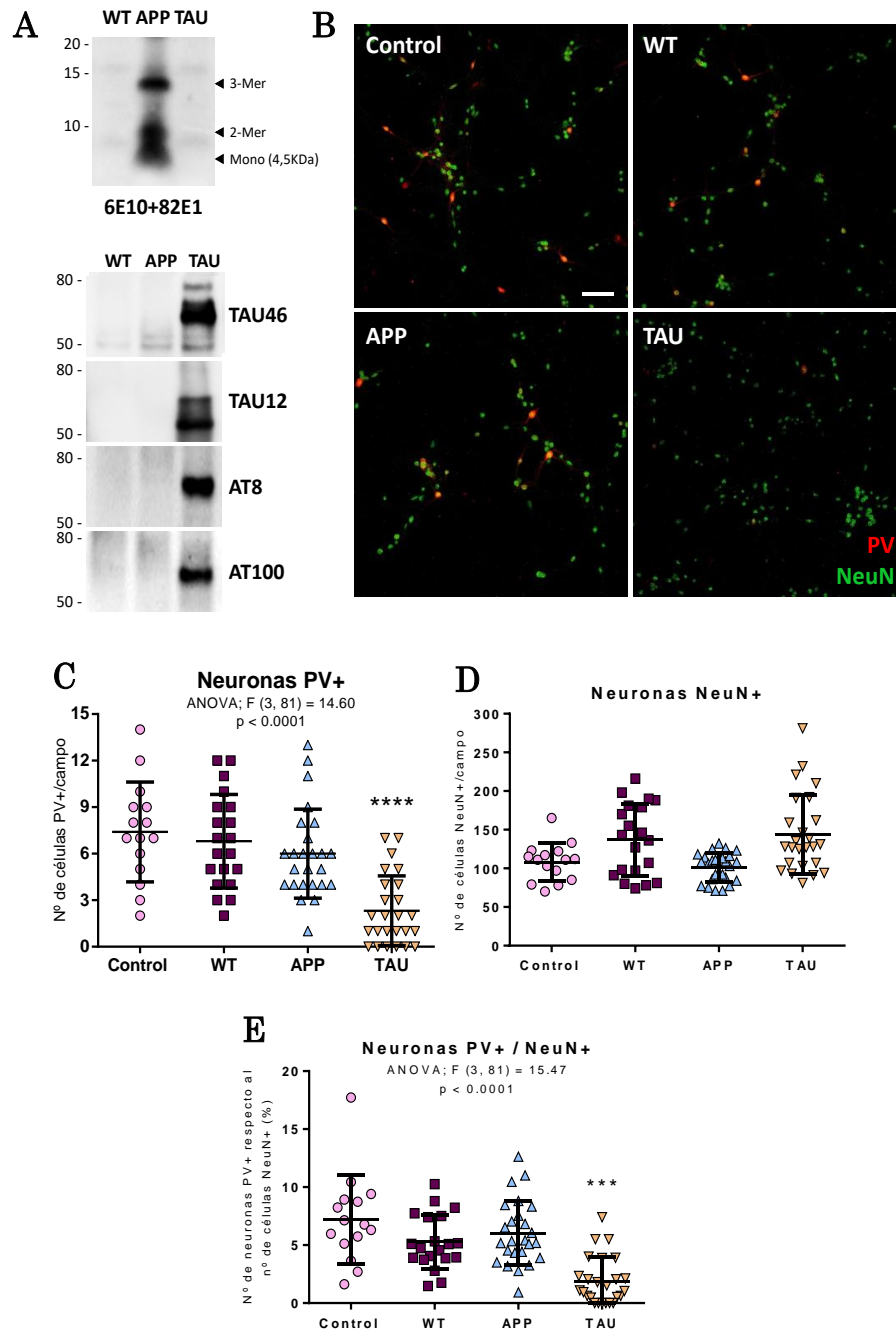


Figura D.4. Degeneración selectiva de neuronas GABAérgicas PV+ en cultivos de neuronas primarias tratadas con neurosinaptosomas (NS) procedentes de ratones TAU. (A) Determinación, mediante western blot, de Aβ (6E10+82E1), Tau total (TAU46, TAU12) y fosforilado (AT8, AT100) en los NS aislados de ratones WT, APP y TAU. **(B)** Imágenes representativas de las neuronas primarias, tras 24 de tratamiento con los diferentes NS en medio de neuronas, marcadas con los anticuerpos PV (rojo) y NeuN (verde). Barra de escala: 100 μm. **(C)** Cuantificación del número de neuronas PV+, **(D)** NeuN+ y **(E)** número de neuronas PV+ corregido por el número de neuronas totales (NeuN+) en la condición control (n=15) y tras el tratamiento con NS WT (n=20), APP (n=25) y TAU (n=25). La estadística se ha analizado mediante el test de ANOVA seguido del test de comparación múltiple Tukey (**p<0,001; ****p<0,0001).



1.3. Estudio de la respuesta microglial en la corteza frontal de pacientes de Alzheimer

El análisis por RT-PCR en tiempo real de la expresión de múltiples genes microgliales en la corteza frontal de pacientes de Alzheimer revela que, algunos genes aumentan de forma muy significativa con la progresión de la patología, mientras que otros permanecen inalterados o incluso disminuyen de forma patente (Figura S1, Anexo I). Con el fin de obtener conclusiones robustas, y de acuerdo con la bibliografía reciente (Hickman et al., 2013; Keren-Shaul et al., 2017; Mathys et al., 2017; Hendrickx et al., 2017; Navarro et al., 2018; Hansen et al., 2018; Hopperton et al., 2018; Friedman et al., 2018) englobamos los marcadores analizados en 3 grupos que denominamos “población microglial”, “microglía DAM” y “microglía homeostática”. Para cada uno de estos grupos calculamos su *Gene Set Score* (S_j) (Friedman et al., 2018). S_j se calcula para cada muestra “j”, utilizando el valor “ e_{ij} ”, que es el nivel de expresión normalizado del gen “i” en la muestra “j”. En primer lugar, calculamos la matriz central de la expresión génica “ c_{ij} ” con la fórmula siguiente: $c_{ij} = e_{ij} - \frac{1}{n_s} \sum_j e_{ij}$; donde “ n_s ” es el número de muestras. “ c_{ij} ” corresponde al nivel de expresión del gen “i” en la muestra “j”, relativo al nivel de expresión medio en todas las muestras. El S_j de un clúster de genes para la muestra “j” (S_j) se define como la media de la matriz “ c_{ij} ”: $S_j = \frac{1}{n_g} \sum_i c_{ij}$; donde “ n_g ” es el número de genes que forman el clúster.

Como observamos en la figura D.5, la expresión del *gene set score* de población microglial no cambia con la progresión de la enfermedad. Sin embargo, se produce un aumento significativo en los genes asociados a microglía DAM, lo que refleja un aumento en la activación microglial. Este incremento se produce de forma paralela a una clara disminución en el *gene set score* de microglía homeostática únicamente en pacientes Braak V-VI.

También estudiamos si existen diferencias en la respuesta microglial de individuos con diferente genotipo APOE, según sean homocigóticos para el alelo $\epsilon 3$ o presenten al menos un alelo $\epsilon 4$. Aunque no observamos diferencias significativas entre individuos Braak II o pacientes Braak V-VI en función del genotipo APOE, existe una leve tendencia a mayor activación microglial en presencia del alelo $\epsilon 4$ (Figura D.6).

Dado la intensa patología A β existente en la corteza frontal de los pacientes de Alzheimer (Figura D.1), estudiamos la relación entre los diferentes *gene set score* microgliales y los niveles de A β monomérico. Nuestros datos revelan una correlación negativa significativa entre la cantidad de A β monomérico y la expresión de genes homeostáticos. Además, se observa una tendencia muy leve a una mayor activación microglial en los individuos con más patología amiloide. Sin embargo, la población microglial no se afecta en función de la cantidad de A β (Figura D.7).



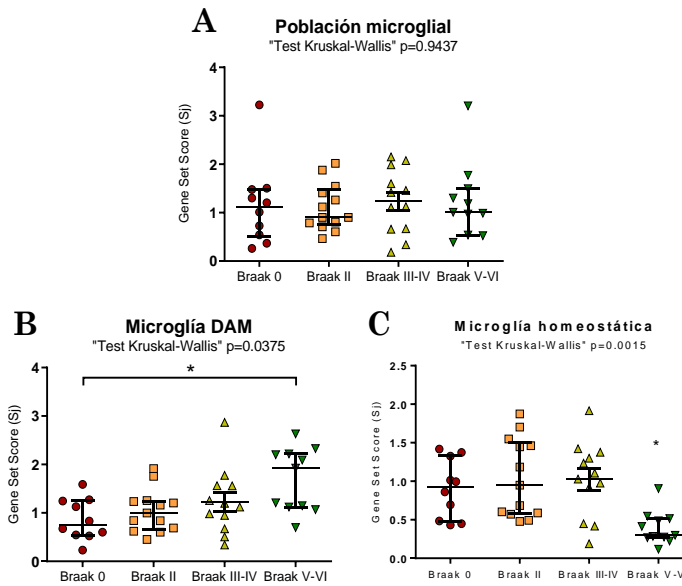


Figura D.5. Activación microglial en la corteza frontal de pacientes de Alzheimer. Representación de los valores de *gene set score* de (A) Población microglial (IBA1 y TMEM119), (B) Microglía DAM (CD45, TREM2, CLEC7A, CD11b) y (C) Microglía homeostática (CX3CR1 y P2RY12), en la corteza frontal de individuos Braak 0 (n=10), II (n=13), III-IV (n=12) y V-VI (n=11). Se representan los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn (*p<0,05).

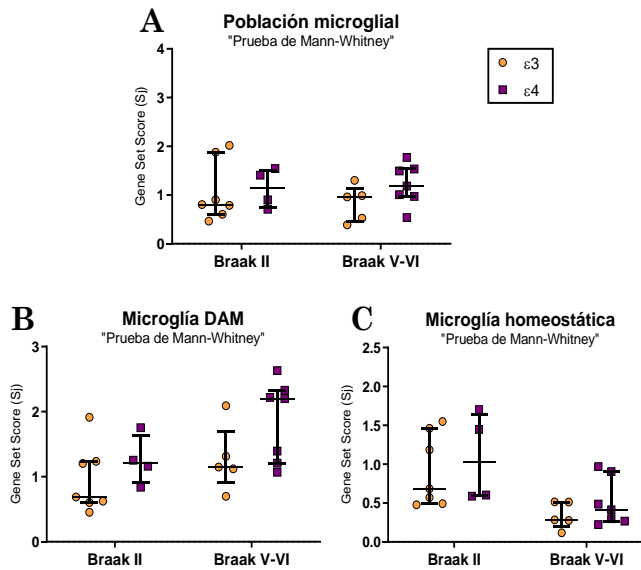


Figura D.6. Microglía en función del genotipo APOE en individuos Braak II y Braak V-VI. Representación de los valores de *gene set score* de (A) Población microglial (IBA1 y TMEM119), (B) Microglía DAM (CD45, TREM2, CLEC7A, CD11b) y (C) Microglía homeostática (CX3CR1 y P2RY12), en la corteza frontal de individuos Braak II (ε3, n=7; ε4, n=4) y V-VI (ε3, n=5; ε4, n=7). Los individuos agrupados como ε3 son homocigóticos para este alelo y los ε4 son homo o heterocigóticos para el alelo ε4. Se indican los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia entre diferentes genotipos se ha analizado mediante la prueba de U de Mann-Whitney.



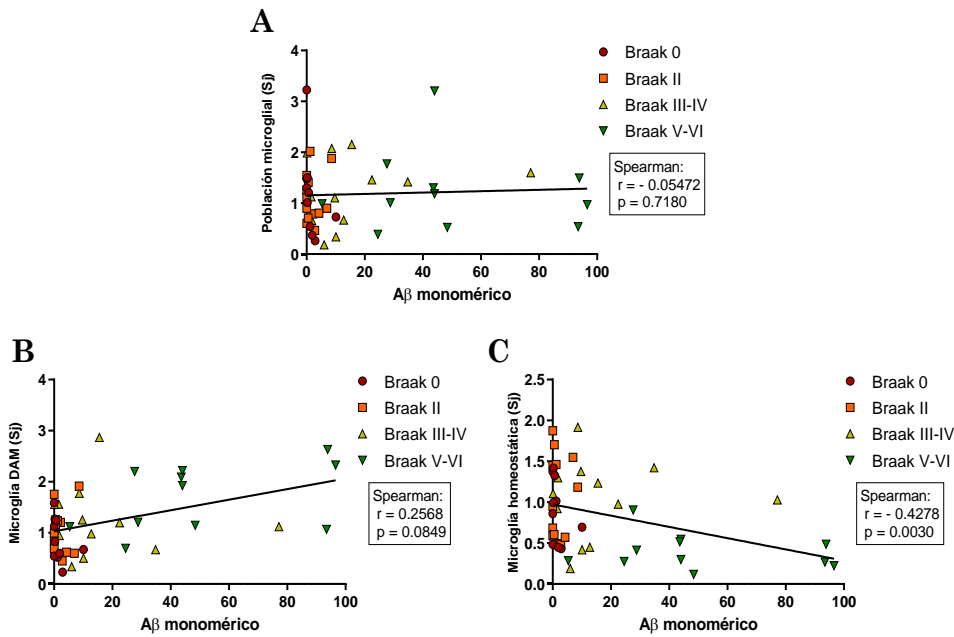


Figura D.7. Análisis de correlación de los diferentes *gene set score* microgliales con el nivel de Aβ monomérico. Estudio de correlación entre la cuantificación de Aβ monomérico y el gene set score de (A) población microglial, (B) microglía DAM y (C) microglía homeostática, para cada individuo clasificado en función del estadio Braak (Braak 0, n=10; Braak II, n=13; Braak III-IV, n=12; Braak V-VI, n=11). Se muestra la recta de ajuste o regresión lineal. El estudio de correlación se ha llevado a cabo empleando el método de Spearman.

En conclusión, nuestros resultados indican que en la corteza frontal de pacientes de Alzheimer no se produce como en el hipocampo una disminución en la población microglial, pero sí una alteración hacia un fenotipo activo. Además, esta región, aunque presenta patología neurofibrilar, se caracteriza especialmente por una importante acumulación de Aβ, que correlaciona con la disminución en la expresión de genes microgliales homeostáticos. Por otra parte, en ambas regiones cerebrales se produce degeneración de neuronas PV+, que parece ser consecuencia, al menos en parte, de la patología Tau.



2. RESPUESTA ASTROGLIAL EN LA PATOLOGÍA DE ALZHEIMER

Estudios previos del laboratorio demuestran que, en modelos animales de EA, se produce una importante reactividad astrocitaria, junto con un aumento en la respuesta del complemento y una disfunción metabólica de los astrocitos (Sanchez-Mico, 2019). Por ello, en el presente trabajo decidimos caracterizar la respuesta astrogial en muestras cerebrales de pacientes de Alzheimer, así como realizar ensayos *in vitro* para profundizar en las causas y consecuencias de esta alteración astrogial en el contexto patológico de la EA.

2.1. Aumento de la reactividad astrogial en muestras *post mortem* de pacientes de Alzheimer

En primer lugar, estudiamos en el hipocampo la expresión de genes de astrocitos reactivos con la progresión de la patología de Alzheimer. Posteriormente, analizamos la posible asociación entre la reactividad astrogial y marcadores característicos de la EA, como el genotipo APOE, la neurodegeneración GABAérgica y las patologías A β y Tau. Además, analizamos la expresión de los mismos genes en la corteza frontal, con distinto patrón de deposición de A β y Tau (Jucker y Walker, 2011).

2.1.1. Aumento de reactividad astrogial en muestras *post mortem* de hipocampo de pacientes de Alzheimer

Tras evaluar mediante RT-PCR a tiempo real diferentes marcadores de astrocitos reactivos en el hipocampo de pacientes de EA, comprobamos que se produce un patente aumento de GFAP, VIM y ALDH1L1 en pacientes Braak V-VI respecto a individuos control Braak II (Figura D.8). Sin embargo, la expresión de S100 β no se modifica con la progresión de la patología y la de acuaporina-4 (AQP-4) tiende a aumentar en pacientes Braak V-VI, aunque los cambios no son significativos.

Posteriormente aplicamos un estudio de correlación para comprobar si los diferentes marcadores de reactividad glial cambian de forma paralela en un mismo individuo. La figura D.8 B muestra los coeficientes de correlación de Spearman entre los genes analizados mediante RT-PCR, y, como se observa, sólo existe correlación positiva entre GFAP y VIM, y entre VIM y ALDH1L1, mientras que los demás genes analizados no presentan correlación entre sí. Como se refleja en la figura D.8 C la correlación entre GFAP y VIM es estadísticamente significativa. La baja correlación entre los demás marcadores, así como el diferente perfil de expresión con la progresión de la patología, podría reflejar la existencia de diferentes poblaciones de astrocitos. De hecho, en la figura D.9 observamos que, en la corteza temporal de pacientes de EA, existen astrocitos asociados a placas que expresan simultáneamente GFAP, VIM y ALDH1L1, mientras que la mayoría de los astrocitos del parénquima son solo ALDH1L1+.



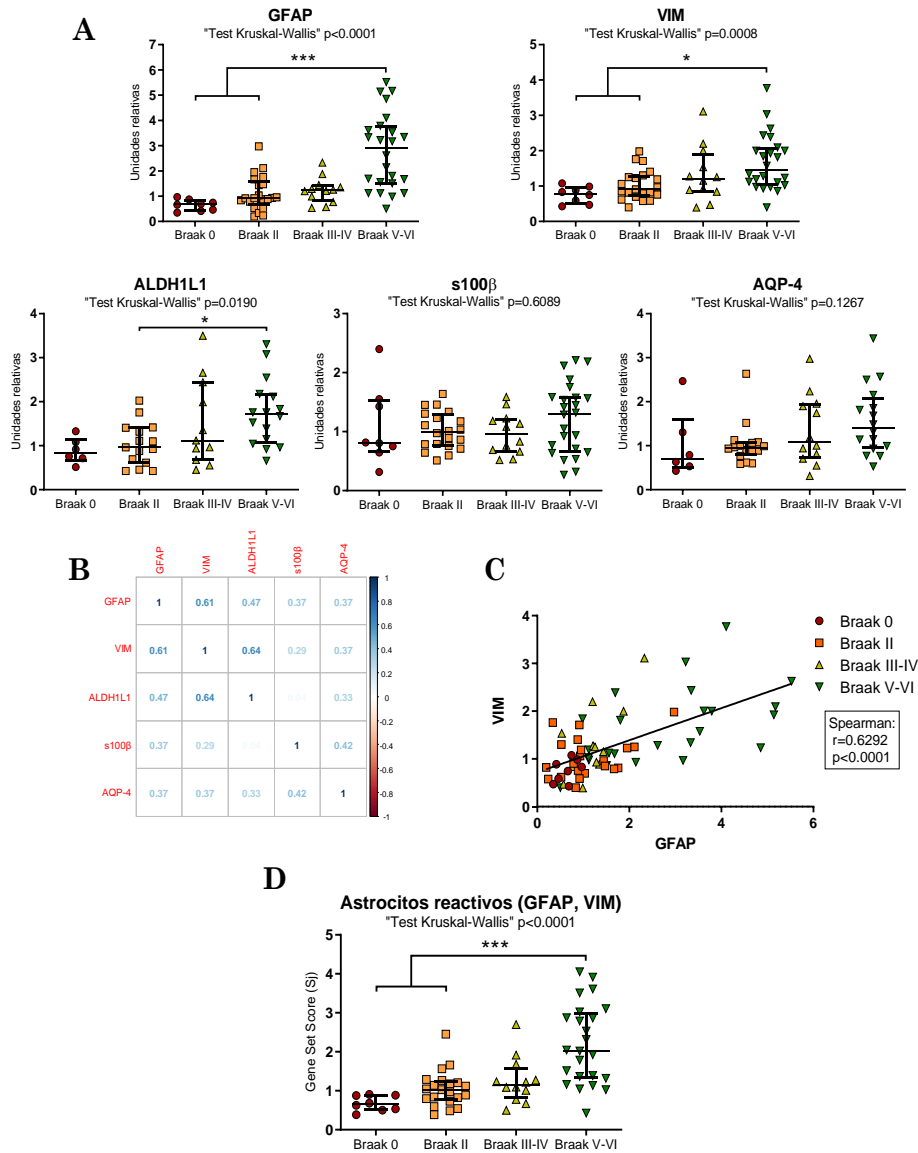


Figura D.8. Reactividad astrogliar en muestras *post mortem* de hipocampo de pacientes de Alzheimer. (A) Expresión relativa de ARNm de los genes de astrocitos reactivos GFAP, VIM, ALDH1L1, S100β y AQP-4 en el hipocampo de individuos Braak 0 (n=6-8), II (n=16-21), III-IV (n=12) y V-VI (n=16-24). Se representan los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn (*p<0,05; ***p<0,001). (B) Matriz de correlaciones de los niveles de expresión de estos genes. El estudio de correlación se ha realizado empleando el método de Spearman. El número indica el coeficiente de correlación de Spearman, siendo la intensidad del color proporcional a este. Las correlaciones positivas se muestran en azul y las negativas, en rojo (n= 50). (C) Análisis de correlación entre los genes GFAP y VIM, con recta de ajuste o regresión lineal. El estudio de correlación se ha llevado a cabo empleando el método de Spearman (n= 65). (D) Representación de los valores de *gene set score* (S_j) de los genes de astrocitos reactivos GFAP y VIM en el hipocampo de individuos Braak 0 (n=8), II (n=21), III-IV (n=12) y V-VI (n=24). Se indican los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn (***p<0,001).



Considerando estos resultados, y apoyándonos en bibliografía previa en la que ampliamente se describen GFAP y VIM como marcadores de astrocitos reactivos (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018) y ALDH1L1 como posible marcador de toda la población astrogliar (Cahoy et al., 2008; Yoon et al., 2017), calculamos el *gene set score* (Sj) de los genes GFAP y VIM, denominándolo **astrocitos reactivos**. En la figura D.8 D, observamos que se produce un aumento significativo de este Sj en pacientes de Alzheimer respecto a individuos Braak 0 y Braak II. Por lo tanto, en el hipocampo de pacientes de EA se produce una importante reactividad astrogliar, que conlleva a un aumento simultáneo en la expresión de GFAP y VIM.

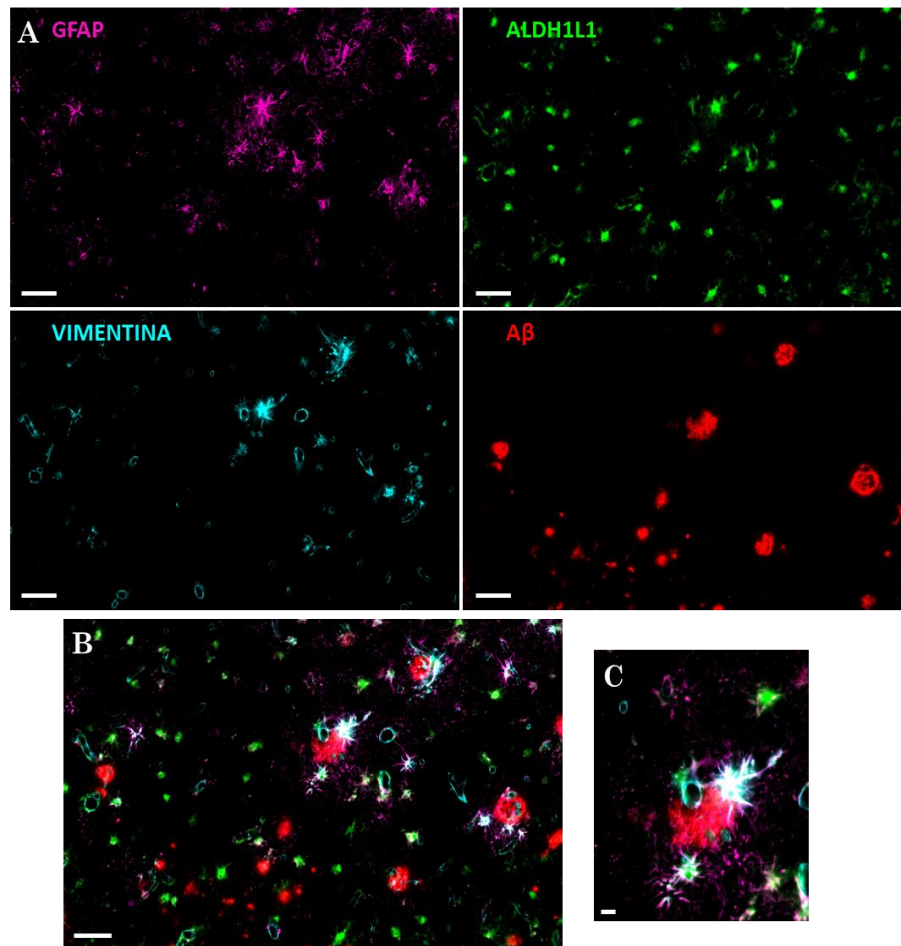


Figura D.9. Diferentes subpoblaciones de astrocitos en muestras *post mortem* de corteza temporal de pacientes de Alzheimer. (A) Astrocitos detectados mediante los marcadores GFAP, ALDH1L1 y VIM; y placas amiloides en una imagen representativa de la capa IV de muestras de polo temporal humanas (BA38) de EA. (B) Resultado de alinear las imágenes mostradas en (A). (C) Ampliación de una placa de Aβ., que muestra que los astrocitos reactivos que la rodean son GFAP, VIM y ALDH1L1 positivos. También observamos un astrocito, no asociado a la placa, ALDH1L1+, pero negativo para los otros marcadores astrogliales. Las imágenes se han obtenido mediante inmunohistoquímica fluorescente múltiple (ver Resultados, Apartado 4) durante una estancia predoctoral en el laboratorio de los doctores Alberto Serrano-Pozo y Bradley Hyman, en el *Massachusetts General Hospital (Harvard Medical School, Estados Unidos)*. Barra de escala: (A-B) 50 μm y (C) 10 μm.



2.1.2. Reactividad astrogliar y genotipo APOE en muestras *post mortem* de hipocampo de pacientes de Alzheimer

Una vez definido el *gene set score* de astrocitos reactivos, estudiamos si existen diferencias en la astrogliosis de individuos con diferente genotipo APOE, según sean homocigotos para $\epsilon 3$ o, al menos, heterocigóticos para $\epsilon 4$. Como se observa en la figura D.10, no existen diferencias entre los individuos Braak II $\epsilon 3\epsilon 3$ y los que presentan al menos un alelo $\epsilon 4$. Respecto a los pacientes de EA, tampoco se observan diferencias significativas, aunque sí tendencia a una mayor reactividad astrogliar en individuos con al menos un alelo $\epsilon 4$ ($p=0.0734$).

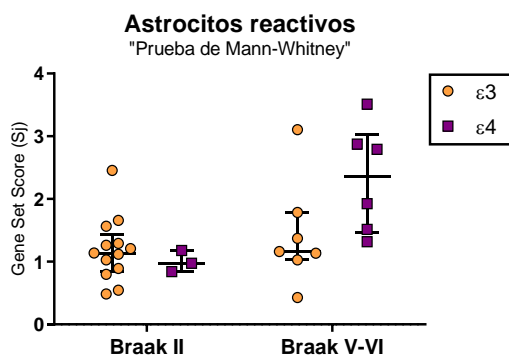


Figura D.10. Reactividad astrogliar en función del genotipo APOE en individuos Braak II y Braak V-VI. Representación de los valores de *gene set score* de los genes de astrocitos reactivos GFAP y VIM en el hipocampo de individuos Braak II ($\epsilon 3$, $n=13$; $\epsilon 4$, $n=3$) y V-VI ($\epsilon 3$, $n=7$; $\epsilon 4$, $n=6$). Los individuos agrupados como $\epsilon 3$ son homocigóticos para este alelo y los $\epsilon 4$ son homo o heterocigóticos para el alelo $\epsilon 4$. Se indican los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia entre diferentes genotipos se ha analizado mediante la prueba U de Mann-Whitney ($*p<0,05$).

2.1.3. Reactividad astrogliar y neurodegeneración GABAérgica en muestras de hipocampo de pacientes de Alzheimer

La neurodegeneración GABAérgica, es uno de los rasgos neuropatológicos típicos en el hipocampo de pacientes de EA. Por tanto, estudiamos la relación entre astrocitos reactivos y la expresión de genes de neuronas GABAérgicas como parvalbúmina (PV), somatoestatina (SST) y neuropéptido Y (NPY).

En la matriz de correlaciones de la figura D.11 A observamos una importante correlación negativa entre PV y los dos marcadores de astrocitos reactivos GFAP y VIM. Estos marcadores también presentan cierta correlación negativa con SST y NPY. Sin embargo, no existe correlación entre los otros marcadores astrocíticos estudiados (ALDH1L1, S100 β y AQP-4) y la neurodegeneración GABAérgica (PV, SST y NPY), a excepción de una posible correlación negativa entre ALDH1L1 y PV.

Al estudiar de forma individual las correlaciones entre el *gene set score* de astrocitos reactivos y cada uno de los marcadores de neurodegeneración analizados (Figura D.11 B-D), observamos que en los tres casos existe una correlación negativa, siendo más clara y significativa en el caso de la neurodegeneración de neuronas PV+.



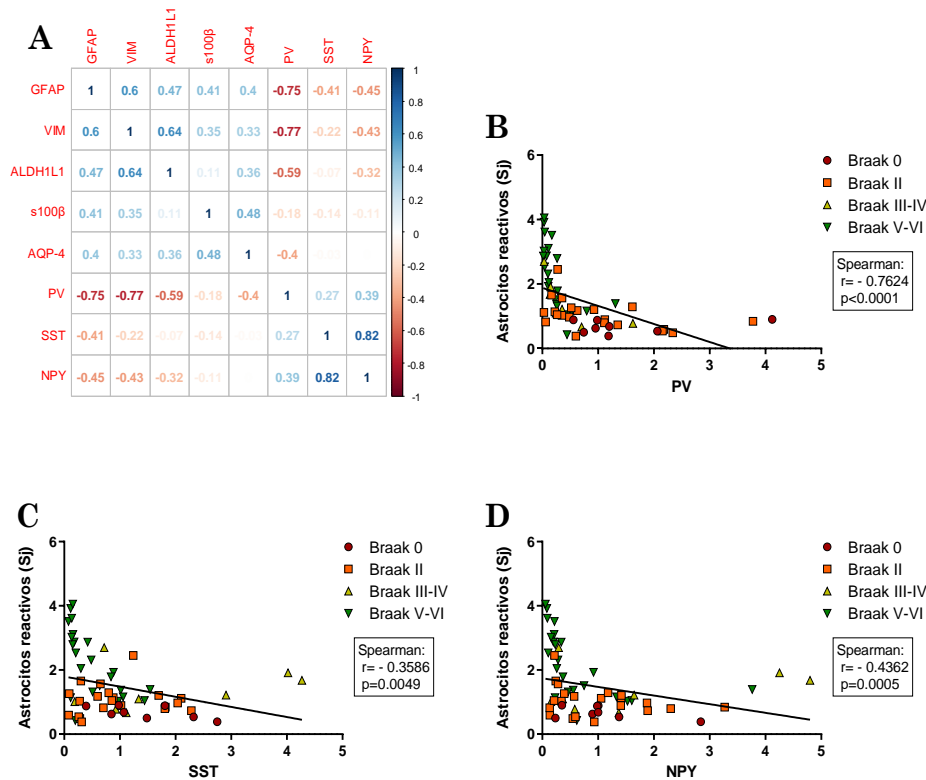


Figura D.11. Análisis de correlación de la reactividad astroglial con la neurodegeneración GABAérgica. (A) Matriz de correlaciones de los niveles de expresión de los genes de astrocitos reactivos (GFAP, VIM, ALDH1L1, S100β, AQP-4) y los marcadores de neurodegeneración GABAérgica PV, SST y NPY, todos ellos analizados mediante RT-PCR en tiempo real. El estudio de correlación se ha realizado empleando el método de Spearman. El número indica el coeficiente de correlación de Spearman, siendo la intensidad del color proporcional a este. Las correlaciones positivas se muestran en azul y las negativas, en rojo (n= 45). (B-D) Estudio de correlación entre los valores de *gene set score* (Si) de Astrocitos reactivos y la expresión relativa de (B) PV, (C) SST y (D) NPY en el hipocampo de individuos Braak 0 (n=8), Braak II (n=21), Braak III-IV (n=8) y Braak V-VI (n=23). Se muestra la recta de ajuste o regresión lineal. El estudio de correlación se ha realizado mediante el método de Spearman.

2.1.4. Reactividad astroglial y patologías Aβ y Tau en muestras de hipocampo de pacientes de Alzheimer

De manera similar al apartado anterior, analizamos las correlaciones entre el *gene set score* de astrocitos reactivos y los niveles de Aβ monomérico, Tau agregado y distintas formas fosforiladas de Tau (Figura D.50).

Respecto a la patología amiloide, observamos una correlación positiva significativa entre la carga de Aβ monomérico y la astrogliosis. Sin embargo, el coeficiente de Spearman está alejado de 1, lo que indica que la correlación lineal no es buena (Figura D.12 A).

También observamos una correlación positiva y significativa de la reactividad astroglial con la carga total de Tau agregado (cuantificado por TAU46, Figura D.12



B), y con las formas fosforiladas de Tau (estudiadas mediante AT8, Figura D.12 C). En ambos casos, la correlación es mejor que con la patología A β . Sin embargo, la correlación de la astrogliosis con formas fosforiladas de Tau detectadas por AT100, a pesar de ser significativa, es muy dispersa (Figura D.12 D).

En resumen, y considerando las limitaciones asociadas al uso de muestras humanas, aunque no existe una excelente correlación entre la reactividad astrogliosa y la acumulación de A β y Tau, nuestros resultados apuntan a una posible asociación con dichas patologías, principalmente con la originada por Tau.

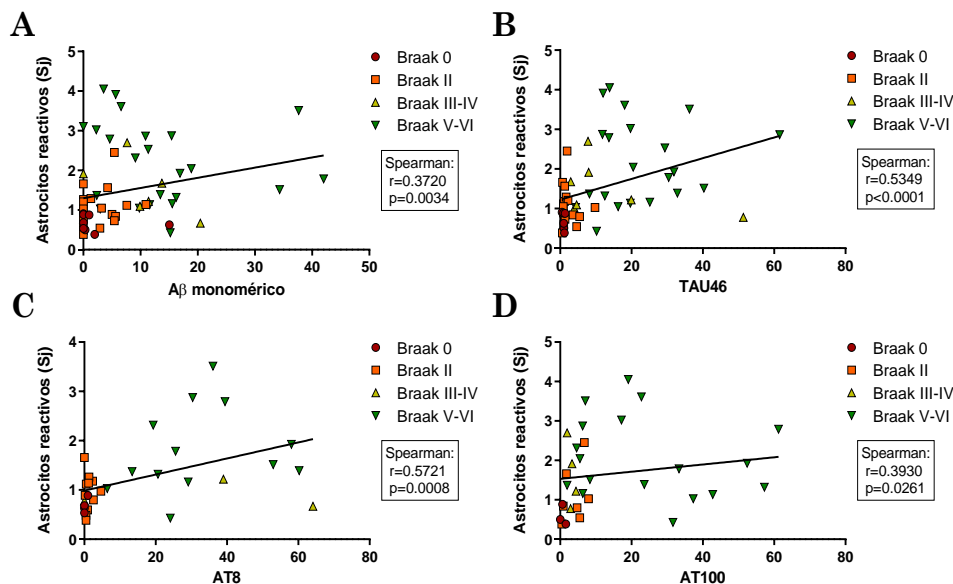


Figura D.12. Análisis de correlación de la reactividad astrogliosa con las patologías A β y Tau. Estudio de correlación entre los valores de *gene set score* (S_i) de Astrocitos reactivos y la carga de (A) A β monomérico (n=60), (B) Tau total medido con el anticuerpo TAU46 (n=50), (C) formas fosforiladas de Tau detectadas por el anticuerpo AT8 (n=31) y (D) formas fosforiladas de Tau reconocidas por AT100 (n=32), analizados mediante Western blot. Se muestra la recta de ajuste o regresión lineal. El estudio de correlación se ha llevado a cabo empleando el método de Spearman.

2.1.5. Aumento de reactividad astrogliosa en muestras *post mortem* de corteza frontal de pacientes de Alzheimer

Tras observar una posible asociación entre la patología Tau y la reactividad astrogliosa en el hipocampo de pacientes de EA, decimos estudiar el comportamiento de los astrocitos en la corteza frontal con la progresión de la patología. Como ya hemos mencionado, la corteza frontal es una de las primeras áreas cerebrales afectadas por la patología amiloide y de las últimas en presentar ovillos neurofibrilares, ya que sigue un patrón de deposición muy diferente al hipocampo.

Como observamos en la figura D.13 A, en corteza frontal la expresión de GFAP aumenta de forma progresiva con la patología, siendo significativo el incremento a partir de Braak III-IV (respecto a Braak 0). La expresión de VIM se mantiene hasta estadios Braak III-IV y aumenta en Braak V-VI (Figura D.13 B). Al



igual que con las muestras de hipocampo, calculamos el *gene set score* para GFAP y VIM en corteza frontal (Figura D.13 C), observando un aumento claramente significativo en la reactividad glial con la progresión de la patología. No observamos diferencias en función del genotipo APOE (Figura D.13 D).

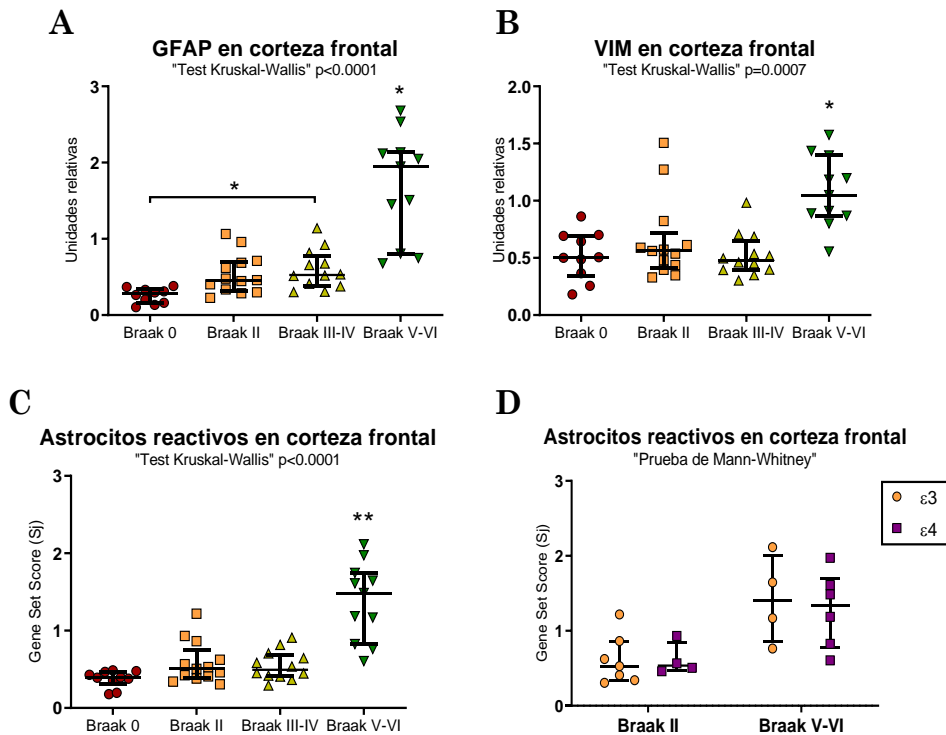


Figura D.13. Reactividad astrogliar en muestras *post mortem* de corteza frontal de pacientes de Alzheimer. Expresión relativa de ARNm de los genes de astrocitos reactivos (A) GFAP y (B) VIM en la corteza frontal de individuos Braak 0 (n=10), II (n=13), III-IV (n=12) y V-VI (n=11). Se representan los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn (*p<0,05). (C) Representación de los valores de *gene set score* (Si) de los genes de Astrocitos reactivos GFAP y VIM en la corteza frontal de individuos Braak 0 (n=10), II (n=13), III-IV (n=12) y V-VI (n=11). Se indican los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn (**p<0,01). (D) Reactividad astrogliar en función del genotipo APOE en individuos Braak II y Braak V-VI. Representación de los valores de *gene set score* de los genes de astrocitos reactivos GFAP y VIM en la corteza frontal de individuos Braak II (ε3, n=7; ε4, n=4) y V-VI (ε3, n=4; ε4, n=6). Los individuos agrupados como ε3 son homocigóticos para este alelo y los ε4 son homo o heterocigóticos para el alelo ε4. Se indican los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia entre diferentes genotipos se ha analizado mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Es importante aclarar que todas las gráficas de este apartado se han normalizado respecto a los valores de las muestras de hipocampo de individuos Braak II. Por tanto, nuestros resultados muestran que la expresión de GFAP y VIM es mayor en hipocampo que en corteza frontal, tanto en individuos control como en el resto de los estadios Braak. En este sentido, tenemos que considerar la elevada heterogeneidad astrogliar existente entre diferentes regiones cerebrales, ya que en



el hipocampo existe un mayor número de astrocitos GFAP+ que en la corteza frontal (Matias et al., 2019). A pesar de ello, el incremento del *gene set score* de astrocitos reactivos en las muestras Braak V-VI con respecto a Braak II de la misma región es similar en hipocampo que en corteza frontal (datos no mostrados; prueba U de Mann-Whitney; $p=0,7170$; corteza frontal, mediana=2,557; rango intercuartílico de 1,421 a 3,001; hipocampo, mediana=2,046, rango intercuartílico de 1,318 a 3,021).

En resumen, en pacientes de Alzheimer se produce un aumento en la reactividad de los astrocitos tanto en el hipocampo como en la corteza frontal, que podría mediar la neurodegeneración de neuronas GABAérgicas, principalmente PV+. Esta reactividad parece ser mayor en los individuos con mayor patología, tanto neurofibrilar (principalmente) como amiloide. Sin embargo, se requiere realizar estudios funcionales para obtener conclusiones mas contundentes al respecto.

2.2. Aumento de la respuesta del complemento en el hipocampo y la corteza frontal de pacientes de EA

Estudios transcriptómicos previos realizados en nuestro laboratorio en astrocitos aislados de modelos APP y TAU revelan que, en ambos modelos, aunque principalmente en ratones APP, se produce un aumento en la expresión de varios genes del sistema del complemento (Figura D.14). Por ello, en este trabajo decidimos analizar la expresión de genes relacionados con el sistema del complemento en el hipocampo de pacientes de Alzheimer, y su posible relación con la reactividad astrogliar, el genotipo APOE, la neurodegeneración GABAérgica y las patologías A β y Tau. Además, estudiamos la expresión de estos genes en corteza frontal.

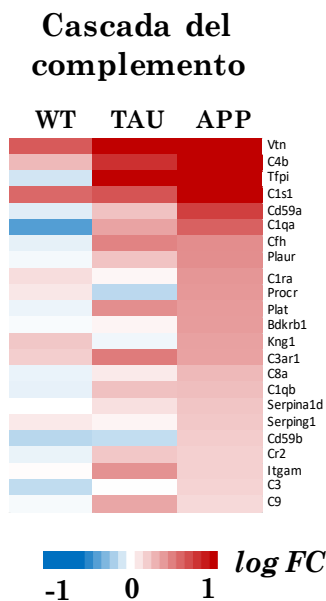


Figura D.14. Expresión de genes relacionados con la cascada del complemento en astrocitos aislados de diferentes modelos murinos de la EA. Genes implicados en la cascada del complemento en los astrocitos aislados de animales WT, APP y TAU adultos (WT y APP, 12 meses; TAU, 9 meses), respecto a animales WT, APP y TAU de 3 meses. El esquema de color del *heatmap* es indicativo del logaritmo del *fold change*, de -1 (azul) a 1 (rojo). Experimento realizado en nuestro laboratorio por la Dra. María V. Sánchez Micó.



2.2.1. Aumento de la respuesta del complemento en muestras *post mortem* de hipocampo de pacientes de EA

En el hipocampo de pacientes de EA se produce un aumento significativo en la expresión de ARNm de diferentes componentes del sistema del complemento (C1S, C1R, C3 y C4a-b) con respecto a individuos Braak 0 y Braak II (Figura D.15 A). Los individuos Braak III-IV poseen niveles intermedios en todos los genes analizados, a excepción de C4a-b que presenta niveles similares a Braak 0 y II.

El *gene set score* del sistema del complemento refleja el comportamiento descrito anteriormente para los genes individuales, con un aumento en Braak V-VI respecto a Braak 0 y II, mientras que los individuos Braak III-IV tienen niveles intermedios.

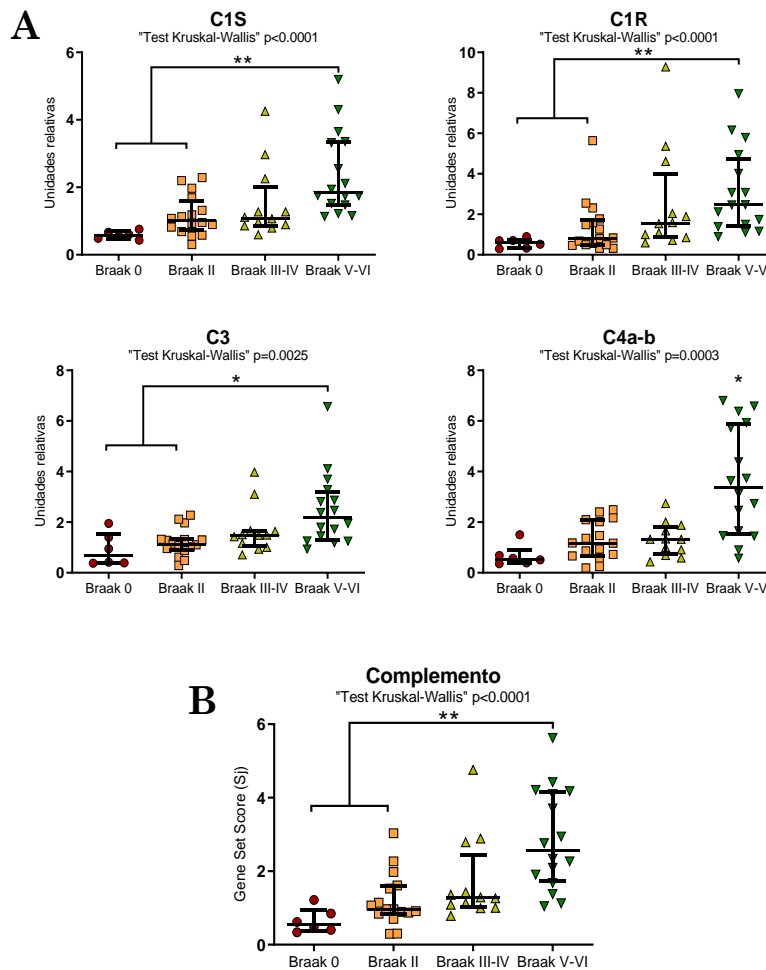


Figura D.15. Respuesta del complemento en muestras *post mortem* de hipocampo de pacientes de Alzheimer. (A) Expresión relativa de ARNm de los genes involucrados en la cascada del complemento C1S, C1R, C3 y C4a-b en el hipocampo de individuos Braak 0 (n=6), II (n=16), III-IV (n=12) y V-VI (n=16). **(B)** Representación de los valores de *gene set score* (S_j) de los genes del Complemento indicados previamente. Se representan los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los diferentes estadios Braak. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn (*p<0,05; **p<0,01).



2.2.2. La respuesta del complemento en el hipocampo de pacientes de EA parece estar mediada principalmente por los astrocitos reactivos

Considerando que tanto microglía como astrocitos podrían participar en la respuesta del complemento, analizamos de manera conjunta e individual las correlaciones entre el *gene set score* del complemento con los *gene set score* de astrocitos reactivos, microglía homeostática y microglía DAM (Figuras D.8 D y D.41 B-C).

Como se observa en la figura D.16, el *gene set score* del sistema del complemento presenta una muy buena correlación con la reactividad astrogliar, tanto si se analiza de manera conjunta como de manera individual para cada uno de los genes estudiados. Sin embargo, hay una correlación negativa con el clúster de microglía homeostática, ya que la expresión de estos genes disminuye en los pacientes de EA. Tampoco observamos asociación entre la respuesta del complemento y la microglía DAM. En consecuencia, nuestros datos parecen indicar que los astrocitos reactivos presentan un papel fundamental en la respuesta del complemento que se produce en el hipocampo de pacientes de EA.

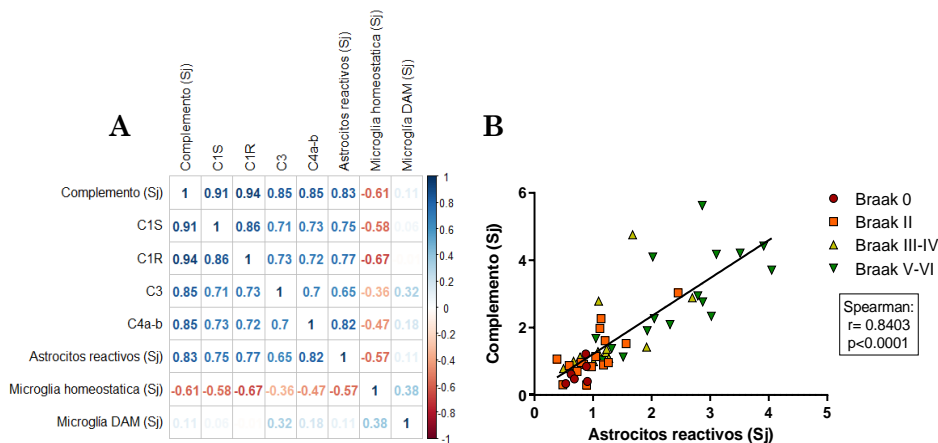


Figura D.16. Análisis de correlación de los astrocitos reactivos y la respuesta del complemento. (A) Matriz de correlaciones de los *gene set score* de Complemento (C1S, C1R, C3, C4a-b), Astrocitos reactivos (GFAP y VIM), Microglía homeostática (CX3CR1 y P2RY12) y microglía DAM (TREM2, P2RX4, CD45, CD74, CD11b, CD11c, PU.1, PILRA, CSF1, CSF1R) en muestras de hipocampo de diferentes estadios Braak (n=45). También se incluyen los valores de expresión relativa de los genes incluidos en el *gene set score* del Complemento. El estudio de correlación se ha realizado empleando el método de Spearman. El número indica el coeficiente de correlación de Spearman, siendo la intensidad del color proporcional a este. Las correlaciones positivas se muestran en azul y las negativas, en rojo (n= 45). (B) Análisis de correlación entre el *gene set score* de los genes de astrocitos reactivos GFAP y VIM y el *gene set score* de los genes de la respuesta del complemento C1S, C1R, C3 Y C4a-b, con recta de ajuste o regresión lineal, en el hipocampo de individuos Braak 0 (n=6), II (n=16), III-IV (n=12) y V-VI (n=16). El estudio de correlación se ha llevado a cabo empleando el método de Spearman.



2.2.3. Respuesta del complemento y genotipo APOE en muestras *post mortem* de hipocampo de pacientes de Alzheimer

De igual forma que con los marcadores de reactividad astrogliar, estudiamos si existen diferencias en la respuesta del complemento de individuos con diferente genotipo APOE, según presenten dos alelos ε3 o al menos un alelo ε4. Como se observa en la figura D.17, no existen diferencias entre los individuos de un mismo estadio Braak en función del genotipo APOE. Sin embargo, para obtener una conclusión robusta deberíamos ampliar el número de casos incluidos en cada grupo.

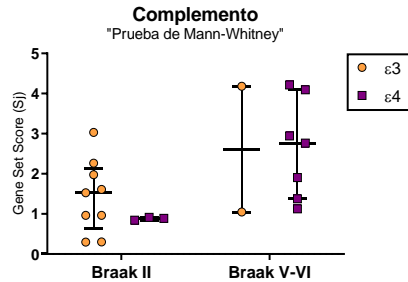


Figura D.17. Respuesta del complemento en función del genotipo APOE en individuos Braak II y Braak V-VI. Representación de los valores de *gene set score* de los genes del Complemento C1S, C1R, C3 y C4a-b en el hipocampo de individuos Braak II (ε3, n=9; ε4, n=3) y V-VI (ε3, n=2; ε4, n=7). Los individuos agrupados como ε3 son homocigóticos para este alelo y los ε4 son homo o heterocigóticos para el alelo ε4. Se indican los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba U de Mann-Whitney.

2.2.4. Respuesta del complemento y neurodegeneración GABAérgica en muestras *post mortem* de hipocampo de pacientes de Alzheimer

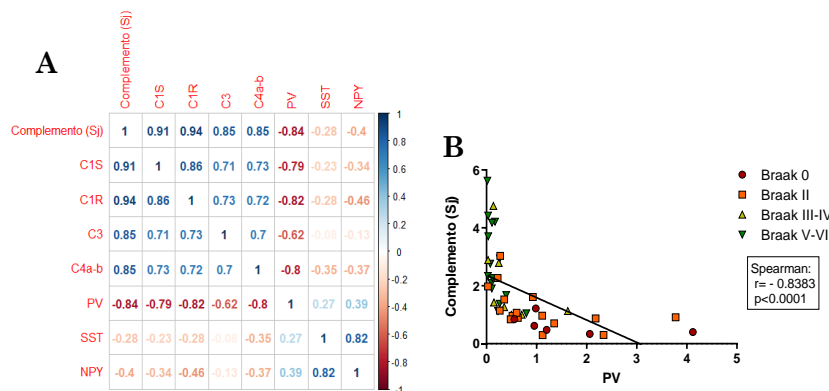


Figura D.18. Análisis de correlación de la respuesta del complemento con la neurodegeneración GABAérgica. (A) Matriz de correlaciones de los niveles de expresión de los genes del sistema del complemento y su *gene set score* Complemento con los marcadores de neurodegeneración GABAérgica PV, SST y NPY, analizados mediante RT-PCR en tiempo real. El estudio de correlación se ha realizado empleando el método de Spearman. El número indica el coeficiente de correlación de Spearman, siendo la intensidad del color proporcional a este. Las correlaciones positivas se muestran en azul y las negativas, en rojo (n= 45). (B-D) Estudio de correlación entre los valores de *gene set score* (Sj) de Complemento y la expresión relativa de PV en el hipocampo de individuos Braak 0 (n=6), Braak II (n=16), Braak III-IV (n=8) y Braak V-VI (n=15). Se muestra la recta de ajuste o regresión lineal. El estudio de correlación se ha realizado mediante el método de Spearman.



En la matriz de correlaciones de la figura D.18 A, observamos que todos los genes analizados de la respuesta del complemento, así como su *gene set score*, correlacionan de forma importante con la degeneración de neuronas PV+ y no con la de SST y NPY. En la figura D.18 B confirmamos la correlación significativa entre el *gene set score* del sistema del complemento y la expresión de ARNm de PV.

2.2.5. Respuesta del complemento y patologías A β y Tau en muestras de hipocampo de pacientes de Alzheimer

En la figura D.19 A, observamos que no existe una correlación clara entre la respuesta del complemento y la cantidad de A β monomérico, de Tau total y de diferentes formas fosforiladas de Tau, aunque sí existe cierta tendencia hacia un aumento en la expresión de los genes del sistema del complemento en aquellos individuos con mayor acumulación de estas proteínas anómalas.

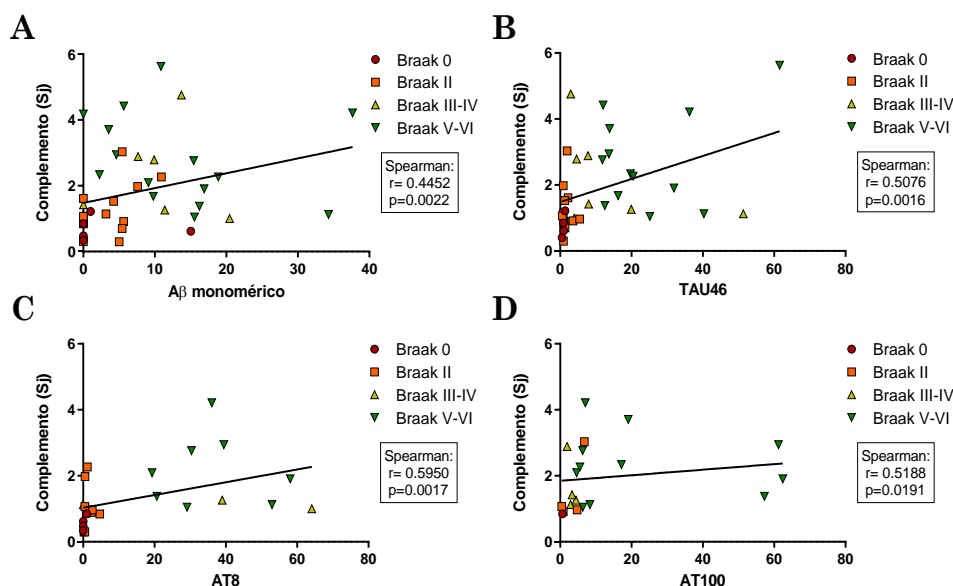


Figura D.19. Análisis de correlación de la repuesta del complemento con las patologías A β y Tau. Estudio de correlación entre los valores de *gene set score* (S_j) de Complemento y la carga de (A) A β monomérico (n=45), (B) Tau total medido con el anticuerpo TAU46 (n=36), (C) formas fosforiladas de Tau detectadas por el anticuerpo AT8 (n=25) y (D) formas fosforiladas de Tau reconocidas por AT100 (n=20), analizados mediante Western blot. Se muestra la recta de ajuste o regresión lineal. El estudio de correlación se ha llevado a cabo empleando el método de Spearman.

2.2.6. Aumento de la respuesta del complemento en muestras *post mortem* de corteza frontal de pacientes de Alzheimer

En la corteza frontal de pacientes de EA también se produce un aumento en la respuesta del complemento, ya que, como refleja la figura D.20, todos los genes analizados y su *gene set score* aumentan de forma significativa en estadio Braak V-VI. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede en hipocampo, la respuesta del complemento parece ocurrir en etapas avanzadas de la patología, ya que los individuos Braak III-IV presentan un perfil similar al de los controles.



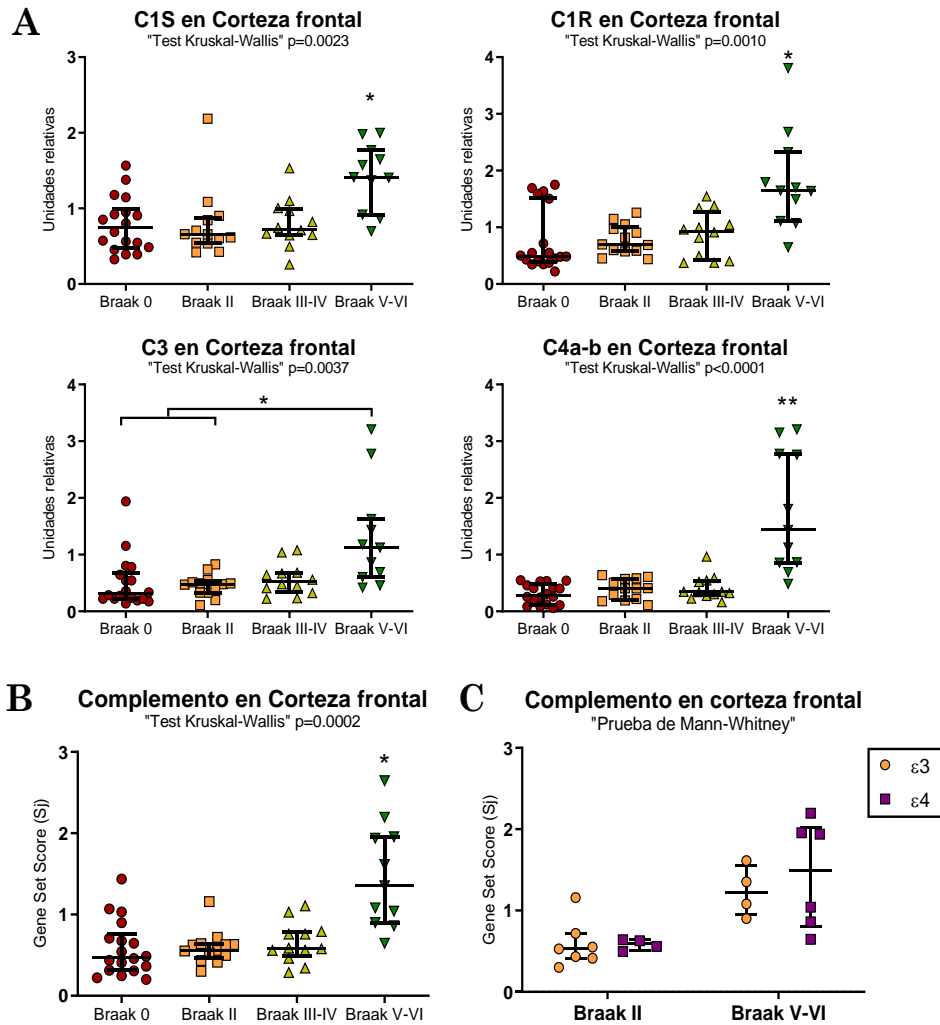


Figura D.20. Respuesta del complemento en muestras *post mortem* de corteza frontal de pacientes de Alzheimer. (A) Expresión relativa de ARNm de los genes del sistema del complemento C1S, C1R, C3 y C4a-b, analizados mediante RT-PCR en tiempo real, en la corteza frontal de individuos Braak 0 (n=18), II (n=13), III-IV (n=12) y V-VI (n=11). (B) Representación de los valores de *gene set score* (S_j) del complemento en la corteza frontal de individuos Braak 0 (n=18), II (n=13), III-IV (n=12) y V-VI (n=11). Se indican los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn (*p<0.05; **p<0.01). (C) Expresión del complemento en función del genotipo APOE en la corteza de individuos Braak II (ϵ_3 , n=7; ϵ_4 , n=4) y V-VI (ϵ_3 , n=7; ϵ_4 , n=6). Los individuos agrupados como ϵ_3 son homocigóticos para este alelo y los ϵ_4 son homo o heterocigóticos para el alelo ϵ_4 . Se indican los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba U de Mann-Whitney.

Conviene aclarar que los resultados de este apartado se han normalizado respecto los valores de hipocampo Braak II, lo que nos permite concluir que la corteza frontal presenta un nivel de expresión basal de los genes del sistema del complemento inferior al de hipocampo. Sin embargo, al igual que con los genes de reactividad astrogliar, el incremento en las muestras Braak V-VI con respecto a



Braak II de su respectiva región cerebral es similar (datos no mostrados; prueba U de Mann-Whitney; $p=0,7211$; corteza frontal, mediana=2,290; rango intercuartílico de 1,526 a 3,310; hipocampo, mediana=2,337, rango intercuartílico de 1,680 a 4,179). Tampoco observamos diferencias en función del genotipo APOE (Figura D.20 C).

2.3. Disminución del metabolismo de los astrocitos *in vitro*, en modelos y pacientes de EA

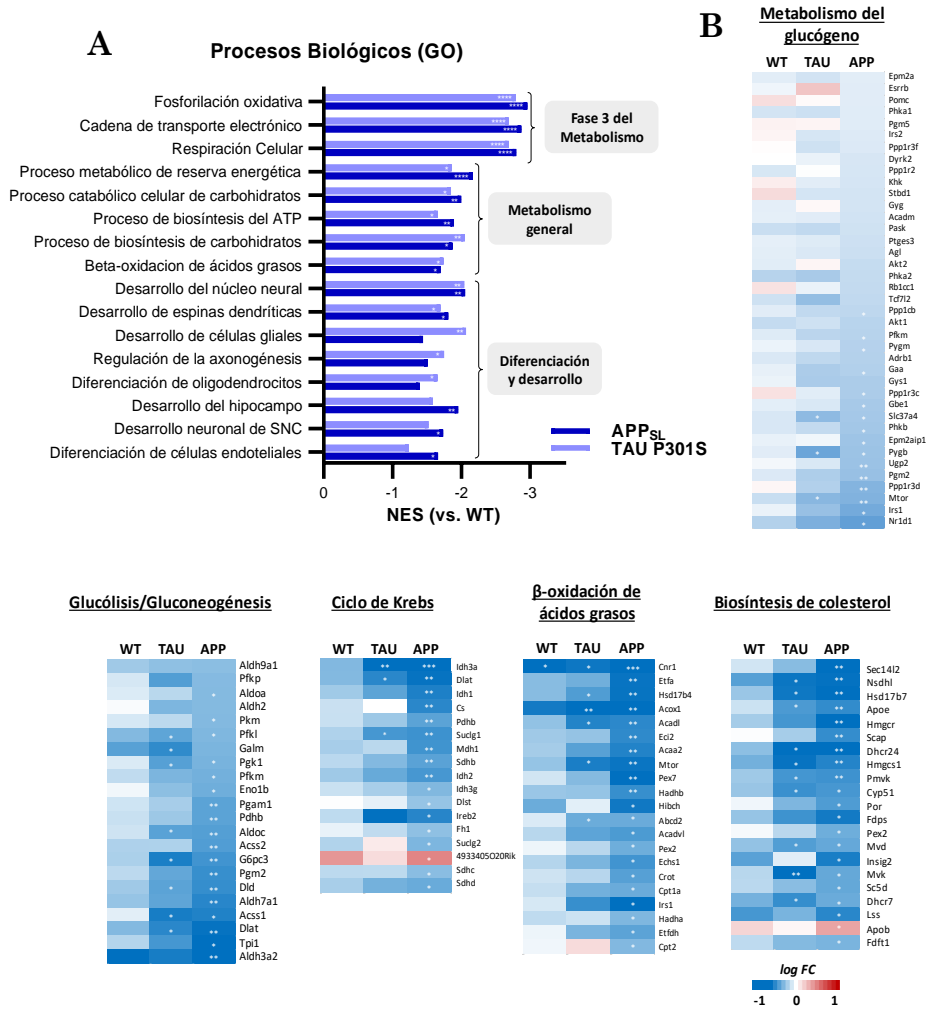


Figura D.21. Disminución del metabolismo de astrocitos aislados de diferentes modelos murinos de la EA. (A) Procesos biológicos (GO: gene ontology) que se encuentran disminuidos en los astrocitos aislados de ratones APP de 12 meses y TAU de 9 meses, respecto a los procedentes de WT de 12 meses. NES: factor de enriquecimiento normalizado. FDR q-val (un valor de p-value ajustado) = 0,05 (*), 0,01 (**), 0,001 (***), 0,0001 (****). (B) Genes implicados en diferentes procesos biológicos que se encuentran disminuidos en los astrocitos aislados de animales APP y TAU. Se muestra el logaritmo del fold change, en código de colores de -1 (azul) a 1 (rojo), respecto a los animales de 3 meses. “FDR” = 0,05 (*), 0,01 (**), 0,001 (***). Experimento realizado de forma previa en nuestro laboratorio por la Dra. María V. Sánchez Micó.



En nuestro laboratorio hemos observado un cambio profundo en el perfil transcripcional de los astrocitos en el contexto patológico de la EA, ya que los astrocitos aislados de modelos APP y TAU muestran una disminución en rutas metabólicas centrales, así como en diferentes procesos de diferenciación y desarrollo (Sanchez-Mico, 2019, Figura D.21 A). Tal y como se representa en la figura D.21 B, los procesos metabólicos se afectan mayoritariamente en el modelo con patología amiloide. En base a estos datos, en este proyecto de Tesis doctoral, hemos estudiado el metabolismo de los astrocitos *in vitro*, y su alteración en presencia de formas solubles de A β y Tau, así como en modelos animales y pacientes de la EA.

2.3.1. La disminución metabólica de los astrocitos *in vitro* podría reducir su capacidad neuroprotectora

2.3.1.1. Disminución metabólica de los astrocitos *in vitro* en presencia de patología A β

Tras observar mediante estudios transcriptómicos que, en astrocitos aislados de modelos murinos de EA se produce una importante disminución metabólica, nos planteamos reproducir *in vitro* este fenotipo energético. Para ello, tratamos astrocitos primarios con fracciones solubles (S1) obtenidas de modelos APP de 12 meses (ricas en formas oligoméricas solubles de A β ; Figura S2, Anexo I). El metabolismo de los astrocitos se determina usando el analizador de flujo extracelular Seahorse XFp (Ver Materiales y métodos, Apartado 5). Este equipo nos permite medir la velocidad de consumo de oxígeno (OCR) y la velocidad de acidificación extracelular (ECAR) de los astrocitos vivos en tiempo real, tanto en condiciones basales, como tras la administración de diferentes compuestos moduladores del metabolismo (oligomicina, FCCP, rotenona y antimicina A). De esta forma podemos estudiar la respiración mitocondrial ligada al consumo de oxígeno, y la glucólisis, ya que la acidificación del medio se relaciona con la producción de lactato por esta vía.

El tratamiento durante 24 horas de un cultivo de astrocitos primarios con fracciones solubles (S1) de ratones APP de 12 meses, aunque origina una ligera bajada en OCR y ECAR, no altera de manera significativa ningún parámetro de la respiración mitocondrial ni de la glucólisis (Figura D.22). Sin embargo, cuando aumentamos el tiempo de tratamiento de los astrocitos a 48 horas, se produce una importante y significativa disminución en todos los parámetros claves de la respiración mitocondrial, aunque no se altera la glucólisis basal, ni el flujo glucolítico máximo (Figura D.23 B). Además, observamos una disminución dependiente del tiempo en la respiración máxima de los astrocitos tras el tratamiento con S1 de ratones APP (Figura D.24).

Para disminuir la variabilidad que pueda ocasionar la diferencia en el número de células usadas en los experimentos descritos, hemos corregido los valores de OCR y ECAR por la cantidad total de proteínas, determinada mediante Western blot con el anticuerpo GAPDH (Figuras D.22 E y D.23 E). Aunque en los experimentos a 24 horas existe una mayor variabilidad, que podría contribuir a explicar las diferencias observadas entre réplicas, en los experimentos a 48 horas el número de células empleado es muy homogéneo, lo que aumenta la fiabilidad de nuestros resultados.



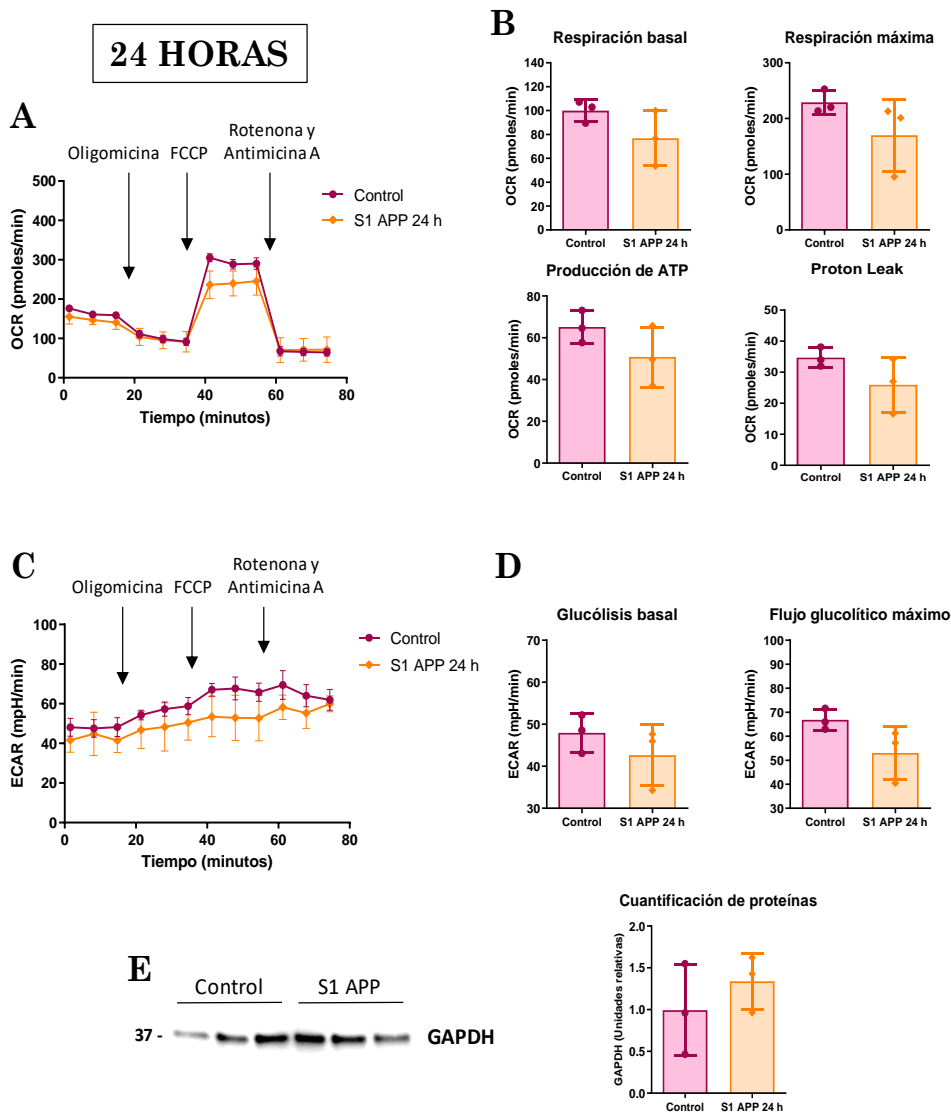


Figura D.22. Estudio de la respiración mitocondrial y de la glucólisis en astrocitos primarios tratados con S1 de modelos APP de 12 meses durante 24 horas. (A) Estudio de la respiración mitocondrial mediante la medida de la velocidad de consumo de oxígeno (OCR), (B) Parámetros clave de la respiración mitocondrial obtenidos a partir de la OCR, (C) Estudio de la glucólisis mediante la medida de la velocidad de acidificación extracelular (ECAR), (D) Glucólisis basal y flujo glucolítico máximo, en condiciones basales y tras el tratamiento con oligomicina, FCCP y la combinación rotenona y antimicina A, en astrocitos primarios control y previamente tratados con S1 durante 24 horas, empleando el analizador Seahorse XFp. (E) Cuantificación de las proteínas presentes en cada réplica mediante Western blot, empleada para normalizar los valores de OCR y ECAR. Se representan los valores individuales, así como la media± SD para una n=3 por grupo. La estadística se ha analizado mediante el T-test (**p<0,01; ***p<0,001; ****p<0.0001).



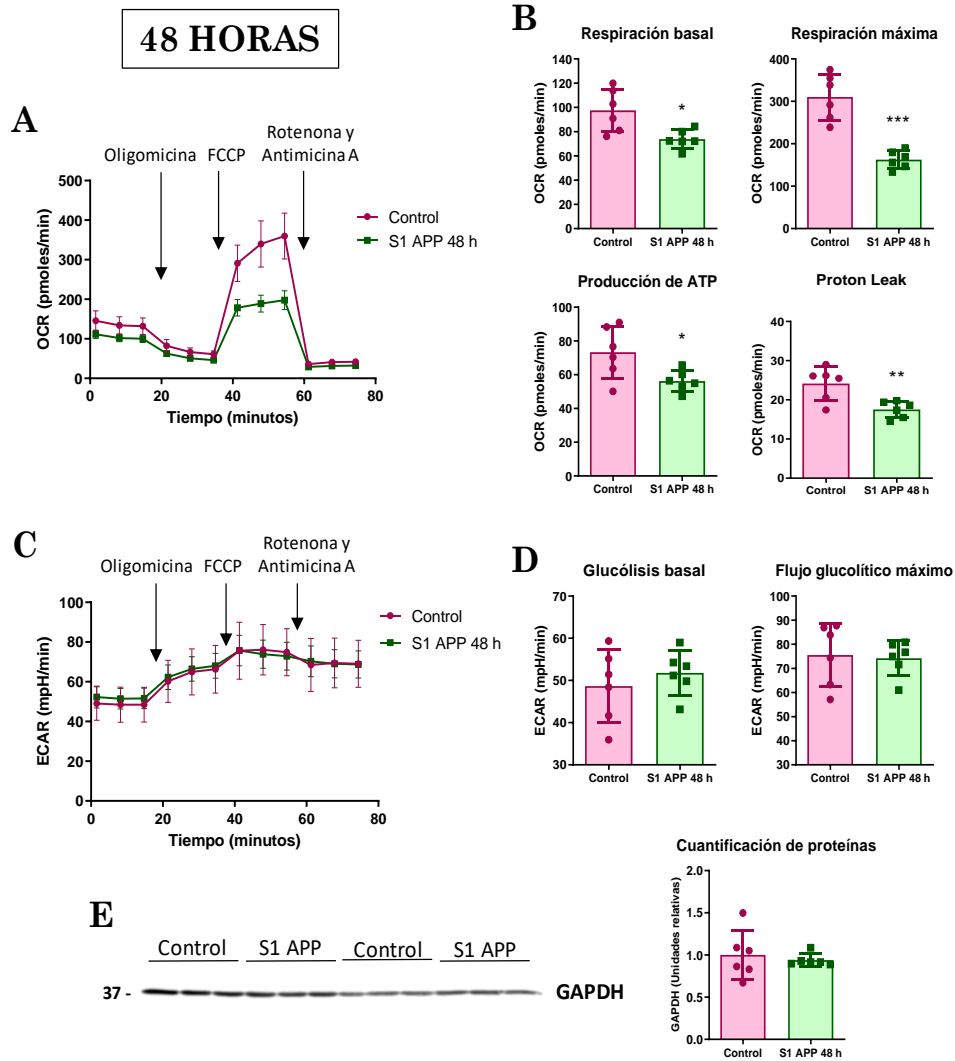


Figura D.23. Estudio de la respiración mitocondrial y de la glucólisis en astrocitos primarios tratados con S1 de modelos APP de 12 meses durante 48 horas. (A) Estudio de la respiración mitocondrial mediante la medida de la velocidad de consumo de oxígeno (OCR), (B) Parámetros clave de la respiración mitocondrial obtenidos a partir de la OCR, (C) Estudio de la glucólisis mediante la medida de la velocidad de acidificación extracelular (ECAR), (D) Glucólisis basal y flujo glucolítico máximo, en condiciones basales y tras el tratamiento con oligomicina, FCCP y la combinación rotenona y antimicina A, en astrocitos primarios control y previamente tratados con S1 durante 48 horas, empleando el analizador Seahorse XFp. (E) Cuantificación de las proteínas presentes en cada réplica mediante Western blot, empleada para normalizar los valores de OCR y ECAR. Se representan los valores individuales, así como la media± SD para una n=6 por grupo. La estadística se ha analizado mediante el T-test (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).



En resumen, nuestros resultados demuestran que las formas solubles de A β son capaces de alterar la función mitocondrial de los astrocitos primarios.

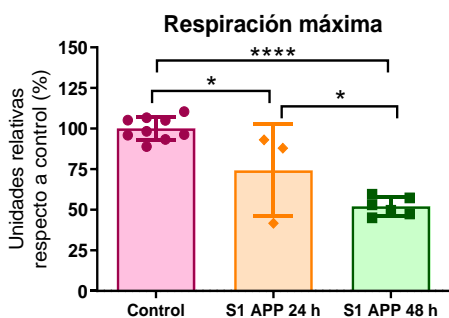


Figura D.24. Disminución dependiente del tiempo de la respiración máxima en astrocitos primarios tratados con S1 de modelos APP de 12 meses. Respiración máxima de los astrocitos tratados con S1 de ratones APP de 12 meses durante 24 y 48 horas, referido a la capacidad máxima respiratoria de sus respectivos controles. Se representan los valores individuales, así como la media \pm SD (control, n=9; S1 APP 24 h, n=3; S1 APP 48 h, n=6). La estadística se ha analizado mediante el test de ANOVA seguido del test de comparación múltiple Tukey (* $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$).

2.3.1.2. Pérdida de neuroprotección de los astrocitos *in vitro* en presencia de patologías A β y Tau

2.3.1.2.1. Los astrocitos proporcionan factores prosupervivencia a las neuronas *in vitro*

Tras observar que el tratamiento con S1 de animales APP es capaz de simular *in vitro* el hipometabolismo mitocondrial que se produce en los astrocitos de modelos animales y de pacientes de EA (Apartado D.2.3.3), nos cuestionamos si esta alteración astrogliar podría afectar a la supervivencia neuronal.

Para responder a esta cuestión, en primer lugar, caracterizamos el efecto de los astrocitos sobre la viabilidad neuronal, tratando un cultivo de neuronas durante 24 horas con medio condicionado por astrocitos control (MC Control, constituido por medio de neuronas sin B27 que es condicionado previamente por astrocitos primarios durante 24 horas, Figura D.25 A). Además, en estos experimentos empleamos como controles medio de neuronas con B27 (+B27) y sin B27 (-B27).

En la figura D.25 observamos que las neuronas expuestas 24 horas a un medio sin B27 degeneran de forma significativa, lo que indica que este suplemento es esencial para la supervivencia neuronal. Sin embargo, las neuronas en presencia del MC Control, a pesar de no tener B27, sobreviven al mismo nivel que tras el tratamiento con medio de neuronas +B27. Estos resultados sugieren que los astrocitos liberan al medio factores capaces de proteger y promover la supervivencia de las neuronas de forma similar a como lo hace el suplemento B27.



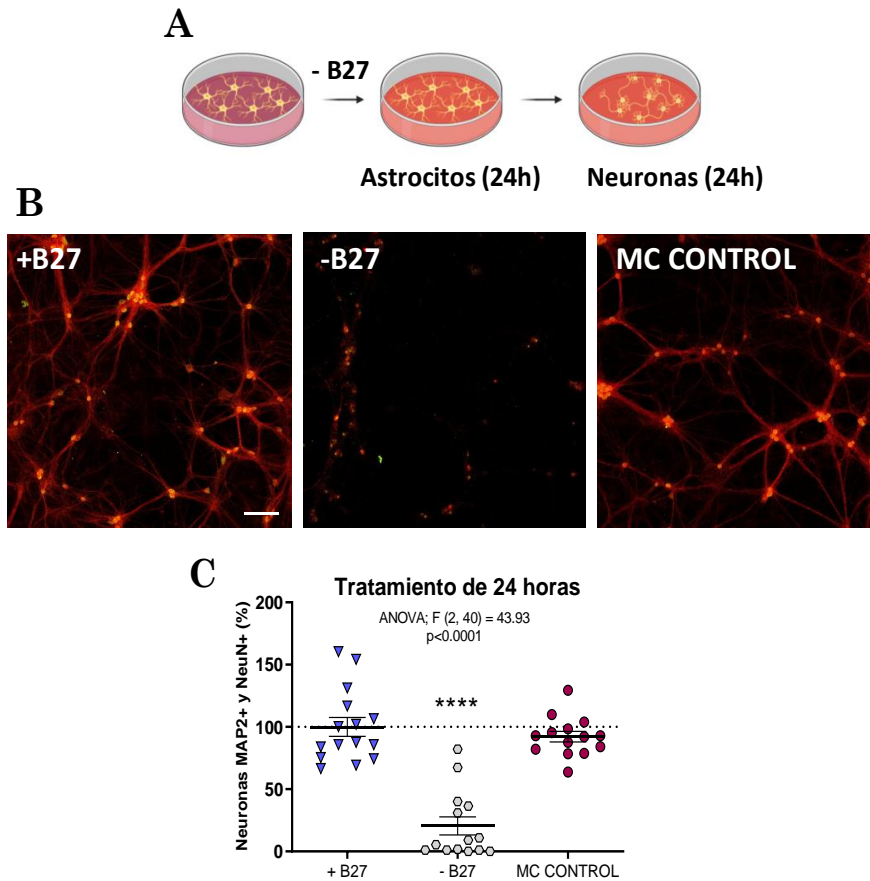


Figura D.25. Efecto del medio condicionado por astrocitos en la supervivencia neuronal. (A) Diseño del experimento. Los astrocitos primarios se tratan con medio de neuronas sin B27 durante 24 horas. Posteriormente, el medio condicionado por estos astrocitos (MC Control) se emplea para tratar a las neuronas durante 24 horas. Imagen creada con BioRender.com. (B) Imágenes representativas de las neuronas primarias, tras las 24 horas de tratamiento, marcadas con los anticuerpos MAP2 (rojo) y NeuN (verde). (C) Cuantificación del número de neuronas MAP2 y NeuN positivas, expresado como porcentaje del número de neuronas tras el tratamiento con distintos medios (+B27, n=15; -B27, n=14; MC Control, n=14). La estadística se ha analizado mediante el test de ANOVA seguido del test de comparación múltiple Tukey (****p<0.0001). Barra de escala: 100 µm.

2.3.1.2.2. Las sustancias neuroprotectoras liberadas por los astrocitos tienen una masa molecular pequeña

Para descifrar la naturaleza de los factores prosupervivencia neuronal liberados por los astrocitos, realizamos una filtración del MC Control que nos permite separar las moléculas del medio con masa inferior a 5.000 Da (MC < 5.000 Da) de las de peso molecular superior (MC > 5.000 Da). Posteriormente, tratamos a las neuronas primarias durante 48 horas con estas dos fracciones. Como se observa en la Figura D.26, las neuronas tratadas con MC < 5.000 Da sobreviven al mismo nivel que las tratadas con medio de neuronas + B27, o con MC Control.



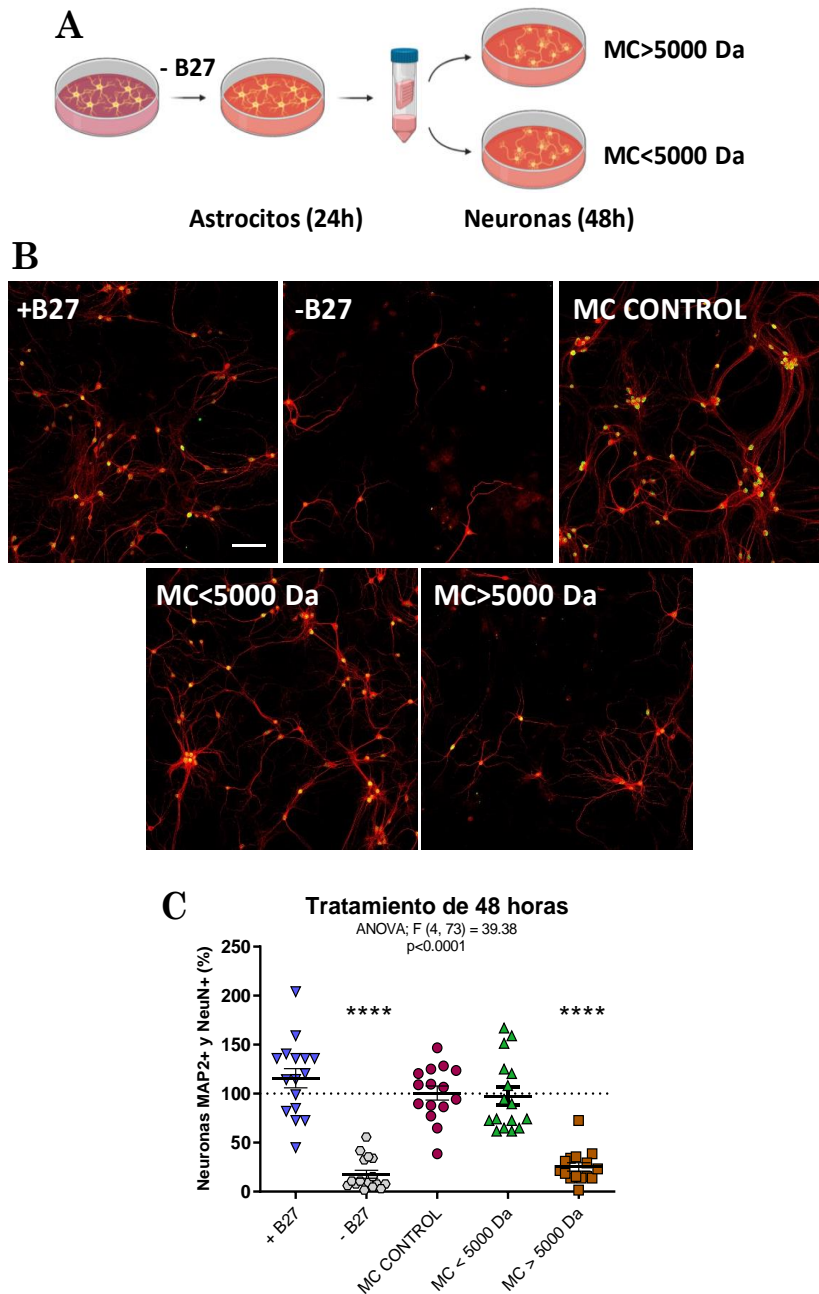


Figura D.26. Efecto de los componentes del medio condicionado por astrocitos, en función de su tamaño molecular, en la supervivencia neuronal. (A) Diseño del experimento. Los astrocitos primarios se tratan con medio de neuronas sin B27 durante 24 horas. El medio condicionado (MC) se filtra a través de un concentrador con un tamaño de poro de 5.000 Da, y los MC < 5.000 Da y MC > 5.000 Da se emplean para tratar a las neuronas durante 48 horas. Imagen creada con BioRender.com. **(B)** Imágenes representativas de las neuronas primarias, tras las 48 horas de tratamiento, marcadas con los anticuerpos MAP2 (rojo) y NeuN (verde). **(C)** Cuantificación del número de neuronas MAP2 y NeuN positivas, expresado como porcentaje del número de neuronas tratadas con MC Control (+B27, n=16; -B27, n=16; MC Control, n=15; MC < 5.000 Da, n=16; MC > 5.000 Da, n=15). La estadística se ha analizado mediante el test de ANOVA seguido del test de comparación múltiple Tukey (****p<0.0001). Barra de escala: 100 µm.



Estos resultados indican que las moléculas neuroprotectoras presentes en el medio condicionado por astrocitos tienen una masa molecular inferior a 5.000 Da, apoyando la hipótesis de que son metabolitos necesarios para la supervivencia neuronal. Sin embargo, las neuronas tratadas con MC > 5.000 Da tienen escasa viabilidad, similar a la que se produce al tratar con medio de neuronas sin B27.

2.3.1.2.3. ¿Disminuyen los astrocitos su capacidad neuroprotectora en presencia de las patologías Aβ y Tau?

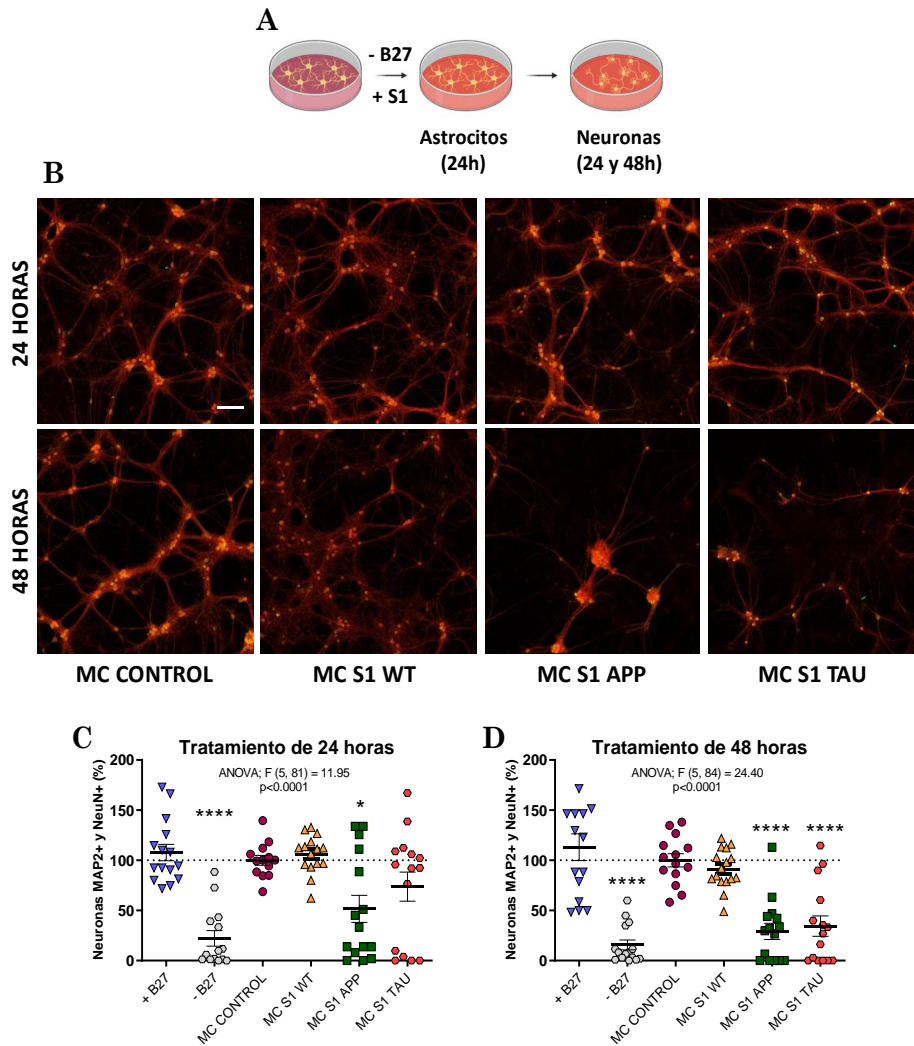


Figura D.27. Efectos sobre la supervivencia neuronal del medio condicionado por astrocitos en presencia de S1 de modelos WT, APP y TAU. (A) Diseño del experimento. Los astrocitos primarios se tratan durante 24 horas con medio de neuronas sin B27 en presencia de S1 de los diferentes modelos animales de 12 meses, y posteriormente el medio condicionado se emplea para tratar a las neuronas durante 24 y 48 horas. Imagen creada con BioRender.com. (B) Imágenes representativas de las neuronas primarias, tras las 24 y 48 horas de tratamiento, marcadas con los anticuerpos MAP2 (rojo) y NeuN (verde). (C) Cuantificación del número de neuronas MAP2 y NeuN positivas, expresado como porcentaje del número de neuronas con MC Control (+B27, n=15/15; -B27, n=14/15; MC Control, n=13/14; MC S1 WT, n=15/16; MC S1 APP, n=15/15; MC S1 TAU, n=15/15; para 24/48 horas, respectivamente). La estadística se ha analizado mediante el test de ANOVA seguido del test de comparación múltiple Tukey (****p<0.0001). Barra de escala: 100 μm.



Tras caracterizar la capacidad neuroprotectora de los astrocitos, nos cuestionamos si las patologías A β y Tau podrían alterar esta función. Para ello, condicionamos el medio de neuronas sin B27 con astrocitos en presencia de S1 de animales WT, APP y TAU de 12 meses durante 24 horas, y posteriormente, tratamos las neuronas con dichos medios durante 24 y 48 horas (Figura D.27 A). Además, empleamos los correspondientes controles +B27, -B27 y MC Control. Las fracciones S1 de ratones APP y TAU presentan, respectivamente, formas solubles oligoméricas de A β (Figura S2, Anexo I) y fosforiladas de Tau (Romero-Molina et al., 2018).

Como se observa en la figura D.27, la viabilidad neuronal tras el tratamiento de 24h con medio condicionado por astrocitos en presencia de S1 de WT (MC S1 WT) es similar a la obtenida con el MC Control, y disminuye con medio condicionado por astrocitos en presencia de S1 de ratones APP y TAU de 12 meses (MC S1 APP y MC S1 TAU), aunque sólo de manera significativa con MC S1 APP. Cuando el tratamiento se prolonga 48 horas, se produce una muerte muy significativa de neuronas en presencia de MC S1 APP y TAU a pesar de que el número de neuronas en presencia de MC Control y MC S1 WT se mantiene. Estos resultados parecen indicar que la presencia de S1 procedente de modelos de EA, tanto APP como TAU, provoca una disminución en la capacidad neuroprotectora de los astrocitos. Sin embargo, debido a la presencia continua de S1 en el medio, la muerte neuronal también podría estar mediada por la toxicidad directa de los S1 sobre las neuronas.

2.3.1.2.4. Los astrocitos recuperan su fenotipo neuroprotector cuando el S1 de modelos APP y TAU se elimina del medio

Para aclarar si la muerte neuronal producida tras el tratamiento de las neuronas con medio condicionado por astrocitos en presencia de S1 de ratones APP y TAU es debida a la pérdida de la capacidad neuroprotectora de los astrocitos, o al efecto directo de las fracciones S1 sobre las neuronas, realizamos el siguiente experimento, que se ilustra en la figura D.28 A: a) tratamos los astrocitos con las correspondientes fracciones S1 durante 48 horas, b) cambiamos el medio, retirando el S1, c) dejamos condicionar por los astrocitos durante 24 horas más, y d) tratamos a las neuronas durante 48 horas con el medio condicionado por astrocitos carente de S1. Realizamos el tratamiento en ausencia y presencia de B27, debido al largo periodo de tratamiento de los astrocitos.

En ambos casos, no existen diferencias significativas entre la viabilidad de las neuronas en MC Control y las tratadas con medios condicionados por astrocitos que previamente habían tenido S1 de modelos APP y TAU (Figura D.28).

Estos datos sugieren que los astrocitos son capaces de recuperar su fenotipo una vez eliminado el estímulo (S1 de APP o de TAU), pero no nos permiten aclarar si la muerte neuronal observada en el apartado anterior se debe a una menor capacidad protectora de los astrocitos o a la toxicidad directa del S1 sobre las neuronas.



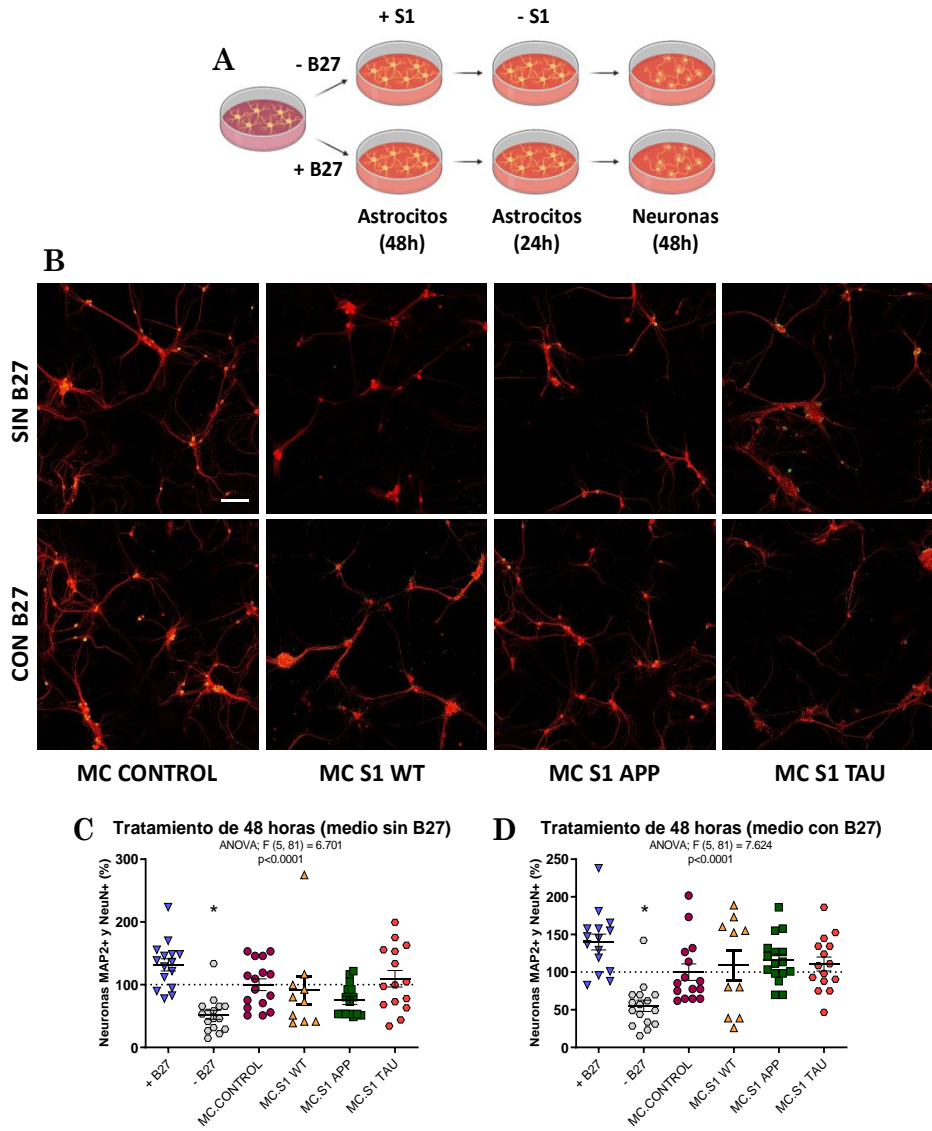


Figura D.28. Efecto del medio condicionado por astrocitos en la supervivencia neuronal en ausencia de S1. (A) Los astrocitos primarios se tratan 48 horas con medio de neuronas (con y sin B27) en presencia de S1 de ratones WT, APP y TAU de 12 meses. El medio con S1 se retira y se añade nuevo medio de neuronas (con y sin B27, respectivamente). Tras 24 horas de condicionamiento, el medio condicionado se emplea para tratar a las neuronas durante 48 horas. Imagen creada con BioRender.com. (B) Imágenes representativas de las neuronas primarias, tras las 48 horas de tratamiento, marcadas con los anticuerpos MAP2 (rojo) y NeuN (verde). (C) Cuantificación del número de neuronas MAP2 y NeuN positivas, expresado como porcentaje del número de neuronas con MC Control (+B27, n=15/15; -B27, n=16/16; MC Control, n=16/15; MC S1 WT, n=10/10; MC S1 APP, n=15/16; MC S1 TAU, n=15/15; para -B27/+B27, respectivamente). La estadística se ha analizado mediante el test de ANOVA seguido del test de comparación múltiple Tukey (*p<0.05). Barra de escala: 100 μ m.



2.3.1.2.5. Los astrocitos disminuyen su capacidad neuroprotectora en presencia de las patologías Aβ y Tau

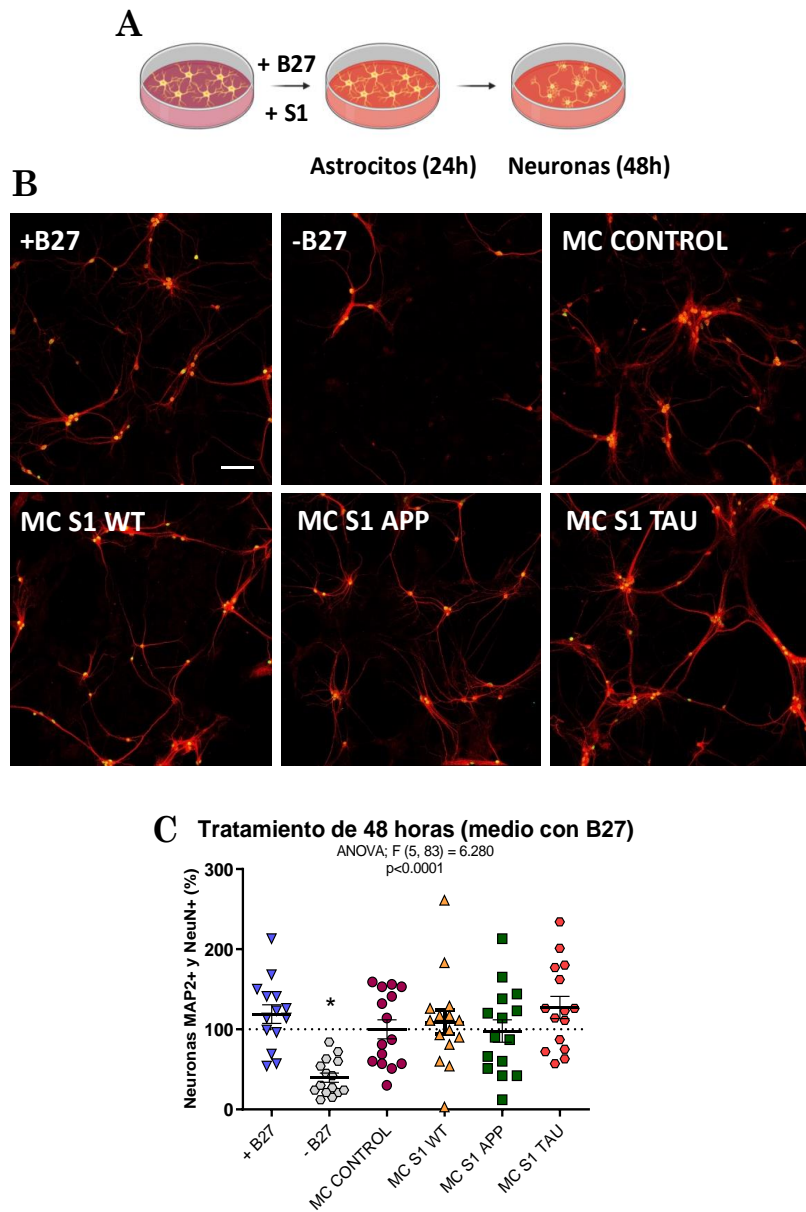


Figura D.29. Efecto del medio condicionado por astrocitos en presencia de B27 y S1 de modelos WT, APP y TAU en la supervivencia neuronal. (A) Diseño del experimento. Los astrocitos primarios se tratan durante 24 horas con medio de neuronas con B27 en presencia de S1 de los diferentes modelos animales de 12 meses. El medio condicionado se emplea para tratar a las neuronas durante 48 horas. Imagen creada con BioRender.com. **(B)** Imágenes representativas de las neuronas primarias, tras las 48 horas de tratamiento, marcadas con los anticuerpos MAP2 (rojo) y NeuN (verde). **(C)** Cuantificación del número de neuronas MAP2 y NeuN positivas, expresado como porcentaje del número de neuronas con MC Control (+B27, n=14; -B27, n=15; MC Control, n=15; MC S1 WT, n=15; MC S1 APP, n=15; MC S1 TAU, n=15). La estadística se ha analizado mediante el test de ANOVA seguido del test de comparación múltiple Tukey (*p<0.05). Barra de escala: 100 µm.



Ya que la retirada del S1 patológico del medio parece producir una recuperación de los astrocitos *in vitro*, realizamos el experimento usando un medio condicionado por astrocitos en presencia de S1 durante 24 horas y con B27 (Figura D.29 A). Este medio se utiliza para tratar a las neuronas durante 48 horas, tiempo en el que habíamos observado una clara disminución de la viabilidad neuronal en ausencia de B27 (Figura D.27).

Como muestra la figura D.29, los MC S1 APP y TAU con B27 no afectan a la supervivencia neuronal, lo que indica, que a pesar de que el S1 permanece en el medio, la presencia de B27 evita la muerte neuronal. Es importante considerar que el tratamiento directo de las neuronas con S1 APP o TAU, incluso en medio con B27, produce una toxicidad muy elevada a las 24 horas (datos no mostrados). Por tanto, podemos concluir que la presencia de S1 procedente de animales APP y TAU evita que los astrocitos liberen factores de pequeña masa molecular con capacidad neuroprotectora.

2.3.2. ¿Disminuye el metabolismo de los astrocitos en modelos de EA?

Para evaluar de forma directa el estado metabólico de los astrocitos en modelos APP, hemos desarrollado un método de aislamiento de estas células gliales (Materiales y métodos, Apartado 9.1). En este procedimiento hemos tratado de minimizar el tiempo transcurrido entre el sacrificio del animal y la obtención de las células, reduciendo así la alteración de los metabolitos. Hemos intentado realizar un estudio metabólico en colaboración con la Dra. Coral Barbas (Universidad San Pablo CEU), aunque no ha sido posible determinar el perfil metabólico de los astrocitos aislados, probablemente consecuencia del uso de FACS, que puede producir alteraciones metabólicas (Llufrio et al., 2018; Binek et al., 2019).

2.3.3. Disminución del metabolismo de los astrocitos en el hipocampo de pacientes de EA

Ya que nuestros resultados de estudios *in vitro* y en modelos animales de EA apuntan hacia una disminución del metabolismo de los astrocitos en presencia de las patologías A β y Tau, decidimos analizar el metabolismo de los astrocitos en muestras de enfermos de Alzheimer. En primer lugar, elegimos los marcadores a estudiar en base a los genes y rutas del metabolismo afectados mayoritariamente en los modelos APP y TAU (Figura D.21). Además, ante la incapacidad técnica de aislar distintas poblaciones celulares a partir de muestras humanas *post mortem*, seleccionamos genes expresados de forma diferencial en astrocitos, utilizando el algoritmo “Tau”, cedido por la Dra. Elena Galea (Universidad Autónoma de Barcelona), así como bases de datos transcriptómicas previamente publicadas (Zhang et al., 2016). El algoritmo “Tau” (Kryuchkova-Mostacci y Robinson-Rechavi, 2017), junto con el método Weighted Correlation Network Analysis (WGCNA), permite identificar grupos o clústeres de genes, asignándole a cada uno de ellos un valor, comprendido entre 0 y 1, que es indicativo de su especificidad hacia un tipo de célula del SNC.



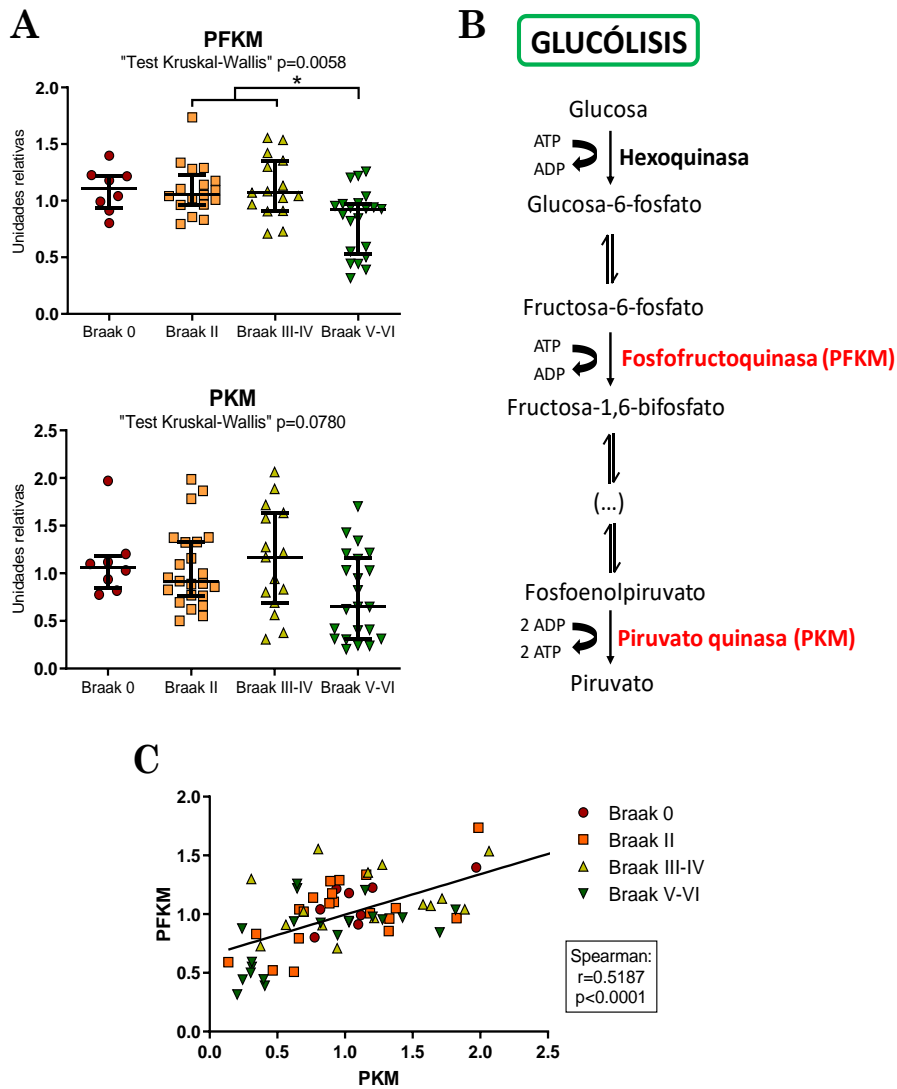


Figura D.30. Expresión de ARNm de las enzimas reguladoras de la glucólisis PFKM y PKM en el hipocampo de pacientes de EA. (A) Expresión relativa de las enzimas PFKM y PKM, analizadas mediante RT-PCR en tiempo real, en el hipocampo de individuos Braak 0 (n=8), II (n=17-23), III-IV (n=15) y V-VI (n=21). Se indican los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn (*p<0.05). **(B)** Representación esquemática de la glucólisis, indicando las principales enzimas implicadas en su regulación, así como las reacciones en las que participan. Las enzimas estudiadas en este proyecto se destacan en rojo. **(C)** Estudio de correlación entre los valores de expresión relativa de las enzimas PFKM y PKM. Se muestra la recta de ajuste o regresión lineal. El estudio de correlación se ha llevado a cabo empleando el método de Spearman.



Considerando que la glucólisis es uno de los principales procesos biológicos afectados en los modelos de EA, estudiamos las dos principales enzimas reguladoras de esta vía, fosfofructoquinasa y piruvato quinasa (Figura D.30 B). En concreto, analizamos la expresión de la isoforma muscular de fosfofructoquinasa-6 (PFKM) y las isoformas M1 y M2 de piruvato quinasa (PKM), siendo M1 la principal en cerebro. En la figura D.30 A se observa una disminución de la expresión de PFKM (significativa) y de PKM (casi significativa) en pacientes Braak V-VI con respecto a estadios Braak II y III-IV. De hecho, la correlación entre los niveles de ARNm de ambas enzimas es buena, indicando que la expresión de ambos genes disminuye de forma paralela en los mismos individuos. Estos datos sugieren que la glucólisis está disminuida en los astrocitos de pacientes de EA, pero no en estadios previos a la demencia.

La fase III del metabolismo es otro proceso biológico que disminuye en los ensayos *in vitro* y en los modelos de EA, por lo que nos centramos en la expresión de la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH). En humanos, esta enzima existe en tres isoformas: IDH1, localizada en el citosol y los peroxisomas, e IDH2 e IDH3, isoformas mitocondriales. IDH3 cataliza la tercera etapa del ciclo de Krebs en las mitocondrias, depende de NAD⁺ y es una de las enzimas reguladoras del ciclo. IDH2 e IDH1 catalizan la misma reacción, pero fuera del contexto del ciclo del ácido cítrico (Figura D.31 A).

En este trabajo, hemos analizado la expresión de la subunidad alfa de IDH3 (IDH3a) como marcador del ciclo de Krebs en astrogliá, así como la de IDH2, enzima mitocondrial expresada preferentemente por astrocitos que no participa en este ciclo. Como observamos en la figura D.31 B, en pacientes de EA se produce una disminución significativa en la expresión de IDH3a con respecto a individuos Braak II. Las muestras Braak III-IV presentan un comportamiento intermedio. Sin embargo, IDH2 no se afecta con la progresión de la patología de Alzheimer. De hecho, no hay correlación entre la expresión de ambas enzimas (Figura D.31 C). Podemos, pues, concluir que el ciclo de Krebs parece disminuir de forma específica en los astrocitos de pacientes de EA.

En los astrocitos de modelos APP y TAU también se produce una disminución significativa en la expresión de varios genes implicados en la biosíntesis y catabolismo de carbohidratos. Ya que los astrocitos almacenan la mayor parte del glucógeno cerebral (Deitmer et al., 2019), decidimos estudiar la glucógeno fosforilasa, enzima limitante de la degradación de glucógeno, y la fosfoglucomutasa, que participa en la glucogenólisis y en la glucogenogénesis (Figura D.32 A). En concreto, cuantificamos la expresión de los genes que codifican la isoforma cerebral de la glucógeno fosforilasa (PYGB) y la fosfoglucomutasa-1 (PGM1). En la figura D.32 B y C se observa que la expresión de estos genes no se modifica con la evolución de la EA, aunque existe buena correlación entre ambos, lo que sugiere que en los astrocitos de pacientes de EA no se altera el metabolismo del glucógeno.



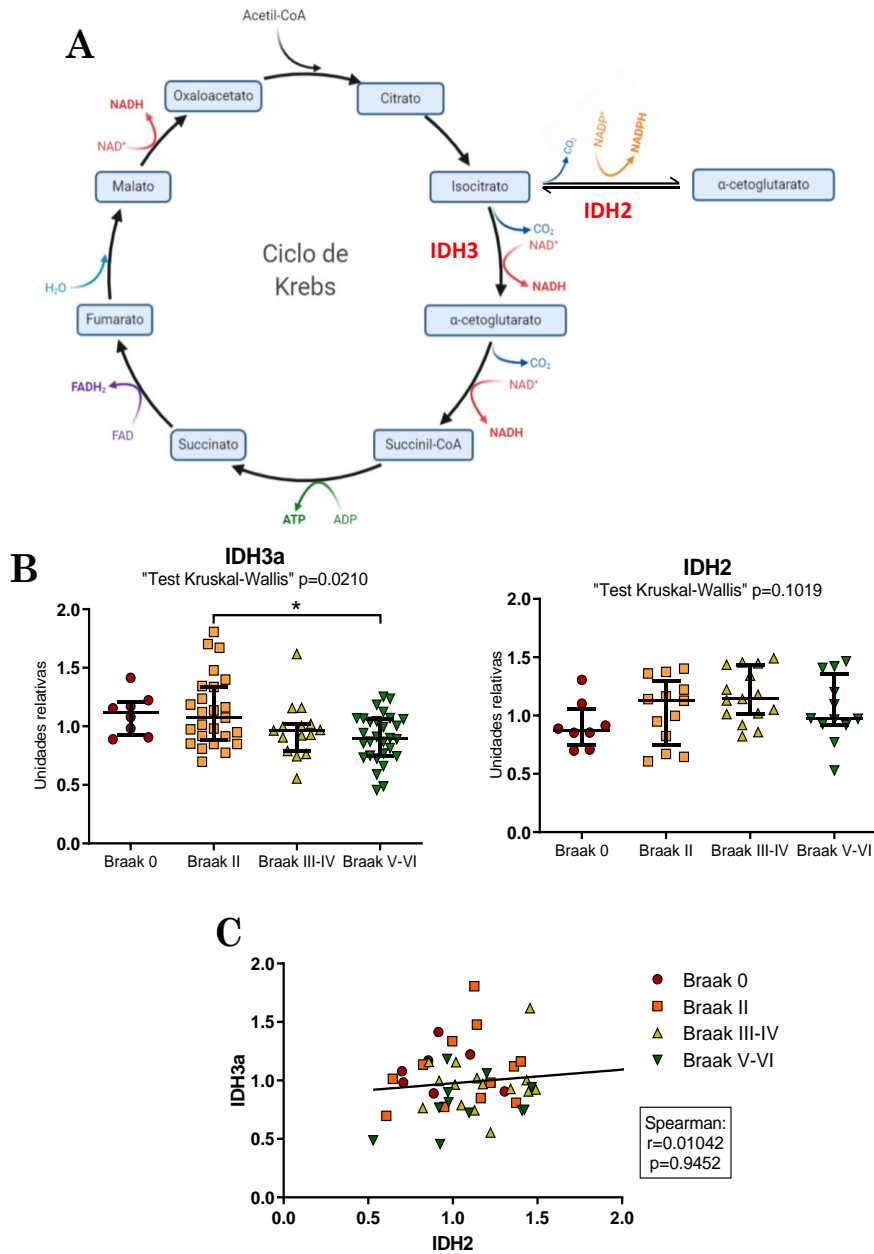


Figura D.31. Expresión relativa de las enzimas IDH3a, que cataliza la tercera etapa del ciclo de Krebs, e IDH2 en el hipocampo de pacientes de EA. (A) Representación esquemática del ciclo de Krebs, donde participa la enzima IDH3, y de la reacción catalizada por IDH2, que no pertenece al ciclo. Las enzimas estudiadas en este proyecto se destacan en rojo. Imagen creada con BioRender.com. **(B)** Expresión relativa de ARNm de IDH3a e IDH2, analizadas mediante RT-PCR en tiempo real, en el hipocampo de individuos Braak 0 (n=8), II (n=13-25), III-IV (n=15) y V-VI (n=12-29). Se indican los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn (*p<0.05). **(C)** Estudio de correlación entre los valores de expresión relativa de las enzimas IDH3a e IDH2 (n=48). Se muestra la recta de ajuste o regresión lineal. El estudio de correlación se ha llevado a cabo empleando el método de Spearman.



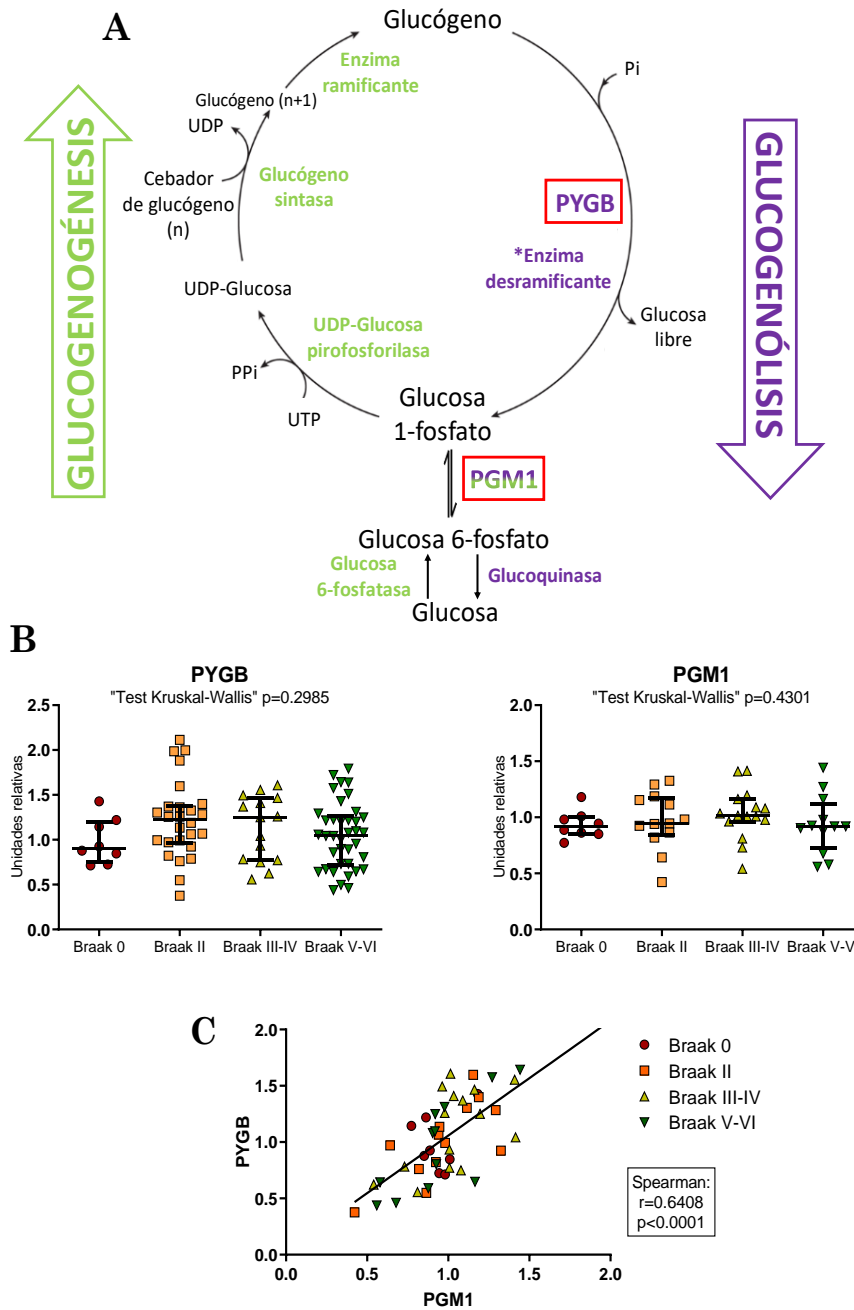


Figura D.32. Expresión relativa de las enzimas implicadas en el metabolismo del glucógeno PYGB y PGM1 en el hipocampo de pacientes de EA. (A) Representación esquemática de los procesos de glucogenólisis y glucogenogénesis. Las enzimas estudiadas en este proyecto se destacan con un cuadro rojo. (B) Expresión relativa de ARNm de PYGB y PGM1, analizadas mediante RT-PCR en tiempo real, en el hipocampo de individuos Braak 0 (n=8), II (n=13-26), III-IV (n=15) y V-VI (n=12-38). Se indican los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn. (C) Estudio de correlación entre los valores de expresión relativa de las enzimas PYGB y PGM1 (n=48). Se muestra la recta de ajuste o regresión lineal. El estudio de correlación se ha realizado empleando el método de Spearman.



Por otra parte, referente al metabolismo de ácidos grasos en los astrocitos, analizamos la expresión del gen que codifica la enzima carnitina palmitoiltransferasa 1 A (CPT1A), que media el transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana mitocondrial externa para su posterior β -oxidación (Figura D.33 B). Como se observa en la figura D.33 A, la expresión de CPT1A no disminuye con la progresión de la EA, sino que aumenta significativamente en pacientes Braak V-VI respecto a individuos Braak 0.

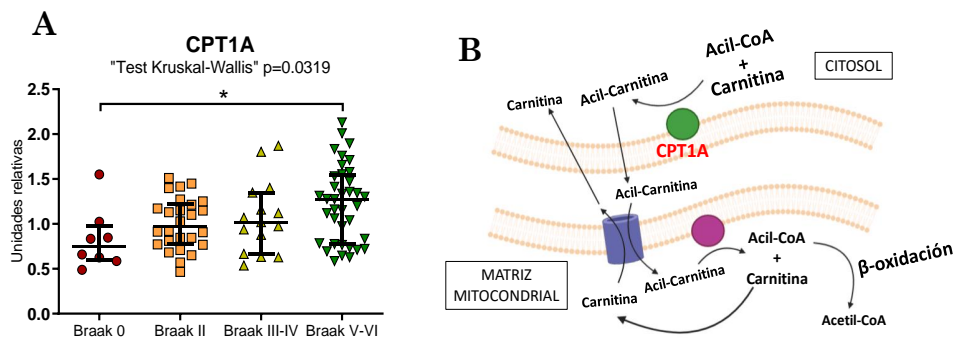


Figura D.33. Expresión relativa de la enzima CPT1A implicada en el transporte de ácidos grasos de cadena larga a la matriz mitocondrial, para una posterior β -oxidación, en el hipocampo de pacientes de EA. (A) Expresión relativa de ARNm de CPT1A, analizada mediante RT-PCR en tiempo real, en el hipocampo de individuos Braak 0 (n=8), II (n=26), III-IV (n=15) y V-VI (n=37). Se indican los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn. **(B)** Representación esquemática del transporte de ácidos grasos al interior de la mitocondria, donde la enzima CPT1A (verde) desempeña un papel clave. Imagen creada con BioRender.com.

Por último, analizamos la expresión del gen que codifica la enzima limitante de la síntesis de colesterol, 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMGCR, Figura D.34 A). Como se muestra en la figura D.34 B, se produce una disminución significativa en la expresión de HMGCR en pacientes Braak V-VI respecto a individuos Braak II, que podría ser indicativa de una disminución en la síntesis de colesterol en los astrocitos de pacientes de EA.

Además, si analizamos la correlación entre las enzimas implicadas en los procesos metabólicos que disminuyen en la EA (glucólisis, ciclo de Krebs y síntesis de colesterol), observamos que la disminución en su expresión se produce de forma paralela en los mismos individuos (Figura D.35).

En resumen, nuestros datos parecen confirmar que en los astrocitos de pacientes de EA se produce una disfunción metabólica, que afecta, al menos, a la glucólisis, ciclo de Krebs y síntesis de colesterol.



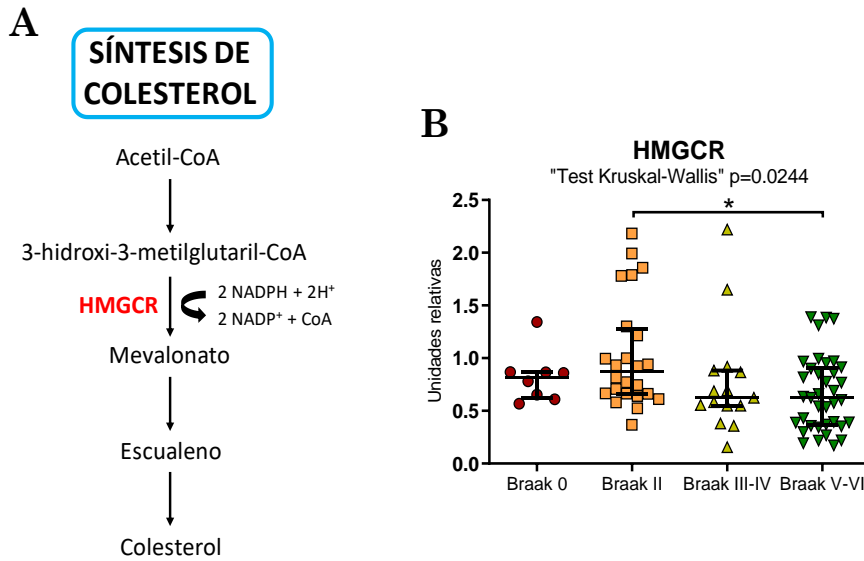


Figura D.34. Expresión relativa de la enzima HMGCR, principal punto de regulación de la síntesis de colesterol, en el hipocampo de pacientes de EA. (A) Representación esquemática de la síntesis de colesterol, indicando la reacción en la que participa la enzima HMGCR. (B) Expresión relativa de ARNm de HMGCR, analizada mediante RT-PCR en tiempo real, en el hipocampo de individuos Braak 0 (n=8), II (n=24), III-IV (n=15) y V-VI (n=37). Se indican los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn (* $p < 0.05$).

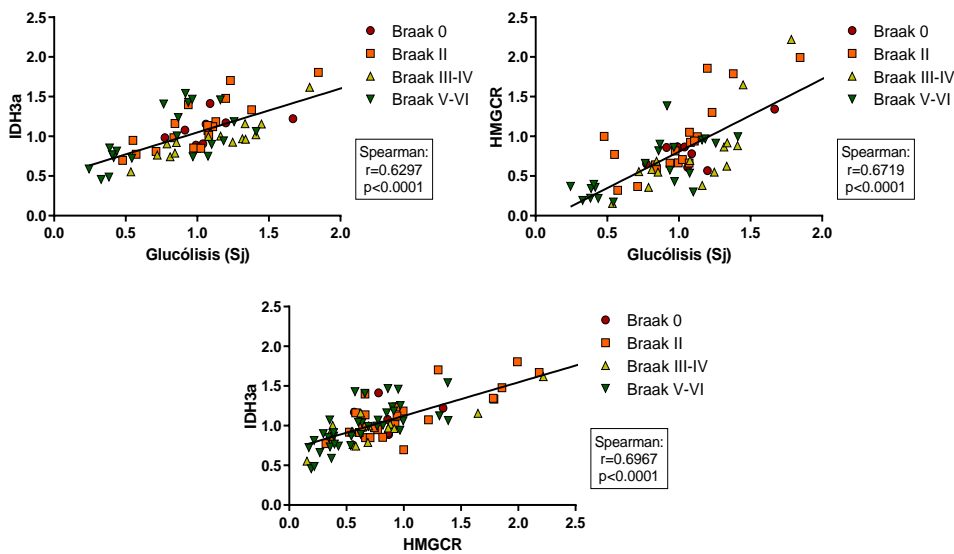


Figura D.35. Análisis de correlación entre enzimas reguladoras de procesos metabólicos afectados en el hipocampo de pacientes de Alzheimer. Estudio de correlación de los valores de *gene set score* (Sj) de los genes glucolíticos PFKM y PKM, la enzima del ciclo de Krebs IDH3a y la enzima reguladora de la síntesis del colesterol HMGCR. Se muestra la recta de ajuste o regresión lineal. El estudio de correlación se ha realizado empleando el método de Spearman.



3. INFILTRACIÓN DE CÉLULAS INMUNES EN EL PARÉNQUIMA CEREBRAL DE PACIENTES DE ALZHEIMER

El SNC de los vertebrados superiores posee una separación inmune de la periferia, con acceso limitado para las células inmunes circulantes, los metabolitos inmunoactivos y las moléculas de señalización (Kierdorf et al., 2019). En condiciones fisiológicas, las principales células que regulan y participan en la respuesta inmune en el parénquima del SNC son la microglía y los astrocitos (Liu et al., 2014; Heneka et al., 2015; Hane et al., 2017a). Sin embargo, en la EA conforme la patología progresa, estas células pierden su función protectora y ganan funciones tóxicas (Navarro et al., 2018; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018; Sánchez-Mejías et al., 2016), estimulando un ambiente proinflamatorio, y la liberación de quimioquinas que podrían facilitar, unido a las posibles alteraciones en la BHE, la entrada de células del sistema inmune periférico. Actualmente existe gran controversia sobre el tema, debido principalmente a la dificultad para diferenciar las células mieloides periféricas de la microglía. Por ello, en el presente trabajo, realizamos distintos abordajes experimentales con el fin de aclarar si se produce o no infiltración de células inmunes periféricas en el parénquima cerebral de modelos animales de la enfermedad y de pacientes de Alzheimer.

3.1. En el parénquima cerebral de ratones transgénicos modelos de EA la infiltración de CDM es muy limitada

En primer lugar, aislamos, y posteriormente caracterizamos y cuantificamos, la microglía, las CDM y los linfocitos en modelos murinos con placas de A β (APP), y con formas fosforiladas de Tau (TAU).

3.1.1. Aislamiento y caracterización de microglía, CDM y linfocitos de la corteza cerebral e hipocampo de distintos modelos murinos de EA

El método empleado se basa en la detección mediante FACS del perfil de expresión de CD11b y CD45 en los distintos tipos celulares (Ford et al., 1995; Chiu et al., 2013; Goldmann et al., 2016; Rosenzweig et al., 2019) (Materiales y Métodos, Apartado 9.2). En primer lugar, seleccionamos mediante citometría de flujo las células individuales, atendiendo a su complejidad y tamaño celular (descartando debris, restos celulares y de mielina). Posteriormente, mediante inmunomarcado fluorescente con CD45 y CD11b, distinguimos las tres poblaciones de interés (Figuras D.36 A y B). Por una parte, la población de linfocitos se caracteriza por ser CD11b⁻/CD45^{high}. Además, se observan dos poblaciones positivas para CD11b y CD45, pero con una diferente expresión de este último. La población CD11b⁺/CD45^{medium} corresponde a las células microgliales, mientras que las CDM son CD11b⁺/CD45^{high}.

Una vez aisladas las tres poblaciones, comprobamos, mediante RT-PCR en tiempo real (Figura D.36 C), que los marcadores microgliales Trem2 y Cx3cr1 se expresan principalmente en la población CD11b⁺/CD45^{medium}, y que las células CD11b⁺/CD45^{high} son, a diferencia de la población microglial, positivas para Ccr2 y



Ly6c, tal y como está descrito para las CDM. La población CD11b-/CD45^{high} expresa, además de Ccr2 y Ly6c, el marcador específico de linfocitos T CD3. Al comparar los niveles de expresión de los marcadores analizados en la figura D.36 C, observamos que la expresión de Trem2 y Cx3cr1 es significativamente mayor que la de los otros marcadores, lo que concuerda con que, las células microgliales son las predominantes en el parénquima cerebral.

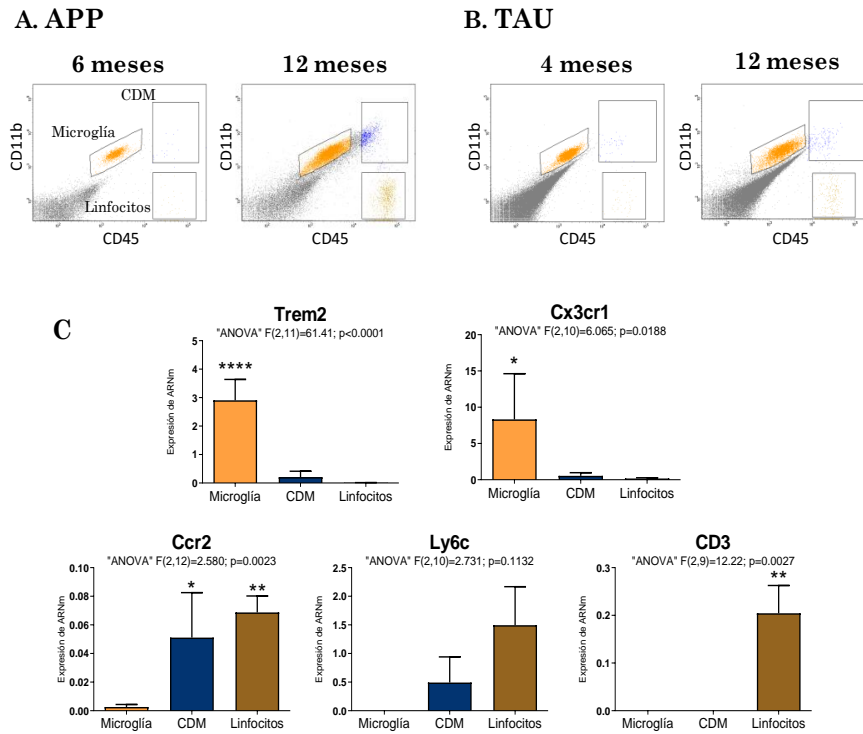


Figura D.36. Aislamiento y caracterización fenotípica de microglía, CDM y linfocitos en corteza cerebral e hipocampo de modelos de EA, jóvenes y adultos. (A-B) Aislamiento mediante FACS, en función de CD11b y CD45, de microglía, CDM y linfocitos de ratones (A) APP de 6 y 18 meses y (B) TAU de 4 y 12 meses (n=3). **(C)** Caracterización mediante RT-PCR de la expresión de los marcadores fenotípicos de las 3 poblaciones aisladas (microglía, CDM y linfocitos) Trem2, Cx3xr1, Ccr2, Ly6c y CD3. La expresión de estos marcadores se ha corregido por la expresión del gen *housekeeper* GAPDH. Los datos se representan como media± SD para una n≥3 por grupo. La estadística se ha analizado mediante el test ANOVA seguido del test de comparación múltiple Tukey (*p<0,05; **p<0,01; ****p<0,0001).

Puesto que en la microglía activa aumenta la expresión de CD45, decidimos utilizar, además de CD11b y CD45, el anticuerpo Ly6c para confirmar y garantizar una adecuada separación de las CDM (Ly6c+) de la población microglial (Ly6c-). Incluimos también en el estudio un control sin patología (WT), que debe tener un porcentaje considerablemente menor de microglía activa. Para evaluar si el nivel de infiltración varía con el área cerebral estudiada, procesamos por separado hipocampo y corteza.

Como se observa en la figura D.37 la población microglial en los modelos APP y TAU comparada con el WT, se desplaza ligeramente hacia una expresión mayor de CD45. Además, el uso del marcador Ly6c nos confirma que la separación realizada



en base a CD11b y CD45 es adecuada, ya que la población CD11b+/CD45^{medium} es Ly6c- (microglía) (eventos en naranja), mientras que la población CD11b+/CD45^{high} es Ly6c+ (CDM) (eventos en azul).

Por tanto, este protocolo, nos permite aislar de manera específica la población de microglía (CD11b+/CD45^{medium}/Ly6c-/Trem2+/Cx3cr1+/Ccr2-/CD3-), CDM (CD11b+/CD45^{high}/Ly6c+/Trem2-/Cx3cr1-/Ccr2+/CD3-) y linfocitos (CD11b-/CD45^{high}/Ly6c+/Trem2-/Cx3cr1-/Ccr2+/CD3+) en corteza e hipocampo de ratones WT, APP y TAU.

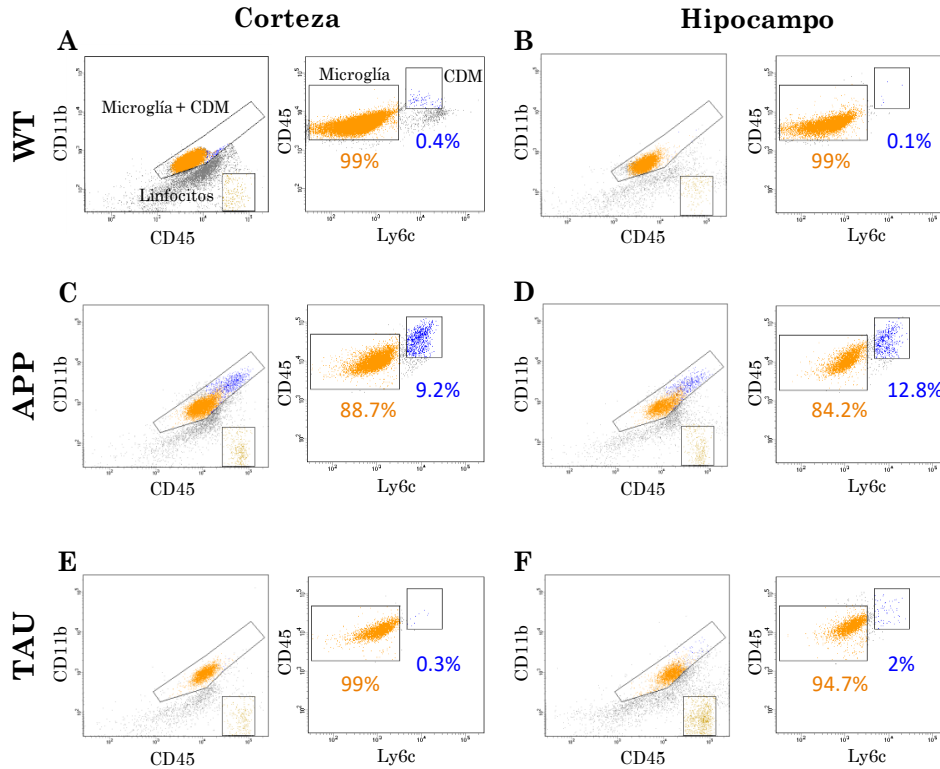


Figura D.37. Aislamiento mediante CD11b, CD45 y Ly6c de microglía, CDM y linfocitos en corteza cerebral e hipocampo de WT y modelos de EA. Selección, mediante FACS, de las tres poblaciones en función de CD11b, CD45 y Ly6c en ratones (A-B) WT, (C-D) APP y (E-F) TAU de 12 meses, en (A, C y E) corteza cerebral e (B, D y F) hipocampo. Se indica el porcentaje de células microgliales (naranja) y CDM (azul) con respecto al total de células positivas para CD11b y CD45 para una n=1.

3.1.2. En los modelos APP y TAU se produce una entrada significativa de linfocitos, pero la infiltración de CDM es limitada

Una vez caracterizadas las tres poblaciones celulares, estudiamos las modificaciones dependientes de la patología Aβ y Tau, en ratones transgénicos APP y TAU, respectivamente. En ambos modelos, se produce un aumento significativo de linfocitos infiltrados en los animales de mayor edad. En los ratones APP de 12 meses un 5,66 ± 1,11 % del total de células corresponde a linfocitos mientras que en animales de 6 meses dicho valor es del 1,33 ± 0,37 %. Por otra parte, existe un 9,65



± 2,79 % de linfocitos en modelos TAU de 12 meses en comparación con un 0,85 ± 0,35 % en sus respectivos controles de 4 meses (Figura D.38 A).

Sin embargo, la infiltración de CDM en los modelos APP corresponde a un 8,44 ± 3,63 % de las células CD11b+ en animales de 12 meses. Aunque esta cifra es significativamente mayor que la producida a los 6 meses (0,93 ± 0,05%), se trata de una infiltración limitada. En el modelo TAU no se produce infiltración de CDM, ni en animales jóvenes (0,55 ± 0,07%), ni en ratones de 12 meses (1,91 ± 0,67%) (Figura D.38 B).

Por tanto, podemos concluir que, con el envejecimiento del animal, se produce infiltración de linfocitos T CD3+ en ambos modelos, APP y TAU. Sin embargo, la infiltración de CDM es limitada en el caso de los ratones APP, y prácticamente nula en el modelo de patología TAU.

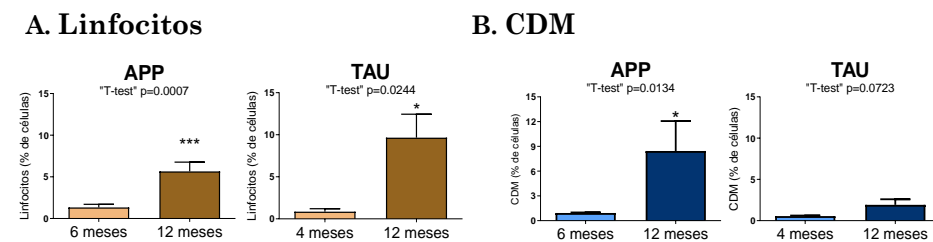


Figura D.38. Cuantificación del porcentaje de células infiltradas en corteza cerebral e hipocampo de modelos de EA, jóvenes y adultos. (A) Porcentaje de linfocitos, respecto al total de células aisladas, presentes en ratones APP de 6 y 12 meses y TAU de 4 y 12 meses. **(B)** Porcentaje de CDM, respecto al total de células CD11b+, aisladas en modelos APP de 6 y 18 meses y TAU de 4 y 12 meses. Los datos se representan como media ± SD para una n ≥ 3 por grupo. La estadística se ha analizado mediante el T-test (*p < 0,05; ***p < 0,001).

3.2. Infiltración de CDM en muestras *post mortem* de hipocampos de pacientes de EA.

3.2.1. Análisis de clúster de genes expresados por células microgliales y/o CDM

Para el estudio en las muestras hipocampales humanas, debido a la imposibilidad de realizar una separación de poblaciones celulares mediante FACS, analizamos por RT-PCR en tiempo real la expresión de múltiples genes típicos de células microgliales y/o CDM. En la figura S3 (Anexo I) se muestra la expresión relativa de cada uno de estos genes en función del estadio Braak. Observamos resultados muy diversos. Algunos genes aumentan de forma muy significativa con la progresión de la patología, mientras que otros permanecen inalterados o incluso disminuyen de forma patente.

Con el fin de estudiar qué genes presentan un comportamiento similar, realizamos un análisis de clúster. En primer lugar, calculamos la matriz de correlaciones, que, como refleja la figura D.39, permite establecer dos grupos de genes principales en los que, de forma general, existe una elevada correlación entre sus integrantes y, a su vez, una correlación baja o nula con los genes contenidos en el otro grupo.



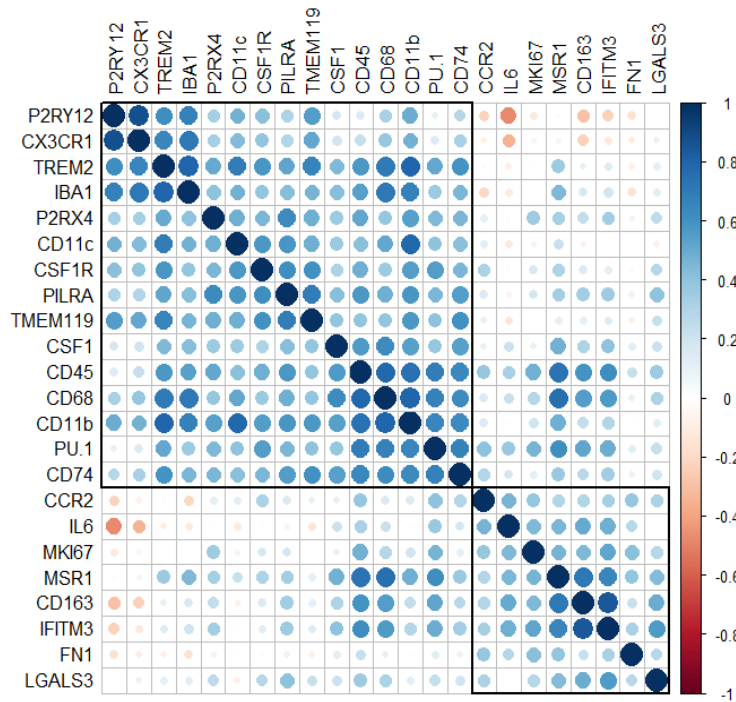


Figura D.39. Matriz de correlaciones de los niveles de expresión de múltiples genes asociados a la microglía y/o CDM en muestras de hipocampo humanos *post mortem*. El estudio de correlación se ha realizado empleando el método de Spearman. Los genes se han ordenado en base a un análisis de clúster jerárquico empleando el método de Ward. Las correlaciones positivas se muestran en azul y las negativas, en rojo. La intensidad del color y el tamaño del círculo son proporcionales al coeficiente de correlación (genes, n= 23; muestras, n= 55).

Aplicando un análisis de clúster o *clustering* a nuestros datos normalizados clasificamos de forma no supervisada los genes analizados en grupos denominados conglomerados o clústeres, de manera que las observaciones pertenecientes a un grupo sean similares entre sí (homogeneidad dentro del grupo) y diferentes del resto (heterogeneidad entre grupos). Empleamos el valor de expresión normalizado o tipificado (*z-score*) para garantizar que todas las variables tengan el mismo peso en el análisis. Empleando el método de *clustering* jerárquico obtenemos 3 conglomerados. La figura D.40 muestra el análisis de componentes principales, agrupando a cada uno de los genes en su respectivo clúster.

En resumen, con esta metodología hemos podido clasificar en 3 grupos los diferentes genes analizados mediante RT-PCR en tiempo real. Como se observa en la figura D.40, en el clúster 2 se incluyen genes típicamente asociados a **microglía homeostática** (P2RY12, CX3CR1). El clúster 3 contiene genes asociados a **microglía activa o DAM** (TREM2, P2RX4, CD45, CD74, CD11b, CD11c, PU.1, PILRA, CSF1, CSF1R), aunque también incluye a TMEM119 e IBA1, clásicamente relacionados con la microglía homeostática. Por otra parte, en el clúster 1 existen genes que se expresan en monocitos o CDM (CD163, IFITM3, CCR2, FN1, LGALS3, MKI67, CD68, IL6, MSR1), y algunos también en microglía. Por eso, en principio designamos a este clúster como genes asociados a **CDM?**, y, posteriormente, trataremos de aclarar a qué tipo celular representa.



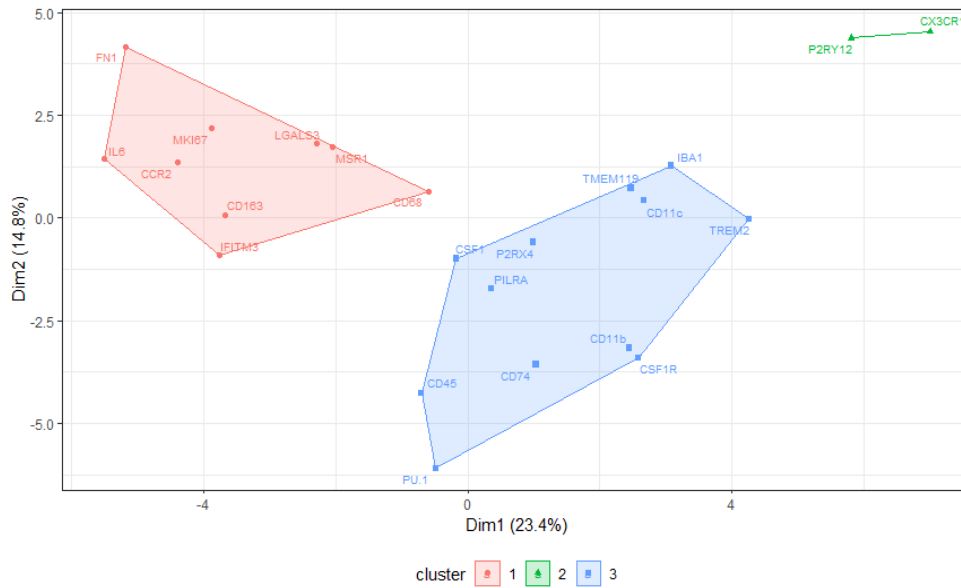


Figura D.40. Análisis de componentes principales y *clustering* de múltiples genes asociados a la microglía y/o CDM en muestras de hipocampo *post mortem*. Los genes se han agrupado mediante análisis de clúster jerárquico empleando la distancia de Manhattan y el método de varianza mínima de Ward (genes, n= 23; muestras, n= 55).

3.2.2. Los marcadores clásicos de microglía activa permanecen prácticamente inalterados en la EA, mientras que la expresión de marcadores asociados a CDM? se incrementa significativamente.

Una vez realizado el análisis de clúster, estudiamos cómo cambian estos genes o grupos de genes con la progresión de la patología de Alzheimer. Para ello realizamos un *heatmap* de los valores tipificados o z-score de la expresión de cada uno los genes analizados ordenados en función del clúster al que han sido asignados (Figura D.41). También se representa el dendrograma de clasificación de los marcadores, la representación más frecuente del análisis de clúster jerárquico representado en la figura D.40. Las muestras se agrupan según el estadio Braak, desde controles o Braak 0 (a la izquierda) hasta pacientes Braak V-VI (a la derecha).

En la imagen del *heatmap* corroboramos que los genes se agrupan en 3 conglomerados, correspondientes a microglía homeostática, microglía DAM y CDM?. También se refleja la gran variabilidad interindividual de las muestras humanas, que impide establecer un patrón de comportamiento de estos genes con la progresión de la EA mediante el estudio individual de cada uno de ellos. Por este motivo, decidimos agrupar los genes en función del clúster al que pertenecen y calcular sus *gene set score* (S_j) (Friedman et al., 2018) (Figura D.41 B-D). Tal y como se esperaba, el S_j de microglía homeostática disminuye de forma significativa en los pacientes Braak V-VI. Sin embargo, la expresión de genes asociados a microglía DAM, permanece prácticamente inalterada con la evolución de la EA; únicamente se observa una ligera tendencia al aumento en muestras Braak V-VI, lo que parece indicar una muy limitada activación microglial. Es importante destacar que para la obtención del S_j de microglía DAM se han excluido los genes TMEM119 e IBA1,



puesto que suelen asociarse a microglía homeostática. En contraposición, los genes asociados a monocitos se incrementan de manera patente y altamente significativa con la progresión de la EA. De hecho, en los individuos Braak III-IV ya se observa un aumento estadísticamente significativo con respecto a los Braak 0.

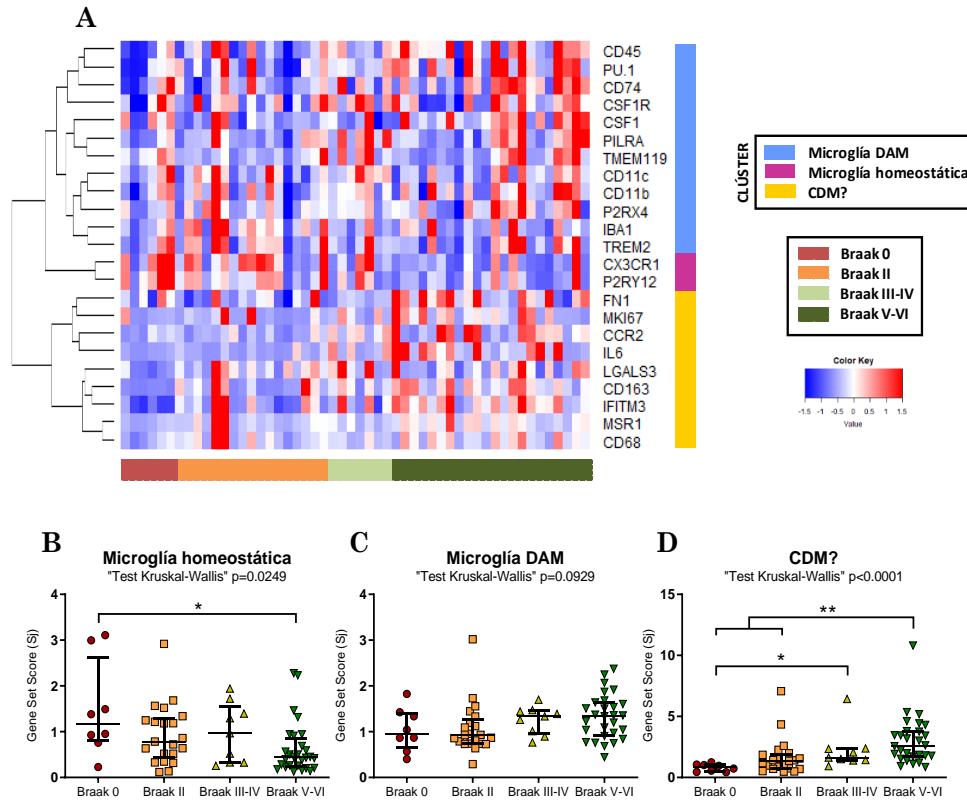


Figura D.41. Expresión relativa de los genes microgliales y de CDM analizados, clasificados mediante análisis de clúster, con la progresión de la patología de Alzheimer en muestras de hipocampo *post mortem*. (A) Representación mediante *heatmap* o mapa de calor de los valores tipificados (*z-score*) de la expresión de los genes analizados mediante RT-PCR en tiempo real para cada clúster. En el margen izquierdo, se muestra el dendrograma obtenido mediante clustering jerárquico (Método de Ward, distancia de Manhattan; genes, n= 23; muestras, n= 55). La barra de color del margen derecho indica el clúster al que pertenece cada uno de los genes (Microglía DAM, Microglía homeostática o CDM?). La barra de color del margen inferior representa el estadio Braak de cada una de las muestras. El esquema de color del *heatmap* está basado en la distribución *z-score*, de -1,5 (azul) a 1,5 (rojo). (B-D) Representación de los valores de *gene set score* de los genes incluidos en el clúster (B) Microglía homeostática, (C) Microglía DAM y (D) CDM?, en el hipocampo de individuos Braak 0 (n=8), II (n=21), III-IV (n=9) y V-VI (n=28). Se representan los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0.001).

Por tanto, podemos concluir que, en el hipocampo de pacientes de Alzheimer, se produce una respuesta temprana y progresiva de los genes asociados a CDM?, paralela a una activación microglial muy limitada o ausente, y a una disminución de microglía homeostática. Estos resultados sugieren que la población CDM? podría tener un papel importante en la patología de Alzheimer.



3.2.3. En pacientes Braak V-VI se produce un aumento significativo en la expresión de las quimioquinas CCL2 y CCL4, así como de su receptor CCR2

De forma paralela a la medida de marcadores de microglía y CDM, decidimos evaluar la expresión de diferentes quimioquinas y receptores de estas. Las quimioquinas, quimiocinas o citoquinas quimiotácticas son proteínas de bajo peso molecular (8 a 14 kDa) conocidas principalmente por su capacidad para activar, atraer y estimular la migración de leucocitos por quimiotaxis. Para que los leucocitos puedan responder a estas quimioquinas deben expresar un receptor complementario (Hughes y Nibbs, 2018).

Por tanto, en base a bibliografía previa (Zhang et al., 2016; Domingues et al., 2017; Martin y Delarasse, 2018; Guedes et al., 2018; Joly-Amado et al., 2020) y al perfil transcriptómico de astrocitos y microglía de modelos WT, APP y TAU, obtenido mediante arrays de hibridación en nuestro laboratorio (Datos no publicados), seleccionamos diferentes quimioquinas (CCL2, CCL3, CCL4 y CCL5) que podrían liberarse por microglía, astrocitos y otras células residentes en el SNC, y participar en el reclutamiento de células del sistema inmune periférico. Una vez seleccionadas, analizamos la expresión de estas quimioquinas mediante RT-PCR en tiempo real en muestras de hipocampo Braak II y Braak V-VI. Como se observa en la figura D.42 A, en pacientes de EA se produce un aumento significativo de CCL2 y CCL4, más patente en el caso de CCL2, mientras que CCL3 y CCL5 permanecen constantes.

Además, seleccionamos algunos receptores de estas quimioquinas (CCR1, CCR2 y CCR5), no expresados en microglia y astrocitos (Datos no publicados, Saederup et al., 2010; Mizutani et al., 2012; Zhang et al., 2016; Joly-Amado et al., 2020), pero sí en células del sistema inmune periférico. Nuestros resultados muestran un importante aumento de CCR2 en Braak V-VI, mientras que CCR1 y CCR5 permanecen inalterados (Figura D.42 B).

Posteriormente, medimos los niveles de expresión de CCL2, CCL4 y CCR2 en los diferentes estadios Braak, aumentando la población estudiada (Figura D.42 C-E). Nuestros resultados corroboran un aumento muy elevado de CCL2 y CCR2 en pacientes de EA. Por su parte, los individuos Braak III-IV, presentan un comportamiento intermedio, con tendencia a una mayor expresión de estos genes. CCL4 únicamente aumenta en Braak V-VI.

En resumen, microglía, astrocitos y otras células residentes en el hipocampo de pacientes de Alzheimer podrían estar liberando quimioquinas, como CCL2 y CCL4, con el fin de generar una respuesta por células CCR2+, como CDM y linfocitos.



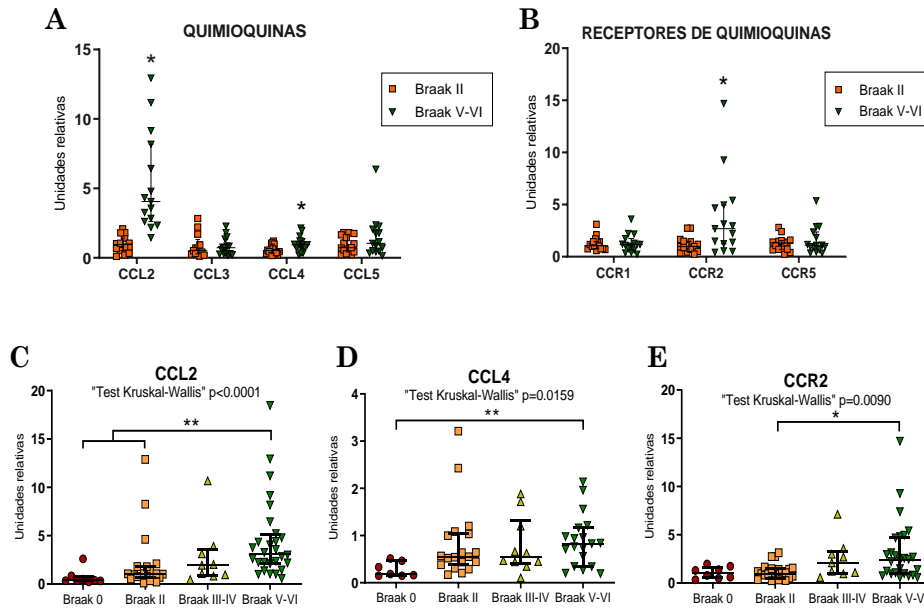


Figura D.42. Expresión de ARNm de diferentes citoquinas quimiotácticas y de receptores de dichas quimioquinas en muestras hipocámpicas humanas. (A-B) Expresión relativa (A) de las citoquinas CCL2, CCL3, CCL4 y CCL5 y (B) de los receptores de quimioquinas CCR1, CCR2 y CCR5 en el hipocampo de individuos Braak II (n=15) y Braak V-VI (n=15). Se representan los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba U de Mann-Whitney ($*p < 0,05$). (C-E) Expresión relativa de (C) CCL2, (D) CCL4 y (E) CCR2 en el hipocampo de individuos Braak 0 (n=8), II (n=21), III-IV (n=9) y V-VI (n=28). Se representan los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$).

3.2.4. El clúster CDM? no se expresa en células microgliales

En los apartados anteriores, hemos descrito evidencias de una posible infiltración de CDM en el hipocampo de pacientes de EA. Sin embargo, los genes incluidos en el clúster de CDM? podrían ser expresados por microglía. Por ello, en base a estudios previos en otras patologías con infiltración de CDM, como gliomas o esclerosis múltiple (Zhang et al., 2011b; Venteicher et al., 2017; Müller et al., 2017a; DePaula-Silva et al., 2019; Haage et al., 2020), analizamos un mayor número de genes expresados de forma preferente en CDM respecto a microglía. Para ello utilizamos Taqman® Array Cards, que, en un mismo experimento y de forma sencilla y rápida, permiten cuantificar la expresión de múltiples genes en distintas muestras, minimizando la manipulación y el posible error asociado.



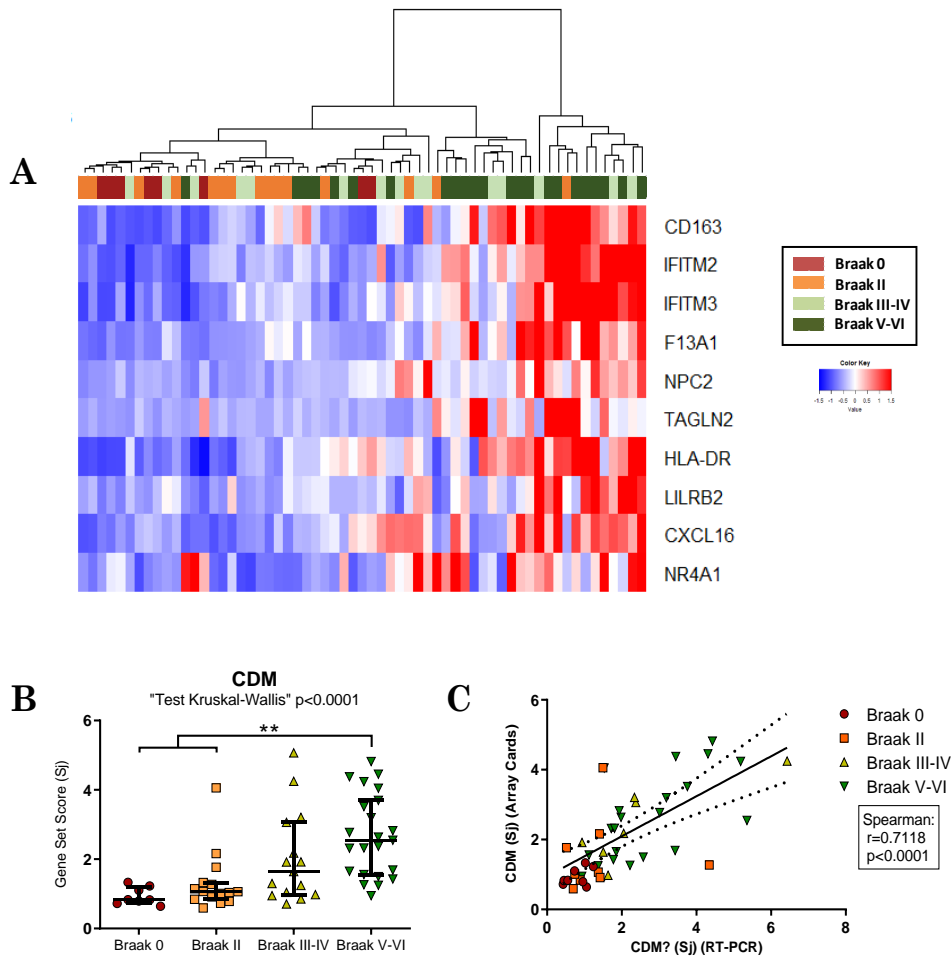


Figura D.43. Expresión de ARNm de genes de CDM en muestras *post mortem* de hipocampo mediante Taqman® Array Cards. (A) Representación mediante *heatmap* o mapa de calor de los valores tipificados (*z-score*) de la expresión de genes asociados a CDM en el hipocampo de individuos Braak 0 (n=8), II (n=15), III-IV (n=15) y V-VI (n=23). Las muestras han sido ordenadas en base a un análisis de clúster jerárquico (Método de Ward, distancia de Manhattan). En el margen superior, se muestra el dendograma obtenido y una barra de color que indica el estadio Braak de cada una de las muestras. El esquema de color del *heatmap* está basado en la distribución *z-score*, de -1,5 (azul) a 1,5 (rojo). **(B)** Representación de los valores de *gene set score* (S_j) de los genes asociados a CDM, incluidos en el *heatmap* de la figura A. Se representan los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn (** $p < 0,01$). **(C)** Análisis de correlación entre los valores de *gene set score* (S_j) de CDM analizados mediante Taqman® Array Cards y los valores de S_j del clúster de genes CDM? medido por RT-PCR en tiempo real (Figura D.41 D), con recta de ajuste o regresión lineal ($\pm SD$). El estudio de correlación se ha llevado a cabo empleando el método de Spearman.

Tras medir la expresión de los genes seleccionados en cada una de las muestras, observamos que todos ellos aumentan de forma clara principalmente en pacientes Braak V-VI (Figura D.43 A). En la figura D.43 B, representamos el *gene set score* calculado para la expresión de estos genes asociados a CDM (CD163,



IFITM2, IFITM3, F13A1, NPC2, TAGLN2, HLA-DR -que incluye la expresión de HLA-DRB1, HLA-DRB4 y HLA-DRB5-, LILRB2, CXCL16 y NR4A1). Nuestros resultados muestran un aumento patente de este *gene set score* con la progresión de la patología, observándose una tendencia a aumentar en Braak III-IV, y un claro y significativo aumento en pacientes Braak V-VI. Además, tal y como se muestra en la figura D.43 C, el *gene set score* de los genes asociados a CDM (Figura D.43 B) presenta muy buena correlación ($r=0.7118$) con el de los genes incluidos en el clúster de CDM? (Figura D.41 D), lo que podría indicar que ambos grupos de genes se expresan en la misma población celular. Por tanto, el claro aumento en la expresión de genes asociados a CDM en el hipocampo de pacientes de EA, así como la buena correlación de estos con el clúster CDM?, apoyan la hipótesis de que este clúster corresponde a CDM, y no a microglía.

Para confirmar esta hipótesis, realizamos, en colaboración con el grupo de la Dra. Antonia Gutiérrez, estudios inmunohistoquímicos empleando como marcador CD163, uno de los genes asociados a CDM que aumenta de forma muy significativa en pacientes de EA. En la figura D.44 A observamos que en individuos Braak 0 las células CD163+ se restringen a los vasos sanguíneos. En Braak II, aunque podemos encontrar escasas células CD163+ en el parénquima (Figura D.44 B2 y B4), la gran mayoría se restringen también a los vasos (Figura D.44 B1 y B3). Sin embargo, en pacientes Braak V-VI hay numerosas células CD163+ en el interior del parénquima hipocampal (Figura D.45 A). Estas células son ramificadas y suelen encontrarse en áreas próximas a vasos sanguíneos. Muchas de estas células, pero no todas, se encuentran asociadas a placas de A β , aunque también existen numerosas placas sin células CD163+. Además, como ocurre en controles y en estadio II de Braak, existen células CD163+ alineadas, probablemente marcando a macrófagos asociados al SNC que se localizan en el espacio perivascular de los vasos sanguíneos.

En la figura D.45 se muestra la heterogeneidad en la distribución espacial de las células CD163+ en comparación con la microglía. Mientras que la microglía IBA1+ se distribuye de forma homogénea por el parénquima hipocampal (Figura D.45 B), en una sección consecutiva del mismo individuo se observa que las células CD163+ se localizan de manera heterogénea, existiendo regiones con un mayor número de células y otras en las que prácticamente no existe marcaje.

La figura D.46 muestra la cuantificación de la carga de CD163 en el hipocampo de pacientes Braak V-VI con respecto a individuos Braak II. En concordancia con lo observado a nivel de ARNm (Figura S3, Anexo I), en el hipocampo de enfermos de Alzheimer se produce un patente aumento de CD163, acompañado de un incremento significativo en la carga de A β extracelular. Sin embargo, la carga de IBA1 no se modifica de forma paralela. En conjunto, estos resultados indican que, con el avance de la patología de Alzheimer se produce en el parénquima hipocampal un importante aumento de células CD163+ correspondientes a CDM, sin que varíe el número total de células microgliales. Además, describimos a CD163 como un marcador diferencial de la población de CDM estudiada.



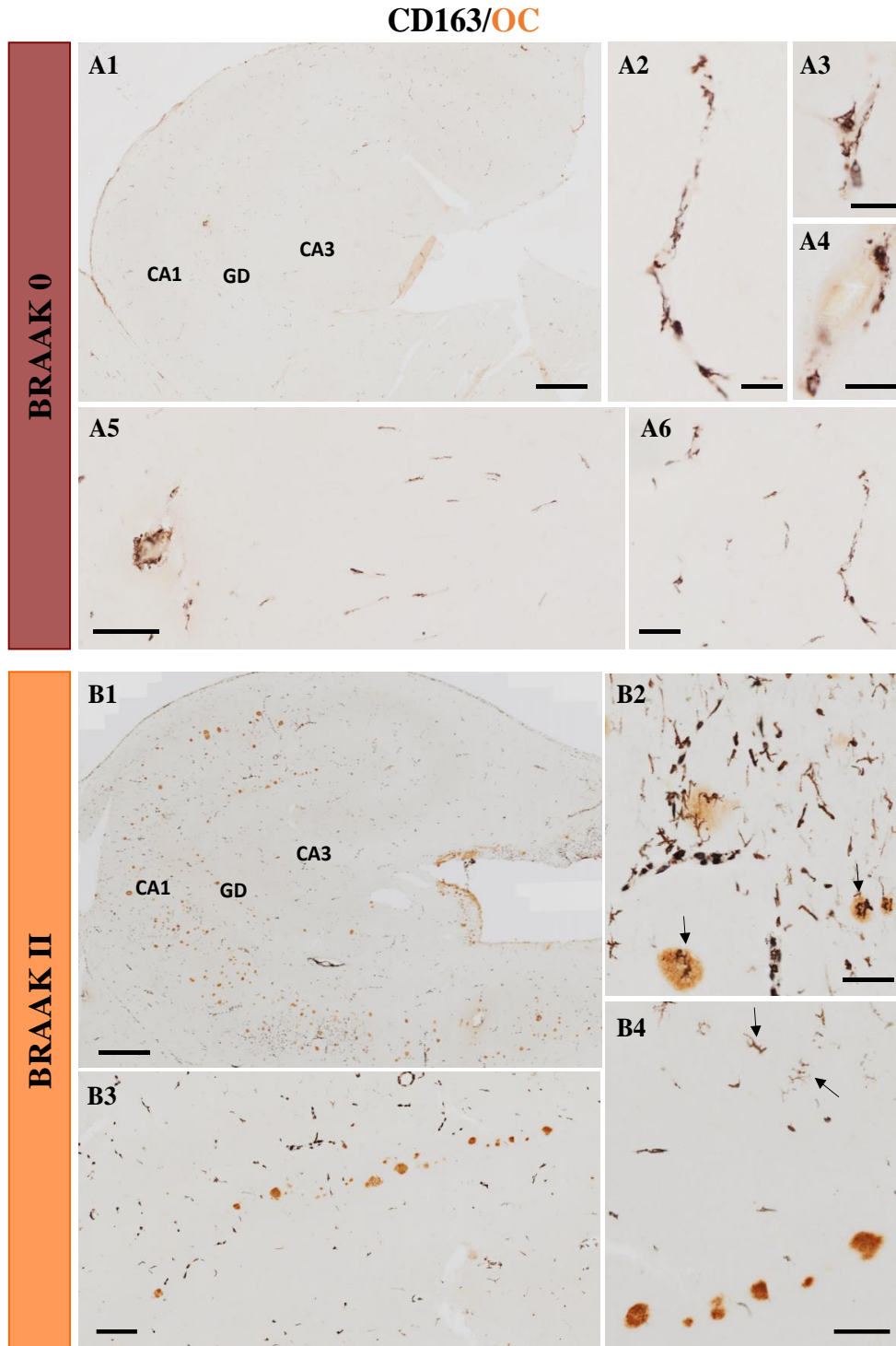


Figura D.44. Inmunohistoquímica con los anticuerpos CD163 y OC en muestras *post mortem* de hipocampo de individuos sin patología de Alzheimer. Inmunomarcaje para CD163 y OC, que detecta formas fibrilares de $A\beta$, en el hipocampo de individuos (A) Braak 0 y (B) Braak II. Imágenes cedidas por el grupo de la Dra. Antonia Gutiérrez. Barra de escala: (A1, B1) 1 mm, (A2-4) 50 μ m, (A5, B3) 200 μ m, (A6, B2, B4) 100 μ m.



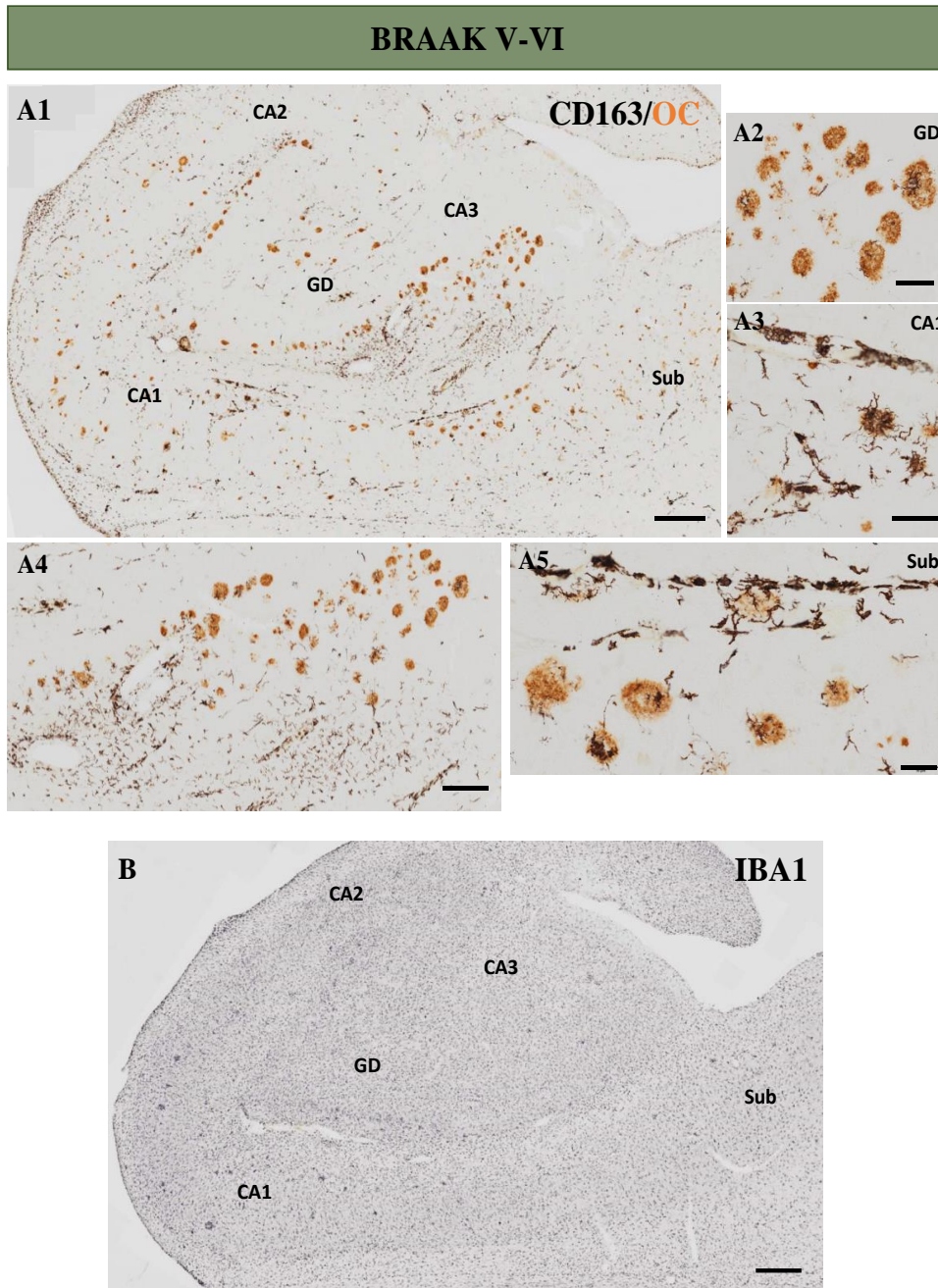


Figura D.45. Inmunohistoquímica para CD163, OC e IBA1 en muestras *post mortem* de hipocampo de pacientes de Alzheimer. (A) Inmunomarcaje para CD163 y OC, que detecta formas fibrilares de A β , en el hipocampo de pacientes Braak V-VI. (B) Inmunohistoquímica con el anticuerpo IBA1, marcador de población microglial, en una sección consecutiva de la misma muestra empleada en la figura A. Imágenes cedidas por el grupo de la Dra. Antonia Gutiérrez. Barra de escala: (A1, B) 500 μ m, (A2-3) 100 μ m, (A4) 200 μ m, (A5) 250 μ m.



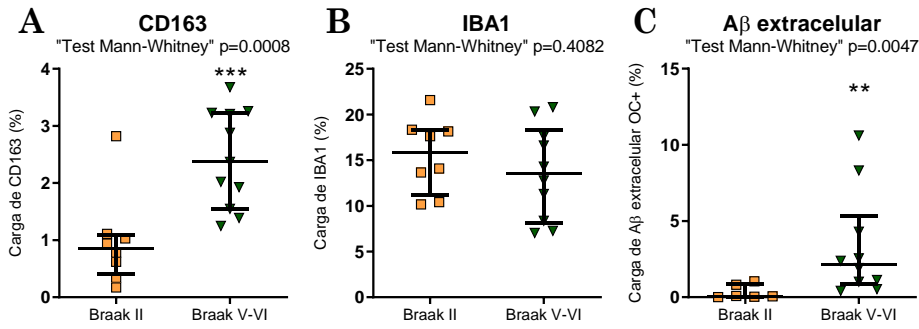


Figura D.46. Cuantificación de la carga de CD163, IBA1 y Aβ extracelular mediante inmunohistoquímica en muestras *post mortem* de hipocampo de individuos Braak II y Braak V-VI. Se indican los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Mann-Whitney (**p<0,01, ***p<0,001). Cuantificación cedida por el grupo de la Dra. Antonia Gutiérrez.

3.2.5. En la EA los macrófagos asociados al SNC no parecen infiltrarse en el parénquima cerebral

Como se ha indicado en la introducción, el SNC alberga una población heterogénea de células mieloides residentes, que incluyen, además de a la microglía del parénquima, a los macrófagos asociados al SNC, entre los que se encuentran los macrófagos perivasculares (Jordão et al., 2019). Dichos macrófagos residentes podrían expresar la mayoría de los genes asociados a CDM.

En la figura D.47 A, se esquematizan las diferentes células mieloides que podrían expresar, al menos en parte, genes asociados a CDM en el SNC: microglía, macrófagos asociados al SNC, monocitos y CDM. A pesar de que todas ellas comparten gran parte de los marcadores fenotípicos, es posible identificar algunas por su posición anatómica y/o morfología. Los macrófagos perivasculares son células alargadas localizadas en el espacio perivascular o de Virchow-Robin (Zeisel et al., 2015; Goldmann et al., 2016) con una morfología relativamente simple, en comparación con la microglía altamente ramificada del parénquima. Además, debido a la contaminación sanguínea de las muestras, estos genes podrían corresponder a monocitos localizados en el interior de los vasos sanguíneos o a CDM infiltradas en el parénquima cerebral.

Para tratar de dilucidar qué tipo celular expresa los genes asociados a CDM en el hipocampo de pacientes de EA, en primer lugar, medimos mediante RT-PCR en tiempo real la expresión de MRC1 (Figura D.47 B), marcador de elección, junto a CD163, para diferenciar macrófagos asociados al SNC de microglía. Nuestros resultados muestran que, a diferencia de lo observado en los genes asociados a CDM, MRC1 no aumenta con la progresión de la patología, manteniéndose inalterado en los diferentes estadios Braak. Además, en colaboración con el grupo de la Dra. Antonia Gutiérrez, realizamos una inmunohistoquímica con MRC1 en muestras *post mortem* de hipocampo de pacientes de EA, observando que las células MRC1+ se localizan exclusivamente en el interior del espacio perivascular, pero no en el parénquima cerebral (Figura D.47 C).



Además, realizamos una inmunofluorescencia doble para CD163 y MRC1 en individuos Braak II y Braak V-VI (Figuras D.47 D y E), comprobando que los macrófagos perivasculares de los vasos sanguíneos co-expresan ambos marcadores, mientras que las células CD163+ del interior del parénquima no se marcan con MRC1.

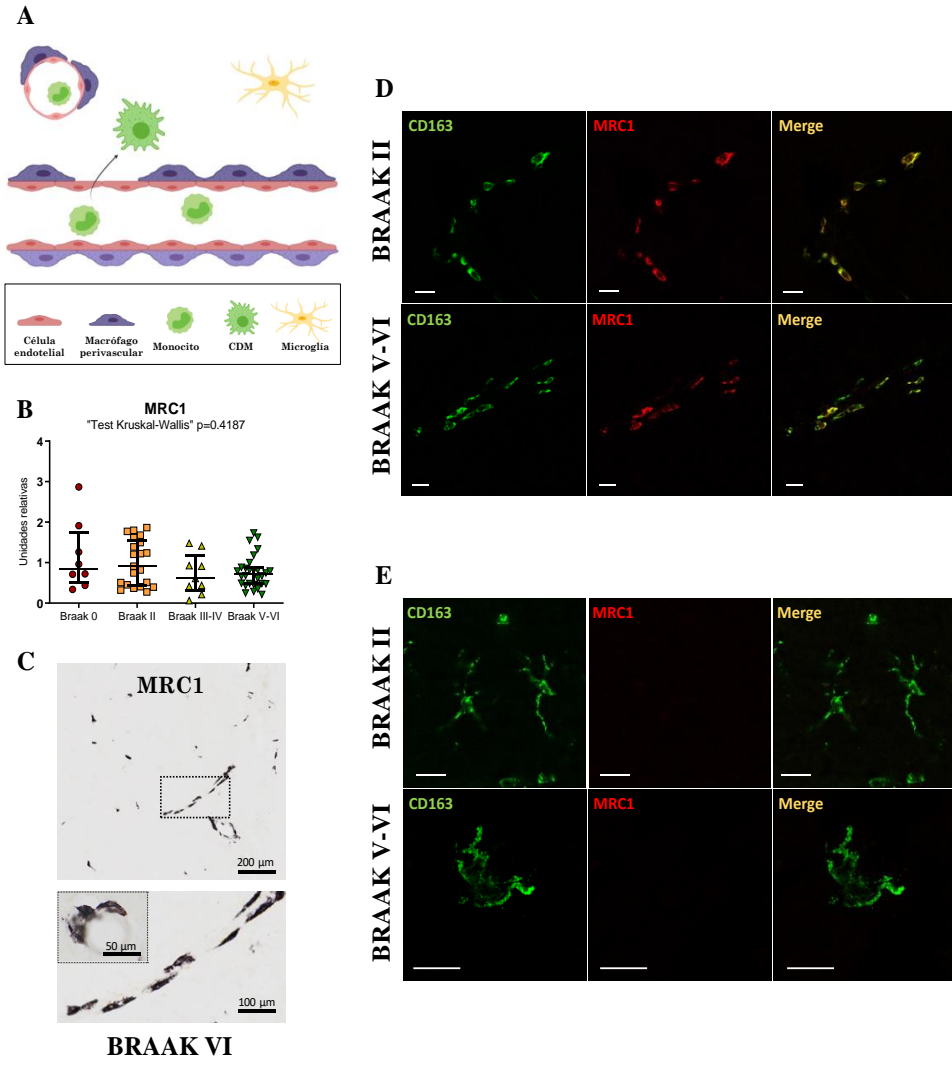


Figura D.47. Estudio del perfil de expresión de MRC1 y de su distribución en el hipocampo de individuos Braak II y Braak VI. (A) Representación esquemática de diferentes células mieloides que podrían expresar, al menos en parte, los genes asociados a CDM en el SNC. Imagen creada con BioRender.com. **(B)** Expresión relativa de MRC1 en el hipocampo de individuos Braak 0 (n=8), II (n=21), III-IV (n=9) y V-VI (n=28). Se representan los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn. **(C)** Inmunomarcaje para MRC1 en el hipocampo de pacientes Braak V-VI. Imágenes cedidas por el grupo de la Dra. Antonia Gutiérrez. **(D-E)** Inmunofluorescencia doble para CD163 y MRC1 en muestras *post mortem* de hipocampo de individuos (D) Braak II y (E) Braak V-VI. Imágenes cedidas por el grupo de la Dra. Antonia Gutiérrez. Barra de escala: 20 μ m.



Por tanto, los macrófagos asociados al SNC permanecen en el espacio perivascular y no parecen alterarse con la patología de Alzheimer, a diferencia de las células CD163+. Por tanto, la infiltración de células CD163+ observada en el apartado anterior sería debida exclusivamente a CDM.

3.3. ¿Existe relación entre la infiltración de CDM y otros aspectos de la patología de Alzheimer?

Tras demostrar que existe infiltración de CDM en el hipocampo de pacientes de Alzheimer, analizamos mediante un análisis de clúster jerárquico su relación con el estadio de Braak, el género, el genotipo APOE, y otros aspectos importantes en la patología. Para ello, clasificamos de forma no supervisada los individuos en tres grupos o clústeres en función del nivel de expresión del *gene set score* de CDM (Figura D.48 A), de forma que, es bajo para el clúster 1, intermedio para el clúster 2 y elevado para el clúster 3 (Figura D.48 B).

En la figura D.48 C observamos que existe asociación significativa (prueba de chi-cuadrado; Braak V-VI respecto a Braak II; $p=0,0066$) entre el estadio Braak y el nivel de infiltración. De hecho, el 100% de las muestras Braak 0 se incluyen en el clúster 1, mientras que el clúster 3 está formado, casi exclusivamente (81,25 %), por pacientes de Alzheimer. Por su parte, el 77,77% de los individuos Braak III-IV se localiza en el clúster 2 y las muestras Braak II se distribuyen principalmente entre los clústeres 1 y 2. Sin embargo, no observamos asociación en función del género y el genotipo APOE (Figura D.48 D y E).

Tampoco existe relación entre el nivel de infiltración de CDM y la edad de inicio de la patología, la edad de muerte y los años de supervivencia tras el diagnóstico (Figura D.49).

También estudiamos la relación de las patologías A β y Tau (Figura D.50) con la infiltración de CDM. En la figura D.51 observamos que los niveles de A β monomérico aumentan con la infiltración de CDM (clústeres 2 y 3). También se produce un aumento significativo de la carga de Tau agregado (TAU46) en el clúster 3, y una tendencia al aumento de las formas fosforiladas de Tau reconocidas por AT8 en los clústeres 2 y 3. Sin embargo, no existen diferencias entre las formas fosforiladas de Tau detectadas por AT100 en función del grado de infiltración. Aunque estos datos sugieren una relación de la infiltración de CDM con la acumulación de A β y Tau, cabe destacar que no correlacionan de forma significativa (Figura D.59).

Empleado los genes asociados a los subtipos de microglía mediante el análisis de clúster (Figura D.41 B y C), observamos que el *gene set score* de microglía homeostática disminuye significativamente en el grupo con mayor grado de infiltración, mientras que el de microglía DAM aumenta significativamente en los individuos del clúster 2 y 3 (Figura D.52).



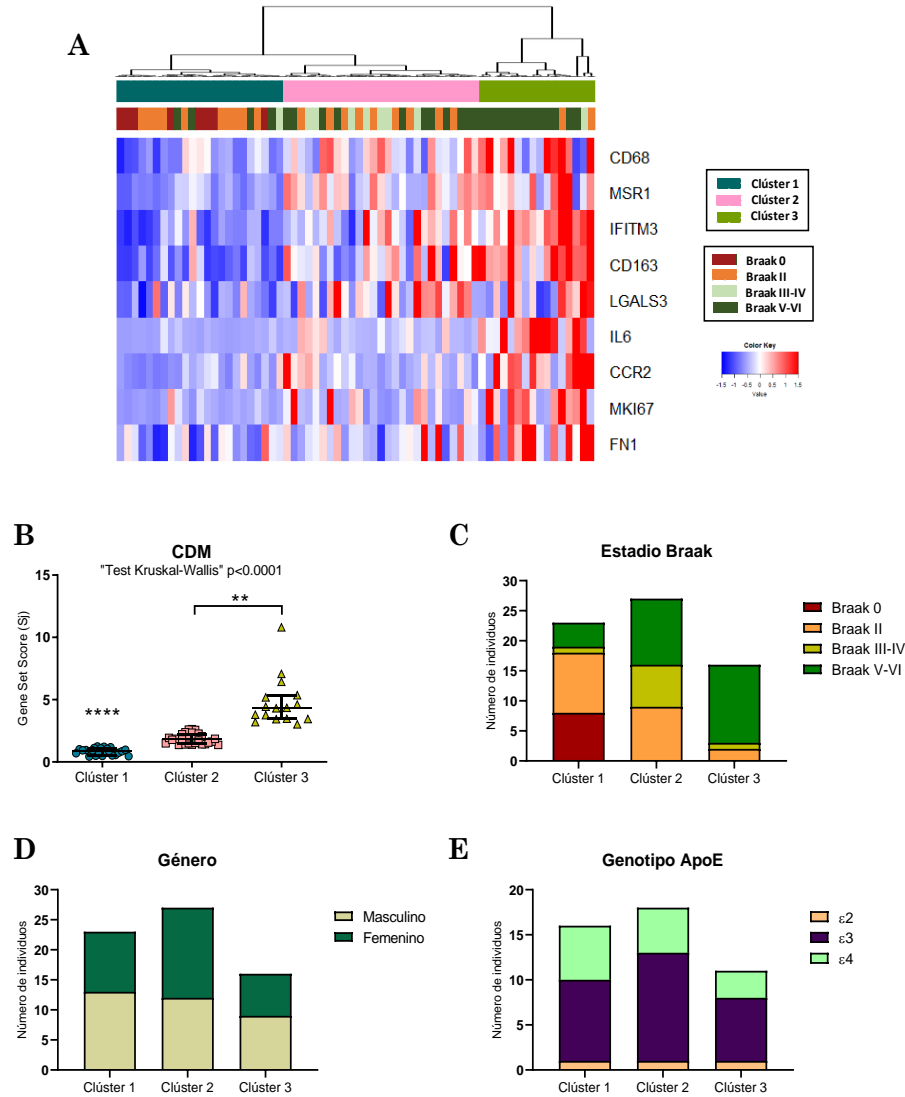


Figura D.48. Clasificación mediante análisis de clúster de los individuos en función de la expresión del *gene set score* de CDM. (A) Representación mediante *heatmap* o mapa de calor de los valores tipificados (*z-score*) de la expresión de los genes de CDM analizados mediante RT-PCR en tiempo real. Se muestra el dendrograma obtenido mediante clustering jerárquico (Método de Ward, distancia de Manhattan; genes, n=9; muestras, n=66). La barra de color superior indica el clúster al que pertenece cada uno de los individuos (Clúster 1, 2 o 3). La barra de color inferior representa el estadio Braak de cada una de las muestras. El esquema de color del *heatmap* está basado en la distribución *z-score*, de -1,5 (azul) a 1,5 (rojo). (B) Representación de los valores del *gene set score* CDM en función del clúster definido en la figura A (Clúster 1, n=23; clúster 2, n=27; clúster 3, n=16). Se representan los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn (**p<0,01; ****p<0,0001). (C) Número de individuos, clasificados en función del estadio Braak, que constituyen cada uno de los clústeres. La significancia de la asociación entre estadio Braak y clúster se ha analizado mediante la prueba de chi-cuadrado, comparando Braak II con respecto a Braak V-VI (p=0.0066). (D) Número de individuos, clasificados en función del género, en cada uno de los clústeres. La significancia de la asociación se ha analizado mediante la prueba de chi-cuadrado (p=0.6329). (E) Distribución por genotipo APOE en cada uno de los clústeres. Las muestras se han clasificado según presenten los dos alelos ε3 o al menos un alelo ε2 o ε4.



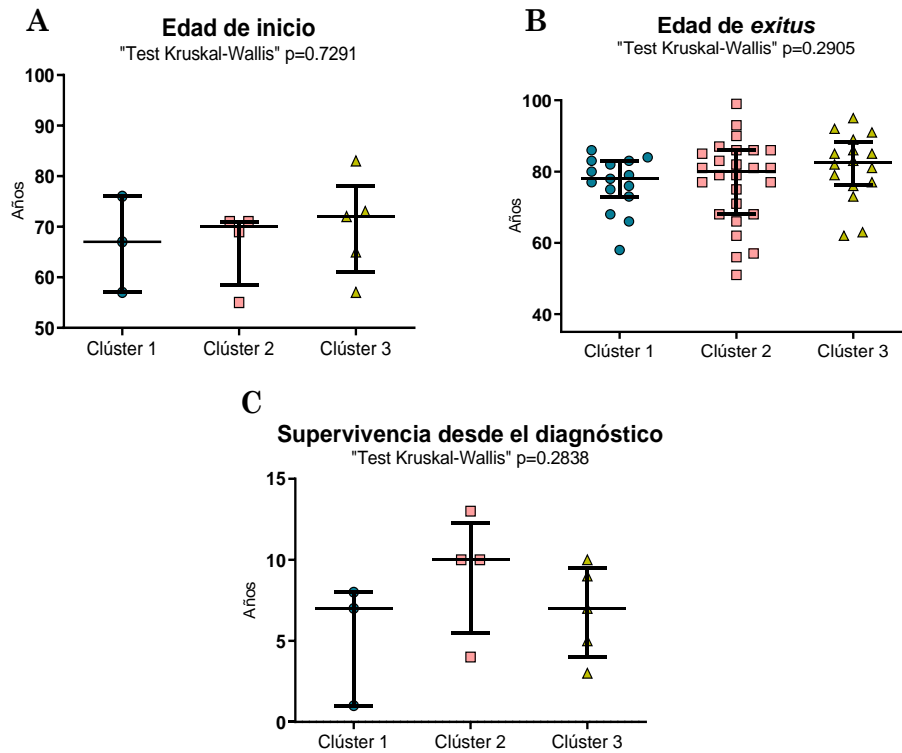


Figura D.49. Ausencia de relación entre la infiltración de CDM y aspectos clínicos. (A) Edad de inicio de la patología en los 3 clústeres con un aumento progresivo de infiltración de CDM (Clúster 1, n=3; clúster 2, n=4; clúster 3, n=5). (B) Edad de muerte de los individuos en función del clúster (Clúster 1, n=15; clúster 2, n=26; clúster 3, n=16). (C) Años de supervivencia tras el diagnóstico en función del nivel de infiltración de CDM (Clúster 1, n=3; clúster 2, n=4; clúster 3, n=5). Se representan los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn.



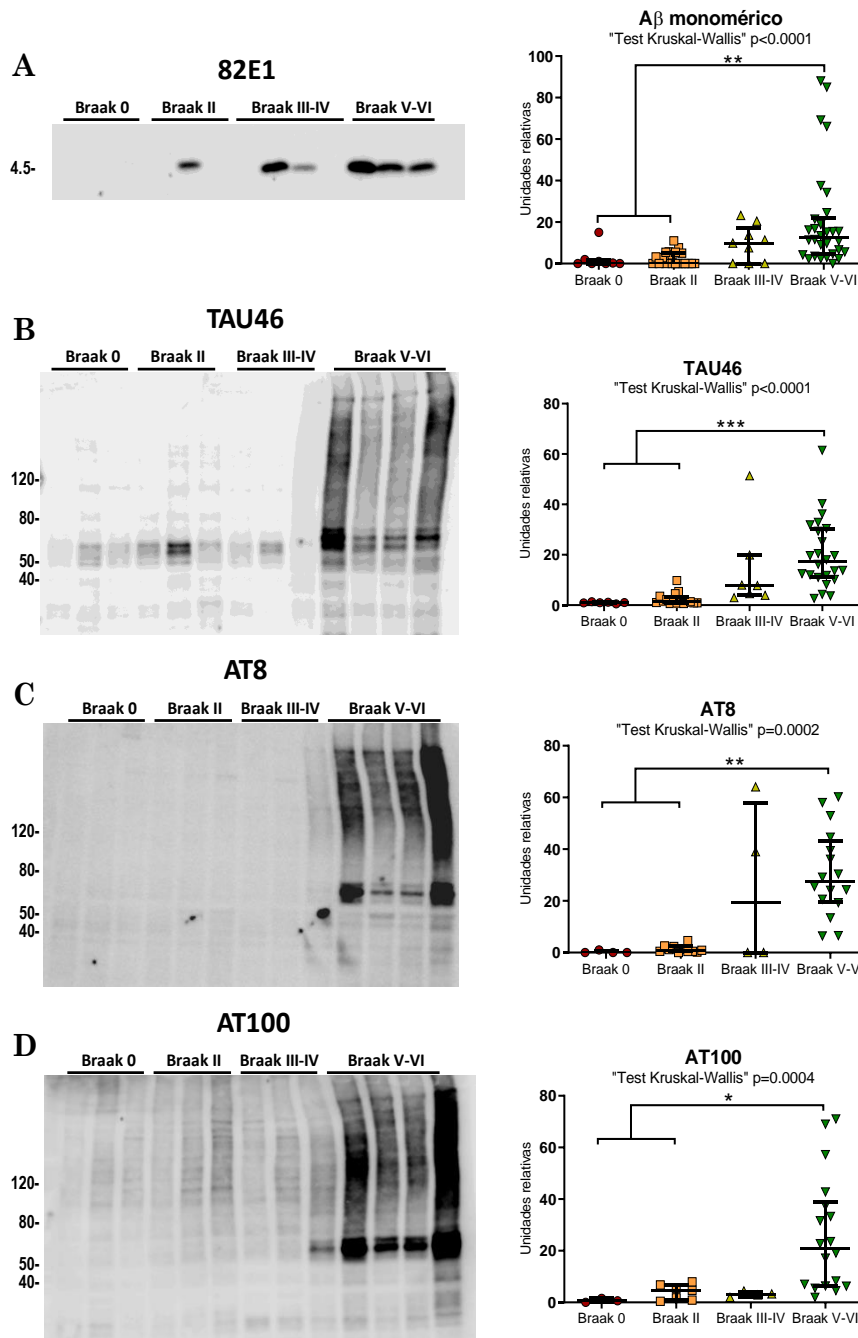


Figura D.50. Aumento de Aβ, Tau total y formas fosforiladas de Tau en el hipocampo de pacientes de Alzheimer. Análisis mediante western blot de la cantidad de (A) Aβ monomérico (Braak 0, n=8; Braak II, n=21; Braak III-IV, n=9; Braak V-VI, n=30), (B) Tau total agregado medido con el anticuerpo TAU46 (Braak 0, n=6; Braak II, n=16; Braak III-IV, n=7; Braak V-VI, n=24), (C) formas fosforiladas agregadas de Tau detectadas por el anticuerpo AT8 (Braak 0, n=4; Braak II, n=11; Braak III-IV, n=4; Braak V-VI, n=16) y (D) formas fosforiladas y agregadas de Tau reconocidas por AT100 (Braak 0, n=3; Braak II, n=7; Braak III-IV, n=4; Braak V-VI, n=18). Análisis realizado por la Dra. Victoria Navarro Garrido. Se representan los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn (*p<0,5; **p<0,01; ***p<0,001).



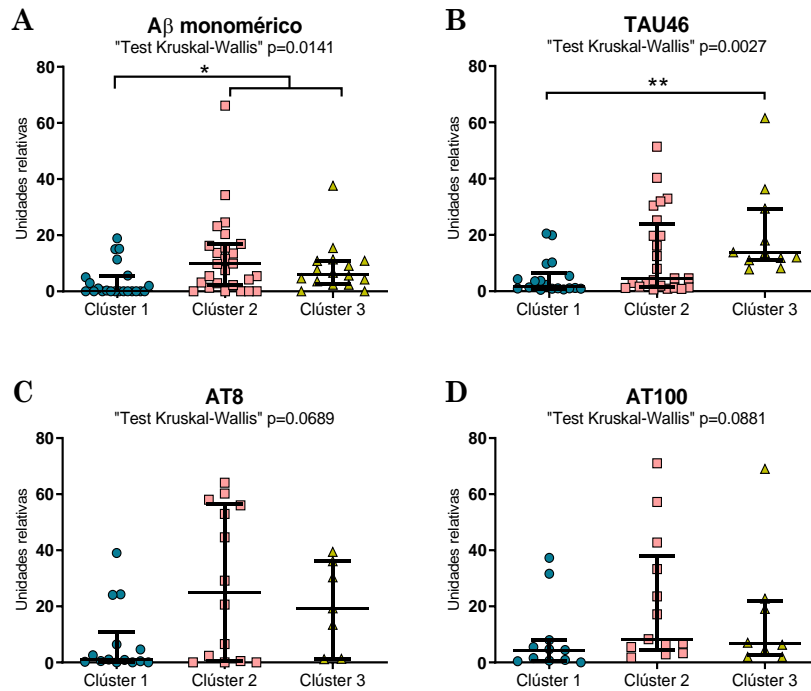


Figura D.51. Aumento de las patologías Aβ y Tau en los individuos con infiltración de CDM. Cantidad de (A) Aβ monomérico (Clúster 1, n=23; clúster 2, n=27; clúster 3, n=16), (B) Tau total medido con el anticuerpo TAU46 (Clúster 1, n=18; clúster 2, n=24; clúster 3, n=11), (C) formas fosforiladas de Tau detectadas por el anticuerpo AT8 (Clúster 1, n=14; clúster 2, n=14; clúster 3, n=7) y (D) formas fosforiladas de Tau reconocidas por AT100 (Clúster 1, n=11; clúster 2, n=13; clúster 3, n=8), en función del nivel de infiltración de CDM. Se indican los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn (*p<0,5; **p<0,01).

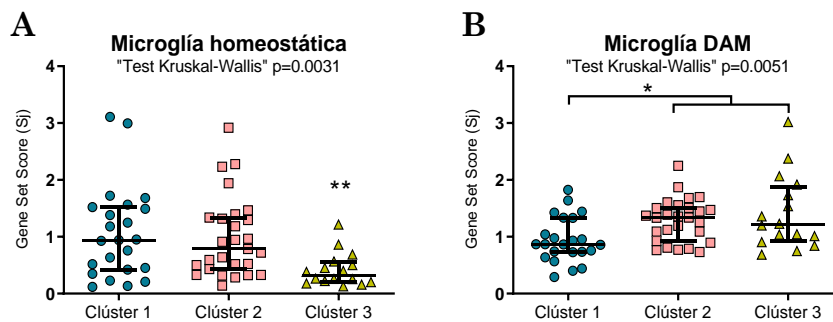


Figura D.52. La infiltración de CDM va acompañada de un cambio en el fenotipo microglial. Representación de los valores de *gene set score* de los genes de (A) Microglía homeostática y (B) Microglía DAM en función del grado de infiltración de CDM (Clúster 1, n=23; clúster 2, n=27, clúster 3, n=16). Se representan los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn (*p<0,05; **p<0,01).



En la figura D.53, observamos que se produce un incremento paralelo y altamente significativo en la reactividad astrogliar, la respuesta del complemento y la infiltración de CDM. De hecho, estos parámetros correlacionan entre sí de forma significativa (Figura D.59).

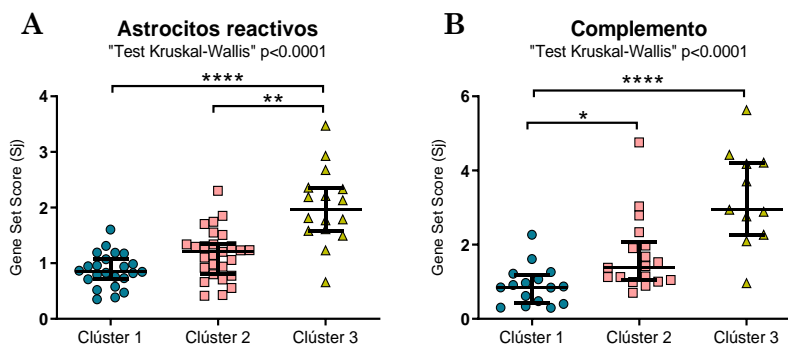


Figura D.53. La infiltración de CDM va acompañada de un aumento en la reactividad astrogliar y la respuesta del sistema del complemento. Representación de los valores de *gene set score* de los genes asociados a (A) astrocitos reactivos (GFAP y Vimentina) y (B) sistema del complemento (C1S, C1R, C3, C4a-b) en función del grado de infiltración de CDM (Clúster 1, $n=23/16$; clúster 2, $n=27/18$, clúster 3, $n=16/11$). Se representan los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$).

En el apartado 2.3.3 de Resultados, hemos descrito que en la EA se produce una disminución en la expresión de varias enzimas claves del metabolismo expresadas preferentemente en astrocitos. Por ello, estudiamos la relación entre la expresión de dichas enzimas y la infiltración de CDM. Nuestros resultados muestran que expresión de las dos enzimas glucolíticas reguladoras PFKM y PKM disminuye de forma patente en los individuos con mayor infiltración de CDM (Figura D.54 A). Además, se produce una disminución significativa de IDH3a, enzima limitante del ciclo de Krebs, mientras que la isoforma IDH2, que cataliza la misma reacción fuera del contexto del ciclo, no se modifica con la expresión del *gene set score* de CDM (Figura D.54 B). También se produce una clara disminución de las enzimas del metabolismo del glucógeno PYGB y PGM1 en el clúster 3 (Figura D.54 C), a pesar de que no se observan cambios con el estadio Braak (Figura D.32). En la figura D.54 D observamos, una tendencia a un aumento en los clústeres 2 y 3 en la expresión de la enzima implicada en el transporte de ácidos grasos al interior de la mitocondria CPT1A. Los individuos con mayor grado de infiltración de CDM también presentan una expresión disminuida de HMGCR (Figura D.54 E), enzima clave en la síntesis de colesterol. En conjunto, estos datos indican que existe una correlación positiva entre la alteración metabólica astrogliar y la infiltración de CDM en el parénquima hipocámpal de pacientes de Alzheimer.



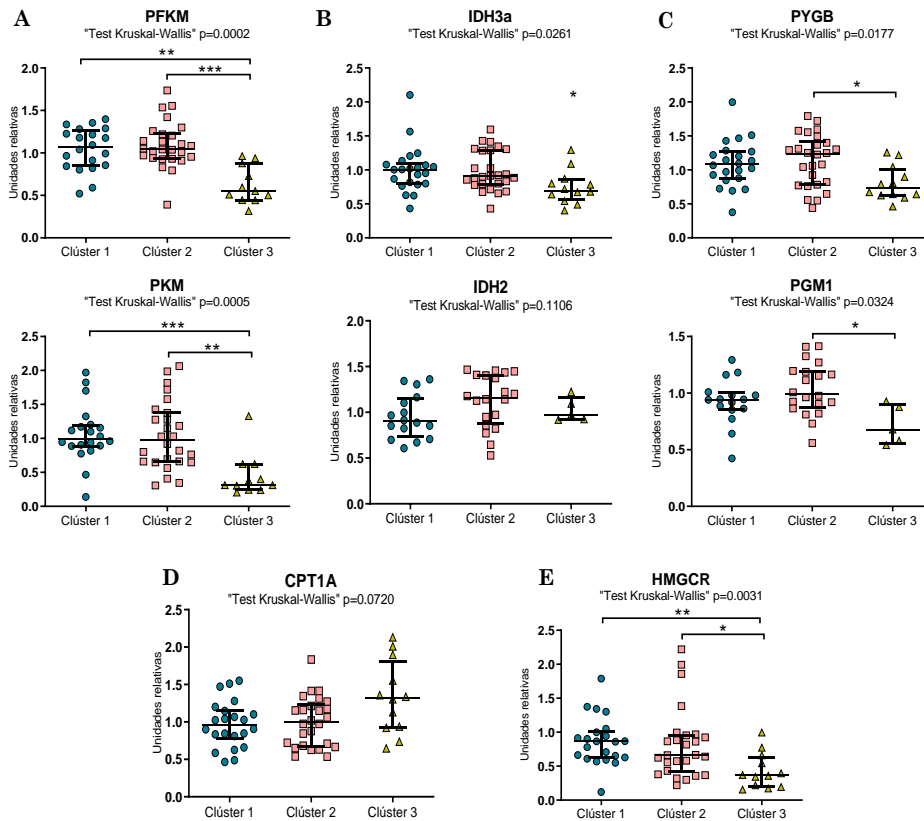


Figura D.54. Disminución de la glucólisis, ciclo de Krebs, metabolismo del glucógeno y síntesis de colesterol en los individuos con infiltración de CDM. Expresión relativa de (A) las enzimas glucolíticas PFKM y PKM; (B) IDH3a, que cataliza la tercera etapa del ciclo de Krebs, e IDH2; (C) las enzimas implicadas en el metabolismo del glucógeno PYGB y PGM1; (D) CPT1A, enzima implicada en el transporte de ácidos grasos de cadena larga a la matriz mitocondrial para una posterior β -oxidación; (E) HMGCR, principal punto de regulación de la síntesis de colesterol; en función del grado de infiltración de CDM (Clúster 1, n=16-22; clúster 2, n=20-26, clúster 3, n=5-12). Se indican los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Con el fin de investigar posibles mecanismos implicados en la infiltración al parénquima cerebral de células inmunes periféricas, hemos analizado su relación con la patología vascular y la expresión de moléculas de adhesión del endotelio. Observamos que en el 83,33% de los individuos con patología vascular (según el diagnóstico anatomopatológico) se produce infiltración de CDM (clústeres 2 y 3), mientras que en el clúster 1 se incluyen el 80% de los individuos sin patología vascular descrita (Figura D.55 A). Además, en los individuos del clúster 3 aumenta de forma significativa la expresión de las moléculas de adhesión PECAM1, que participa en la diapédesis, y selectina E (SELE), que permite el rodamiento sobre el endotelio (Figura D.55 B). También hemos estudiado la activación de los pericitos, debido a su importante papel en la unidad neurovascular, observando un aumento significativo de PDGFRB en los individuos con mayor infiltración de CDM (Figura D.55 C).



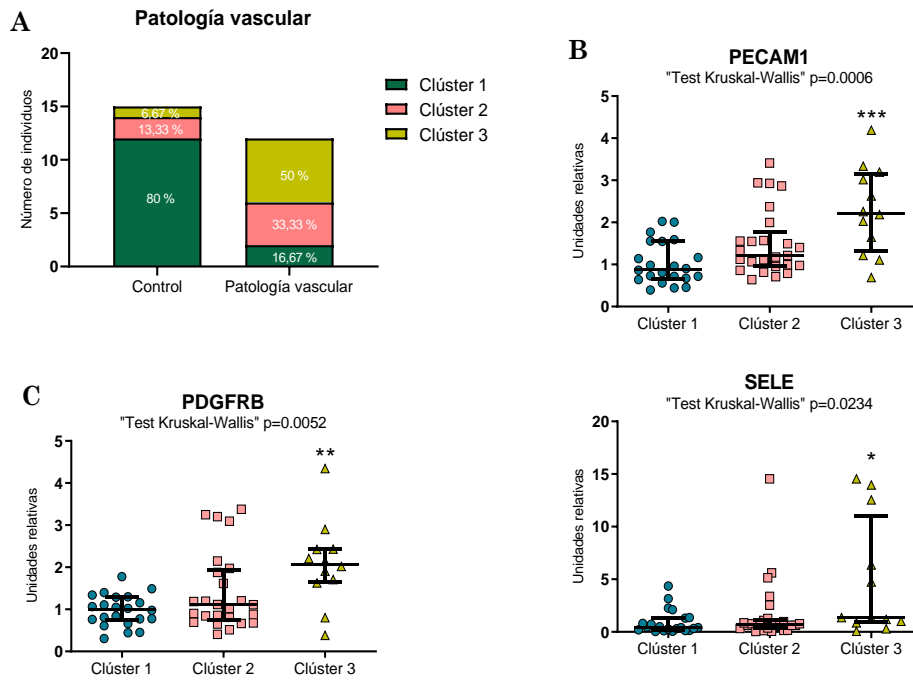


Figura D.55. Asociación entre la infiltración de CDM y la unidad neurovascular. (A) Número de individuos con o sin patología vascular, según el diagnóstico anatomopatológico, que constituyen cada uno de los clústeres. Los individuos sin patología vascular descrita se han englobado bajo el término de controles, independientemente de su estadio Braak. (B) Expresión relativa de las moléculas de adhesión PECAM1 y SELE en función del grado de infiltración de CDM. (C) Expresión relativa del marcador de activación de pericitos PDGFRB en función de la infiltración de CDM (Clúster 1, n=22; clúster 2, n=25, clúster 3, n=12). Se indican los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn (*p<0,05; **p<0,01; ****p<0,0001).

Asociado al aumento progresivo en la infiltración de CDM observamos un incremento paralelo en la expresión de CD3e, marcador específico de linfocitos (Figura D.56), lo cual sugiere que en el parénquima de enfermos de Alzheimer se produce una infiltración de ambos tipos de células inmunes periféricas.

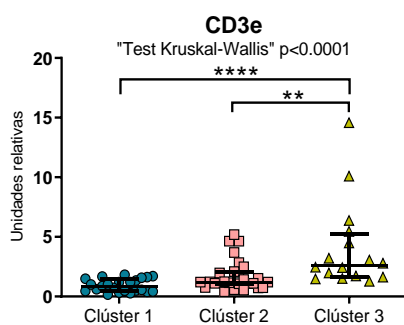


Figura D.56. Infiltración paralela de CDM y linfocitos CD3+. Expresión relativa de CD3e, marcador específico de linfocitos, en función del nivel de infiltración de CDM (Clúster 1, n=23; clúster 2, n=27, clúster 3, n=16). Se indican los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn (**p<0,01; ****p<0,0001).



Por último, y con el fin de esclarecer la función de las CDM en el parénquima cerebral, hemos analizado la expresión de los marcadores proinflamatorios IL1 β y TNF α (Figura D.57). En ambos casos se produce un aumento en los individuos que presentan una mayor infiltración de CDM, sugiriendo un potencial papel proinflamatorio y citotóxico asociado a la infiltración.

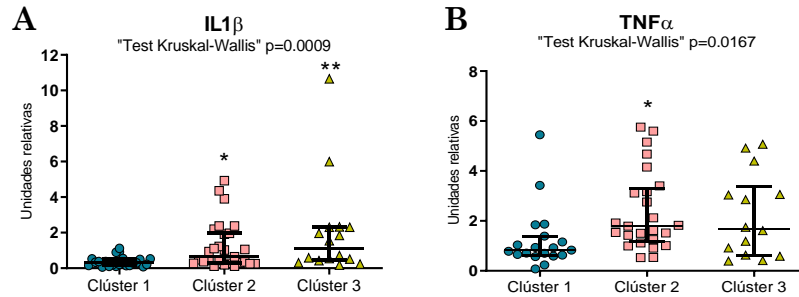


Figura D.57. Posible papel proinflamatorio y citotóxico de las CDM en el parénquima hipocampal. Expresión relativa de (A) IL1 β y (B) TNF α , analizadas mediante RT-PCR en tiempo real, en función del grado de infiltración de CDM (Clúster 1, n=23/19; clúster 2, n=27/25, clúster 3, n=16/14). Se representan los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn (*p<0,05; **p<0,01).

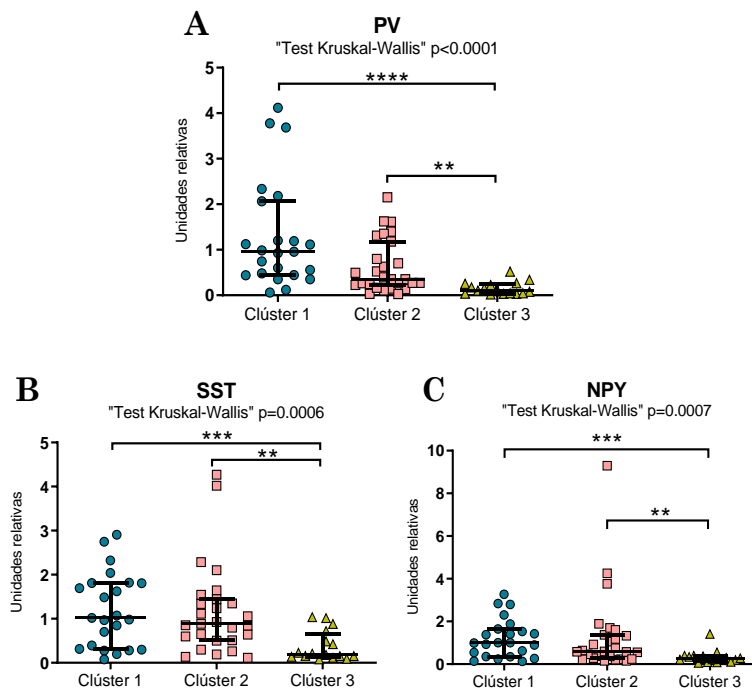


Figura D.58. Importante neurodegeneración GABAérgica en los individuos con infiltración de CDM. Expresión relativa de (A) PV, (B) SST y (C) NPY, analizadas mediante RT-PCR en tiempo real, en función del grado de infiltración de CDM (Clúster 1, n=23; clúster 2, n=27, clúster 3, n=16). Se representan los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn (**p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001).



Otro de los rasgos neuropatológicos típicos en el hipocampo de pacientes de Alzheimer es la neurodegeneración GABAérgica. Por ello, estudiamos la relación entre el grado de infiltración y la expresión de genes de las neuronas GABAérgicas parvalbúmina (PV), somatoestatina (SST) y neuropéptido Y (NPY). En la figura D.58 observamos una disminución progresiva y altamente significativa de la expresión de estos marcadores de neuronas GABAérgicas conforme aumenta el grado de infiltración. De hecho, la expresión de PV, SST y NPY correlaciona claramente de forma negativa con el *gene set score* de CDM (Figura D.59).

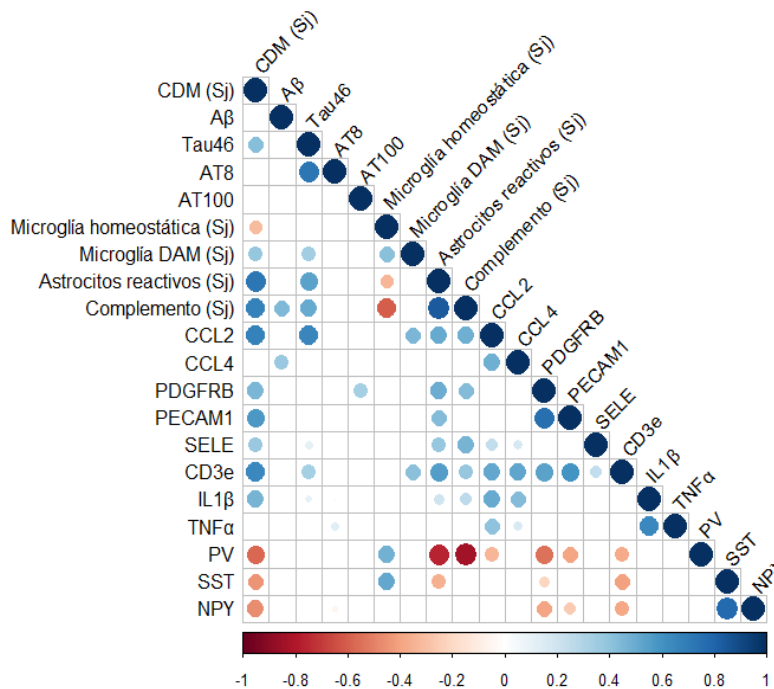


Figura D.59. Correlaciones entre el *gene set score* de CDM y otros aspectos importantes de la patología de Alzheimer en muestras humanas de hipocampo. El estudio de correlación se ha realizado empleando el método de Spearman y solo se indican las correlaciones significativas ($p < 0,05$). Las correlaciones positivas se muestran en azul y las negativas, en rojo. La intensidad del color y el tamaño del círculo son proporcionales al coeficiente de correlación (muestras, $n = 33-66$).

En resumen, nuestros datos sugieren que la infiltración de CDM se produce principalmente en los pacientes de Alzheimer con afectación importante de patología Aβ y Tau, aunque no exista una correlación clara con el depósito de estas proteínas. Además, parece ocurrir en aquellos individuos con una población de microglía total u homeostática disminuida, aunque activa, y una reactividad y disfunción metabólica astrogliar. Su entrada en el parénquima cerebral podría mediarse por moléculas de adhesión del endotelio, y/o asociarse a una patología vascular previa, además de acompañarse de la infiltración paralela de linfocitos T CD3+. Aunque se requiere una investigación más profunda sobre el tema, las CDM se asocian a una importante neurodegeneración GABAérgica, y podrían desempeñar un papel proinflamatorio y citotóxico o, por el contrario, ser una consecuencia de la EA avanzada.



3.4. La infiltración de CDM ocurre en múltiples áreas cerebrales en los pacientes de EA

En los apartados anteriores, hemos descrito la infiltración de CDM en muestras de hipocampo de pacientes de EA. Sin embargo, en esta patología existen importantes diferencias entre hipocampo y corteza fontral, como hemos comentado en varias ocasiones a lo largo de este trabajo.

Por ello, estudiamos mediante Taqman® Array Cards la infiltración de células periféricas en la corteza frontal de pacientes de EA. Como podemos observar en la figura D.60 A y B en pacientes Braak V-VI se produce un importante aumento de los diferentes genes asociados a CDM y del *gene set score* de CDM en comparación con los individuos Braak 0 y Braak II lo que sugiere que, en la corteza frontal de pacientes de EA, también se produce infiltración de CDM.

Además, los *gene set score* de los genes asociados a CDM de hipocampo (Figura D.43 C) y de corteza frontal (Figura D.60 B) presentan muy buena correlación, lo que parece indicar que la infiltración ocurre de forma paralela en ambas áreas cerebrales de un mismo individuo (Figura D.60 C).

Para confirmar nuestros resultados realizamos, en colaboración con el grupo de la Dra. Antonia Gutiérrez, estudios inmunohistoquímicos en muestras de corteza frontal de controles (Braak II) y pacientes (Braak V-VI) usando los marcadores CD45 y CD163. En la figura D.60 D, observamos que en ambos estadios existe un elevado número de células microgliales CD45+, tanto en regiones interplacas como asociadas a placas OC+. Sin embargo, imágenes de cortes consecutivos de la misma muestra procesados para CD163 revelan resultados simales a los descritos en hipocampo. Así, en los individuos Braak II, CD163 queda prácticamente restringido a vasos (probablemente marcando a macrófagos perivasculares), mientras que en Braak V-VI existen numerosas células CD163+ en el interior del parénquima cortical, principalmente asociadas a placas. Por tanto, nuestros resultados indican que en corteza frontal de pacientes de EA también se produce infiltración de CDM.

Figura D.60. Infiltración de CDM en muestras *post mortem* de corteza frontal de pacientes de EA. (A) Representación mediante *heatmap* o mapa de calor de los valores tipificados (*z-score*) de la expresión de genes asociados a CDM medidos mediante Taqman® Array Cards en la corteza frontal de individuos Braak 0 (n=11), II (n=12) y V-VI (n=19). Las muestras han sido ordenadas en base a un análisis de clúster jerárquico (Método de Ward, distancia de Manhattan). En el margen superior, se muestra el dendrograma obtenido y una barra de color que indica el estadio Braak de cada una de las muestras. El esquema de color del *heatmap* está basado en la distribución *z-score*, de -1,5 (azul) a 1,5 (rojo). (B) Representación de los valores de *gene set score* (S_i) de los genes asociados a CDM, incluidos en el *heatmap* de la figura A. Se representan los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn (**p<0,001). (C) Análisis de correlación entre los valores de *gene set score* (S_i) de CDM analizados mediante Taqman® Array Cards en muestras de hipocampo y corteza frontal de los mismos individuos, en función del estadio Braak, con recta de ajuste o regresión lineal (\pm SD). El estudio de correlación se ha llevado a cabo empleando el método de Spearman. (D) Inmunomarcaje para OC y CD45 o CD163 en regiones consecutivas de la corteza frontal *post mortem* de individuos Braak II y Braak V-VI. Imágenes cedidas por el grupo de la Dra. Antonia Gutiérrez. Barra de escala: 200 μ m; insertos: 20 μ m (Braak II) y 50 μ m (Braak VI).



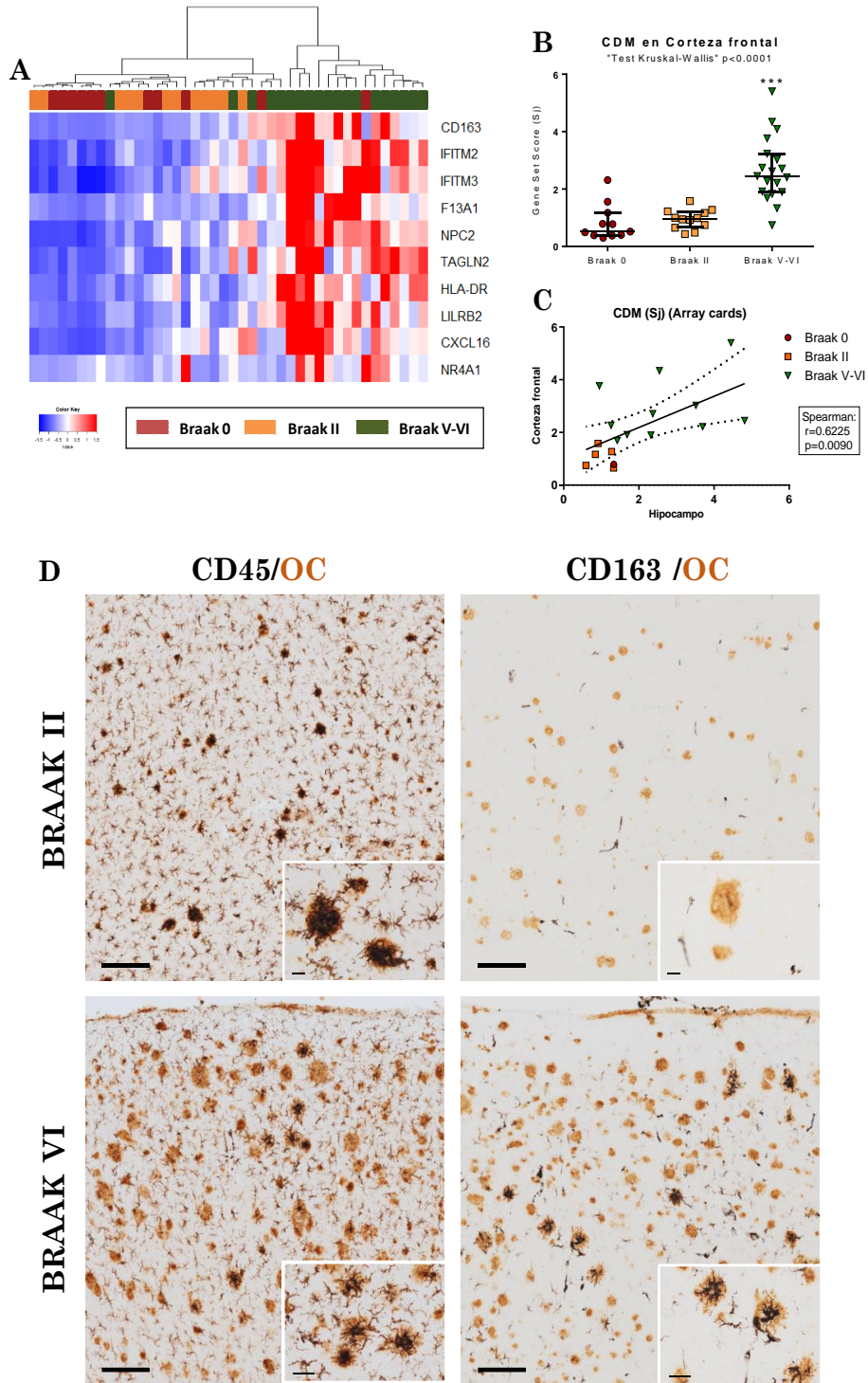


Figura D.60. Infiltración de CDM en muestras *post mortem* de corteza frontal de pacientes de EA (ver leyenda en página previa).



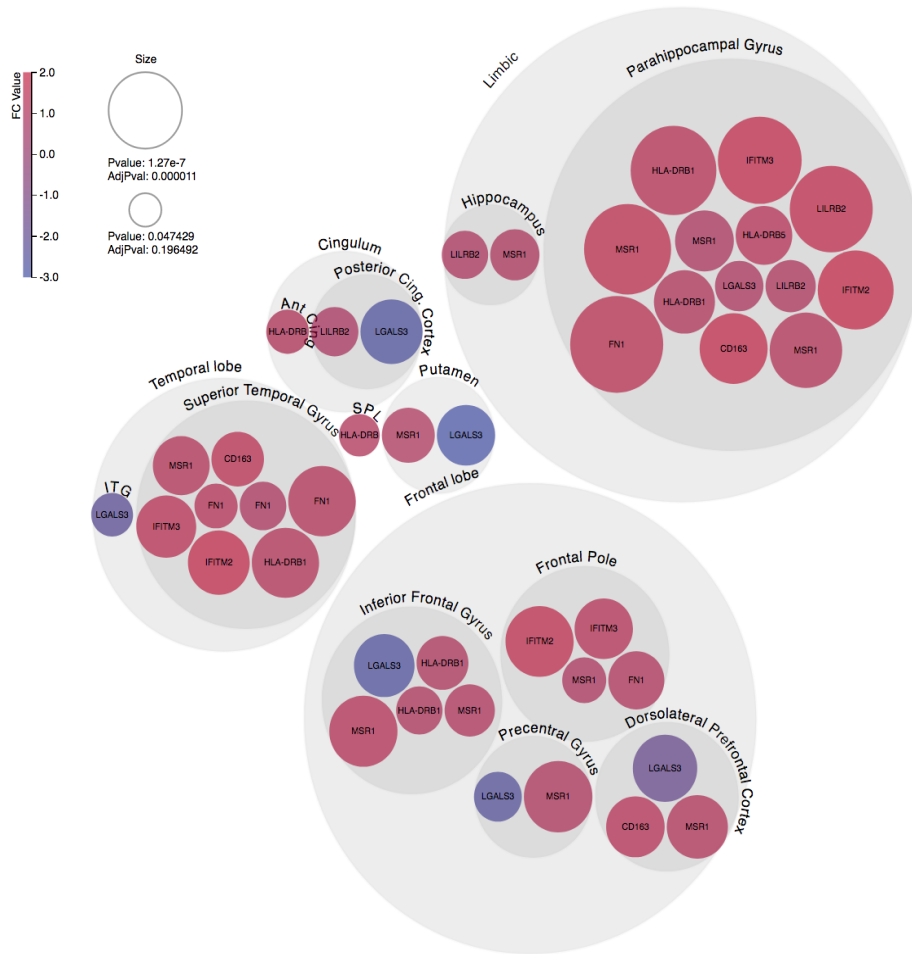


Figura D.61. Aumento de la expresión de genes de CDM en múltiples regiones cerebrales en pacientes Braak V-VI respecto a controles. El gráfico de burbujas o *bubble chart* representa cambios significativos en la expresión de ARNm de genes asociados a CDM en pacientes Braak V-VI respecto a individuos Braak 0, I y II, en las diferentes regiones cerebrales indicadas. Las burbujas se encuentran agrupadas en función del área y subárea cerebral. El color de estas es indicativo del *fold-change* del gen, de -3 (azul) a 2 (rojo). Su tamaño correlaciona con la significancia existente en la comparación. Los niveles de ARNm han sido obtenidos a partir de las bases de datos del *Mount Sinai Brain Bank* y *Religious Orders Study and Memory Aging Project RNA-Seq dataset*. Análisis cedido por los doctores Alberto Serrano-Pozo y Sudeshna Das.



Además, en colaboración con el Dr. Alberto Serrano-Pozo y la Dra. Sudeshna Das, analizamos en bases de datos abiertas la expresión de varios de estos genes asociados a CDM, lo que nos ha permitido ampliar significativamente nuestra cohorte de pacientes y las regiones cerebrales estudiadas. En la figura D.61 observamos que la mayoría de los genes analizados aumentan de forma significativa en varias áreas cerebrales, pero principalmente en el giro parahipocampal. Curiosamente, la expresión de LGALS3 disminuye en varias regiones de forma significativa, a excepción de en el giro parahipocampal. En la figura S4 (Anexo I) se muestra la expresión relativa de ARNm de genes asociados a CDM con la progresión de la patología en el giro temporal superior y el giro parahipocampal, incluyendo también estadios intermedios (Braak III-IV). En dicha figura se corrobora que los genes estudiados aumentan de forma significativa con la patología, a excepción de F13A1 en el giro parahipocampal y LGALS3.

Con estos resultados podemos concluir que la infiltración de CDM que hemos descrito en el hipocampo y corteza frontal de pacientes de EA, probablemente también ocurra en otras regiones cerebrales.



4. CARACTERIZACIÓN DE SUBPOBLACIONES O ESTADOS DE ASTROCITOS Y MICROGLIA EN PACIENTES DE ALZHEIMER MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA FLUORESCENTE MÚLTIPLE

A lo largo de este trabajo de Tesis doctoral, hemos analizado la expresión de un elevado número de genes en muestras de tejido cerebral con la progresión de la EA. Aunque, en la actualidad, es posible realizar estudios transcriptómicos a nivel de células aisladas, estas aproximaciones requieren tejido fresco, lo que no es posible en el caso de nuestras muestras humanas, y conllevan la pérdida de información espacial sobre la localización de las células en el tejido. Tradicionalmente se han usado técnicas inmunohistoquímicas de fluorescencia para estudiar la localización simultánea de un número limitado de marcadores (3 o 4) en un tejido, lo que es claramente insuficiente debido a la gran diversidad de subpoblaciones o estados celulares en el SNC en condiciones normales y patológicas (Serrano-Pozo et al., 2013a; Vasile et al., 2017; Hansen et al. 2018; Boisvert et al., 2018; Sankowski et al., 2019; Grubman et al., 2019; Prokop et al., 2019; Matias et al., 2019; Stratoulis et al., 2019; Zhou et al., 2020). Por ello, hemos desarrollado una novedosa aproximación experimental que nos permite estudiar en pacientes de Alzheimer hasta 17 marcadores diferentes en una misma sección de tejido, y analizar su distribución espacial con respecto a las placas de A β ; lo que supone una gran ventaja respecto a las técnicas transcriptómicas en célula única. Esta metodología se ha desarrollado y realizado durante una estancia predoctoral en el laboratorio de los doctores Alberto Serrano-Pozo y Bradley Hyman, en el *Massachusetts General Hospital (Harvard Medical School, Estados Unidos)*.

4.1. Muestras humanas *post mortem*

Para este trabajo hemos empleado secciones de 8 μ m de grosor de muestras de polo temporal humanas (Área de Brodmann 38) fijadas en formalina al 10% durante 2-3 semanas e incluidas en parafina. Las muestras clasificadas como EA cumplen criterios tanto clínicos como neuropatológicos de EA (McKhann et al., 2011; Hyman et al., 2012; Montine et al., 2012), mientras que los individuos usados como controles no cumplen criterios diagnósticos neuropatológicos para ninguna de las enfermedades neurodegenerativas. Hemos utilizado muestras del polo temporal debido a que la corteza de asociación temporal es un área con un depósito precoz de placas y ovillos neurofibrilares, y desarrolla una marcada respuesta glial en la EA (Serrano-Pozo et al., 2011a; Serrano-Pozo et al., 2011b; Serrano-Pozo et al., 2016).

Las muestras fueron cedidas por el *Massachusetts Alzheimer's Disease Research Center (MADRC) Brain Bank*. En todos los casos, los sujetos o familiares más cercanos proporcionaron el consentimiento informado por escrito, aceptando la donación de sus cerebros después de su fallecimiento. Además, el estudio fue aprobado por el *MADRC Brain Bank Institutional Review Board*.



4.2. Procedimiento de la inmunohistoquímica fluorescente múltiple

Para desarrollar este protocolo, hemos combinado el método Opal y el protocolo de inmunofluorescencia cíclica basada en tejido (t-cyIF; del inglés, *tissue-based cyclic immunofluorescence*) desarrollado por el laboratorio del Dr. Sorger (Lin et al., 2015; Lin et al., 2016; Lin et al., 2018). Este protocolo se basa en técnicas de inmunohistoquímica fluorescente tradicional, con los correspondientes anticuerpos primarios y secundarios. Sin embargo, tras la toma de imágenes de la sección completa, se realiza una desnaturalización de los anticuerpos mediante el calentamiento en microondas (tal y como se describe en el método Opal) y una desactivación o *quenching* de la señal fluorescente (basada en el protocolo de t-cyIF). Posteriormente, se lleva a cabo la siguiente ronda de inmunohistoquímica tradicional, y una vez tomadas las imágenes, vuelve a iniciarse un nuevo ciclo, hasta un total de 8 rondas (Figura D.62). Por tanto, esta técnica nos permite estudiar de forma simultánea un total de 17 marcadores diferentes en el mismo tejido.

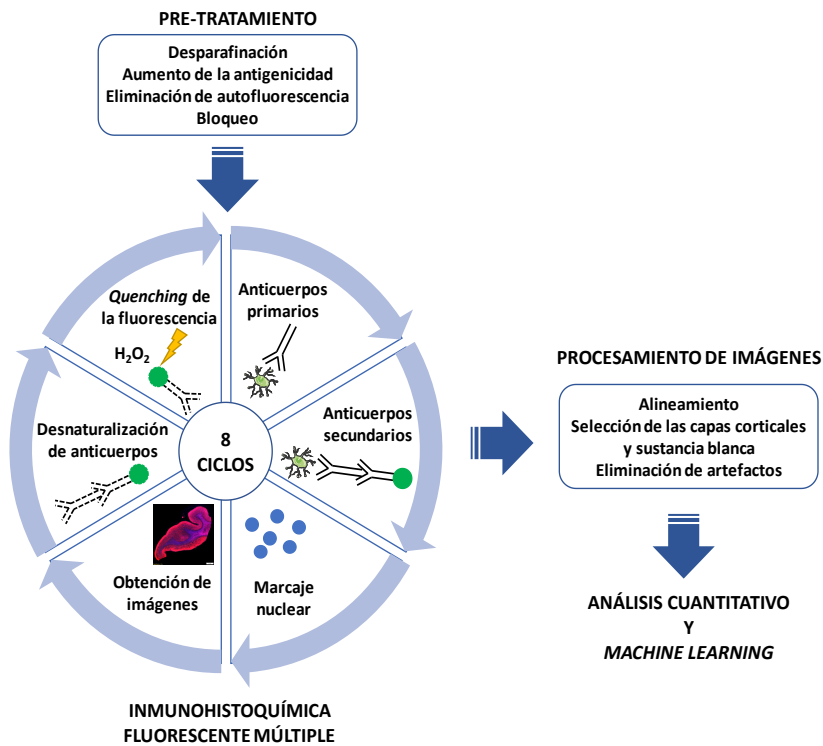


Figura D.62. Esquema del procedimiento de inmunohistoquímica fluorescente múltiple. Representación de los principales pasos del protocolo de inmunohistoquímica fluorescente múltiple empleado en secciones de polo temporal, incluidas en parafina, de individuos control y pacientes de Alzheimer. En esta figura se han utilizado ilustraciones bajo la licencia de Creative Commons Attribution 4.0 International (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>).



A continuación, describimos de forma detallada el protocolo diseñado para este estudio:

1. Desparafinación y rehidratación del tejido

Para eliminar la parafina, las secciones de tejido humano montadas sobre portaobjetos gelatinizados, se sumergen dos veces en xileno durante 10 minutos, y posteriormente, se rehidratan en una serie de soluciones de etanol con concentración decreciente (100% durante 5 minutos dos veces, 95% 5 minutos y 70% durante otros 5 minutos). Por último, las muestras se lavan con agua destilada durante 5 minutos.

2. Recuperación antigénica del tejido

Debido a la prolongada fijación de los tejidos, es recomendable realizar un paso de recuperación antigénica. Para ello, sumergimos las secciones en buffer citrato 0,01M pH 6,0 con Tween20 0,05% hirviendo y calentamos en microondas a 95°C durante 20 minutos. Dejamos enfriar durante 45 minutos a 4°C y realizamos 3 lavados de 5 minutos con Tris *buffer* salino (TBS).

3. Eliminación de autofluorescencia

Debido a la acumulación de gránulos de lipofucsina autofluorescentes con la edad, es recomendable también minimizar esta autofluorescencia con un tratamiento con Sudán negro. Para ello, sumergimos los cortes en etanol 70% durante 5 minutos y, seguidamente, en la solución comercial *Autofluorescence Eliminator Reagent* (Millipore), que contiene Sudán negro en etanol, durante 5 minutos. Aclaremos las muestras con 3 inmersiones en etanol al 70% de 1 minuto cada una y finalmente lavamos en TBS durante 5 minutos.

4. Bloqueo

Para evitar cualquier unión inespecífica de los anticuerpos primarios, bloqueamos las secciones con suero normal de burro (NDS, del inglés *normal donkey serum*) al 10% en TBS durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación suave.

5. Incubación con anticuerpos primarios

Tras el bloqueo, incubamos las secciones con una solución de anticuerpos primarios en NDS al 5% en TBS a la concentración adecuada, recogidos y clasificados en la Tabla D.1 en función de la ronda en la que se han utilizado. Cabe destacar que GFAP se incluye en todos los ciclos para asegurar el alineamiento posterior de las imágenes obtenidas en las sucesivas rondas. Las secciones se incuban con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, lavamos las muestras dos veces con TBS durante 10 minutos con una agitación suave para eliminar restos de anticuerpos primarios que no se han unido de forma específica.

6. Incubación con anticuerpos secundarios

Las secciones se incuban con una dilución 1:200 de los correspondientes anticuerpos secundarios (Tabla D.1) en una solución de NDS al 5% en TBS. Las secciones se mantienen en incubación durante 2 horas a temperatura ambiente y con



una agitación suave. A partir de este punto, mantenemos las muestras en oscuridad para evitar que se pierda la fluorescencia del fluorocromo acoplado al anticuerpo secundario. Tras la incubación, lavamos las muestras dos veces con TBS durante 10 minutos.

7. Marcaje nuclear con DAPI

Para visualizar los núcleos celulares, realizamos una tinción con el fluorocromo azul DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), incubándolo a una concentración de 0.001 mg/ml in TBS durante 10 minutos y agitación suave, en oscuridad y temperatura ambiente. Este fluorocromo se une de forma específica al ADN en aquellas regiones ricas en A-T. Transcurridos los 10 minutos, las secciones se lavan durante 10 minutos con TBS con una agitación suave.

8. Montaje de las secciones

Las secciones se cubren con un cubreobjetos usando un medio de montaje acuoso que contiene DAPI (DAPI Fluoromount-G®; SouthernBiotech) y se almacenan en oscuridad a 4°C hasta la toma de imágenes. Es importante garantizar una adecuada tinción de los núcleos, ya que el marcaje de DAPI se emplea, junto al de GFAP, para el alineamiento de las imágenes en etapas posteriores. Durante el montaje con este medio, conviene dejar burbujas de aire fuera del perímetro del tejido para facilitar la retirada del cubreobjetos en el paso 10 de este protocolo.

9. Obtención de imágenes mediante microscopía de fluorescencia

Las secciones son escaneadas usando el microscopio de muestras virtuales VS120 de Olympus. Este microscopio de epifluorescencia está equipado con una platina automática y monitorizada con precisión micrométrica, cuatro objetivos (2x, 10x, 20x y 40x), una cámara CCD de alta resolución y sensibilidad y, además, permite la detección de fluorescencia en hasta cinco canales (DAPI, TRITC, FITC, Cy5 y Cy7). El equipo tiene capacidad para enfocar y escanear de forma automática el área completa de las muestras incluidas en hasta 100 portaobjetos diferentes. Posteriormente, el software procesa las imágenes obtenidas en cada campo, creando una única imagen de formato .vsi, que incluye toda la sección, para cada muestra.

En concreto, para este trabajo se han tomado imágenes de cada sección en los canales DAPI, TRITC, FITC y Cy5 usando el objetivo 40x. Para mantener la consistencia entre los diferentes experimentos, cada marcador se ha escaneado con el mismo tiempo de exposición en todas las secciones. El tiempo se ha decidido durante el desarrollo del procedimiento en función a estudios piloto previos. Además, en cada experimento se han incluido el mismo número de muestras de sujetos controles y con EA.

10. Retirada del cubreobjetos

Una vez tomadas las imágenes, las secciones se sumergen en TBS con Tween20 al 0,05%, para favorecer que se desprege el cubreobjetos y se deslice suavemente sobre el tejido sin dañarlo.



Ciclo	Antígeno primario	Especie huésped	Proveedor (Referencia)	Dilución empleada	Anticuerpo secundario
1	MHC2	Ratón	Dako (M0775)	1:50	Anti-ratón-Cy3
	TSP0	Conejo	Abcam (Ab109497)	1:100	Anti-conejo-AF488
	GFAP	Cabra	Abcam (Ab53554)	1:100	Anti-cabra-Cy5
2	EAAT2	Ratón	Thermo Scientific (MA5-12360)	1:50	Anti-ratón-Cy3
	TMEM119	Conejo	Sigma-Aldrich (HPA051870)	1:100	Anti-conejo-AF488
	GFAP	Cabra	Abcam (Ab53554)	1:100	Anti-cabra-Cy5
3	CD68	Ratón	Dako (M0814)	1:50	Anti-ratón-Cy3
	EAAT1	Conejo	Abcam (Ab416)	1:100	Anti-conejo-AF488
	GFAP	Cabra	Abcam (Ab53554)	1:100	Anti-cabra-Cy5
4	ALDH1L1	Ratón	Sigma-Aldrich (MABN495)	1:500	Anti-ratón-Cy3
	IBA1	Conejo	Wako Pure Chemical (019-19741)	1:250	Anti-conejo-AF488
	GFAP	Cabra	Abcam (Ab53554)	1:100	Anti-cabra-Cy5
5	VIM	Ratón	Sigma-Aldrich (V6630)	1:1.000	Anti-ratón-Cy3
	FERRITINA	Conejo	Sigma-Aldrich (F6136)	1:500	Anti-conejo-AF488
	GFAP	Cabra	Abcam (Ab53554)	1:100	Anti-cabra-Cy5
6	HuC/HuD	Ratón	Sigma-Aldrich (MABN153)	1:500	Anti-ratón-Cy3
	YKL40	Conejo	Thermo Fisher (PA5-43746)	1:100	Anti-conejo-AF488
	GFAP	Cabra	Abcam (Ab53554)	1:100	Anti-cabra-Cy5
7	GS	Ratón	Sigma-Aldrich (MAB302)	1:1.000	Anti-ratón-Cy3
	GFAP	Cabra	Abcam (Ab53554)	1:100	Anti-cabra-Cy5
8	PHF1	Ratón	Regalo del Dr. Peter Davies	1:200	Anti-ratón-AF488
	β-Amiloide	Conejo	Cell Signaling (D54D2)	1:500	Anti-conejo-Cy3
	GFAP	Cabra	Abcam (Ab53554)	1:100	Anti-cabra-Cy5

Tabla D.1. Relación de anticuerpos utilizados en la inmunohistoquímica fluorescente múltiple, ordenados en función del ciclo en que se han empleado. Se indica el antígeno reconocido por dichos anticuerpos, la especie huésped donde se han producido, la casa comercial y el número de catálogo, la dilución empleada en este trabajo y el anticuerpo secundario utilizado en cada caso. Todos los anticuerpos secundarios (Jackson ImmunoResearch Laboratories) son producidos en burro y se usan a una dilución 1:200. Se han empleado anticuerpos secundarios conjugados a cianina 3 (Cy3; del inglés, *Cyanine 3*), Alexa Fluor 488 (AF488) y cianina 5 (Cy5; del inglés, *Cyanine 5*).



11. Desnaturalización y eliminación de anticuerpos

Una vez escaneadas y retirado el cubreobjetos, las secciones se sumergen de nuevo en buffer citrato 0,01M pH 6,0 con Tween20 0,05% hirviendo y se calientan en microondas a 95°C durante 20 minutos para desnaturalizar y desprender los anticuerpos primarios y secundarios. A continuación, se dejan enfriar durante 45 minutos a 4°C y se realizan 3 lavados de 5 minutos con TBS.

12. Desactivación o *quenching* de la fluorescencia

Las secciones se sumergen en una solución alcalina oxidante (compuesta por NaHCO₃ 0,1 M y H₂O₂ 3% a pH de 11,2) durante 30 minutos a temperatura ambiente, y posteriormente se lavan 5 minutos con TBS 3 veces. Con este tratamiento se produce una inactivación irreversible por oxidación de los fluoróforos de los anticuerpos secundarios que puedan haber permanecido unidos al tejido después de la desnaturalización (Lin et al., 2016).

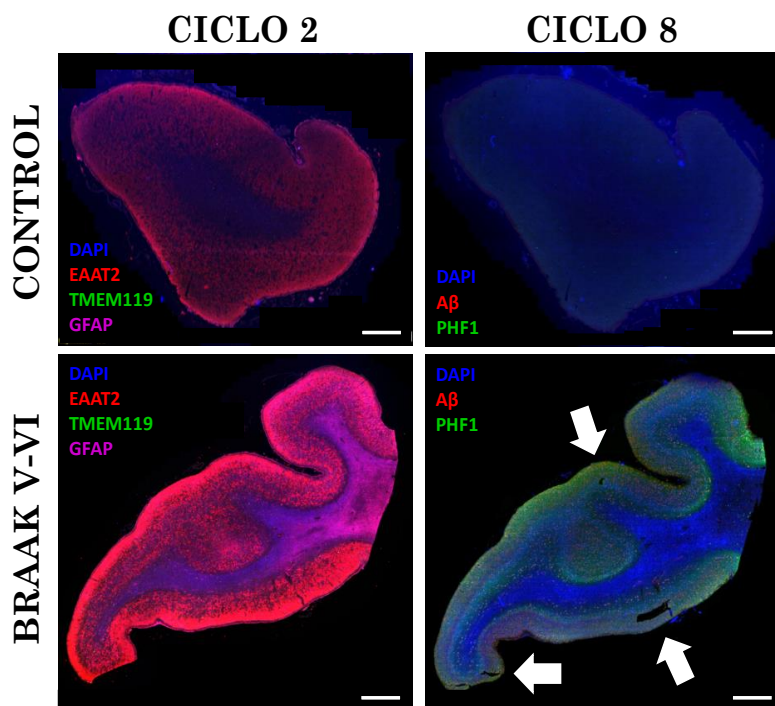


Figura D.63. El daño en el tejido después de los ocho ciclos de inmunohistoquímica fluorescente múltiple es muy limitado. Imágenes obtenidas tras los ciclos 2 y 8 en las mismas secciones procedentes de un individuo control y un paciente de Alzheimer. Las flechas blancas indican las áreas donde se produce un daño del tejido. Barra de escala: 2 mm.

Una vez eliminados los anticuerpos empleados y la señal fluorescente residual, se repiten los pasos 4-12, empleando los anticuerpos correspondientes (Tabla D.1), hasta un total de 8 ciclos.

Es importante destacar que, paralelamente a este procedimiento, hemos realizado en cada ronda una inmunohistoquímica de fluorescencia tradicional (de ciclo único) en una sección adyacente del mismo individuo. Esto nos ha permitido



comprobar que el marcaje es específico tras los sucesivos ciclos, y que la señal fluorescente de los ciclos anteriores se elimina de forma correcta (datos no mostrados). Además, con este protocolo, el daño del tejido es muy reducido, incluso después de los 8 ciclos (Figura D.63).

4.3. Procesamiento de imágenes

Las imágenes .vsi obtenidas en el apartado anterior se procesan utilizando el software cellSens de Olympus. Debido al elevado tamaño de las imágenes, así como al ligero daño producido en ciertas áreas del tejido, no es posible obtener un correcto alineamiento de todo el corte escaneado. Por otra parte, gracias al marcaje de las proteínas neuronales HuC/HuD, es posible distinguir las seis capas del neocortex temporal (Ding et al., 2009), tal y como vemos en la figura D.64. Por ello, seleccionamos 6 áreas rectangulares de interés, cada una con el grosor correspondiente a cada una de las capas de la corteza, y obtenemos una nueva imagen para cada una de ellas. Posteriormente, se seleccionan las mismas áreas de interés en cada una de las imágenes obtenidas en los 7 ciclos restantes de esa misma muestra (Figuras D.65 y D.66), utilizando la señal de DAPI y GFAP como referencias. Por tanto, para una única muestra obtenemos un total de 48 imágenes, correspondientes a los 8 ciclos de inmunofluorescencia por las 6 capas de corteza analizadas.

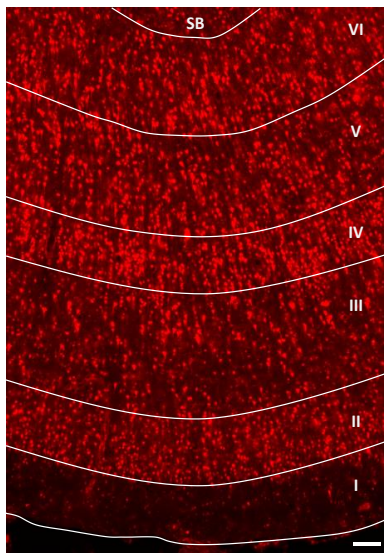


Figura D.64. El marcaje de las proteínas neuronales HuC/HuD permite definir las seis capas corticales. Imagen del marcaje HuC/HuD del ciclo 6 de una sección perteneciente a un paciente de Alzheimer, en la que se han señalado las seis capas corticales (I-VI) y la sustancia blanca (SB). Barra de escala: 100 μ m.

Una vez obtenidas las imágenes, se alinean por la señal de DAPI y/o de GFAP, incluidas en todos los ciclos, empleando el módulo de alineamiento del software cellSens (Figura D.67). Posteriormente, estas imágenes se convierten a formato .tif, empleando el programa añadido o *plugin OlympusImageJ* del programa ImageJ/FIJI. Utilizando este programa, recortamos la imagen de forma irregular, creando una nueva que incluye únicamente una capa de la corteza. Además, se elimina cualquier artefacto que pueda interferir en el análisis posterior. Tras este procedimiento, obtenemos un total de 6 imágenes por cada muestra (área media = 1,521 mm²), cada una de ellas incluyendo 17 marcadores (16 anticuerpos + DAPI).



4.4. Preprocesamiento y análisis de datos

Actualmente, estamos desarrollando y optimizando el preprocesamiento y análisis de los datos obtenidos de estas imágenes en colaboración con Ayush Noori. Para ello, empleamos el entorno y lenguaje de programación de dominio público R (versión 3.6.0) y el programa ImageJ/FIJI. De forma breve, delimitamos el área ocupada por microglía y astrocitos empleando los marcadores IBA1 y ALDH1L1, respectivamente. Posteriormente, cuantificamos el nivel de expresión proteica mediante la intensidad media de cada marcador en el interior de las células individuales. Además, calculamos la distancia entre las células gliales y los bordes de las placas de A β más cercanas. Para ello, empleamos los centros de masa (coordenadas X e Y) de los núcleos DAPI+ de microglía y astrocitos y de las partículas A β +. En esta aproximación consideramos que las placas son circulares, calculando así el radio (r) como $r = \sqrt{A/\pi}$, donde A es el área de la placa medida con ImageJ/FIJI. De esta forma, podemos sustraer el radio del centro de masas XY de la placa y calcular así la distancia hasta el borde.

Tras la obtención de los datos, empleamos técnicas no supervisadas para clasificar a las células gliales en diferentes fenotipos (estados) o subpoblaciones. En primer lugar, detectamos el número de subpoblaciones o estados de microglía y astrocitos mediante *Weighted Co-Expression Network Analysis* o WCNA, una técnica de reducción de dimensiones múltiples no supervisada basada en la identificación de genes o marcadores con una correlación alta de sus niveles de expresión (Langfelder y Horvath, 2008). El número de módulos resultante del WCNA se aplica a la clusterización espectral, otra técnica de reducción de dimensiones múltiples no supervisada basada en la similitud relativa entre cada pareja de datos, en este caso, la intensidad media de cada marcador en cada pareja de astrocitos o células microgliales analizadas. Además, estudiamos si estas subpoblaciones o estados se ven influidos por parámetros conocidos, como la EA, el genotipo APOE, la distancia a placa más cercana o la capa cortical. También estamos trabajando para desarrollar y aplicar herramientas de aprendizaje automático o *Machine Learning* con el fin de predecir la clasificación de astrocitos y microglía como control o Alzheimer en función de los niveles de expresión de los diferentes marcadores estudiados.

Por tanto, aunque este proyecto aún se encuentra en una etapa preliminar, esperamos obtener una información muy valiosa para caracterizar las diferentes subpoblaciones o estados de células gliales y su alteración en presencia de la patología de Alzheimer.



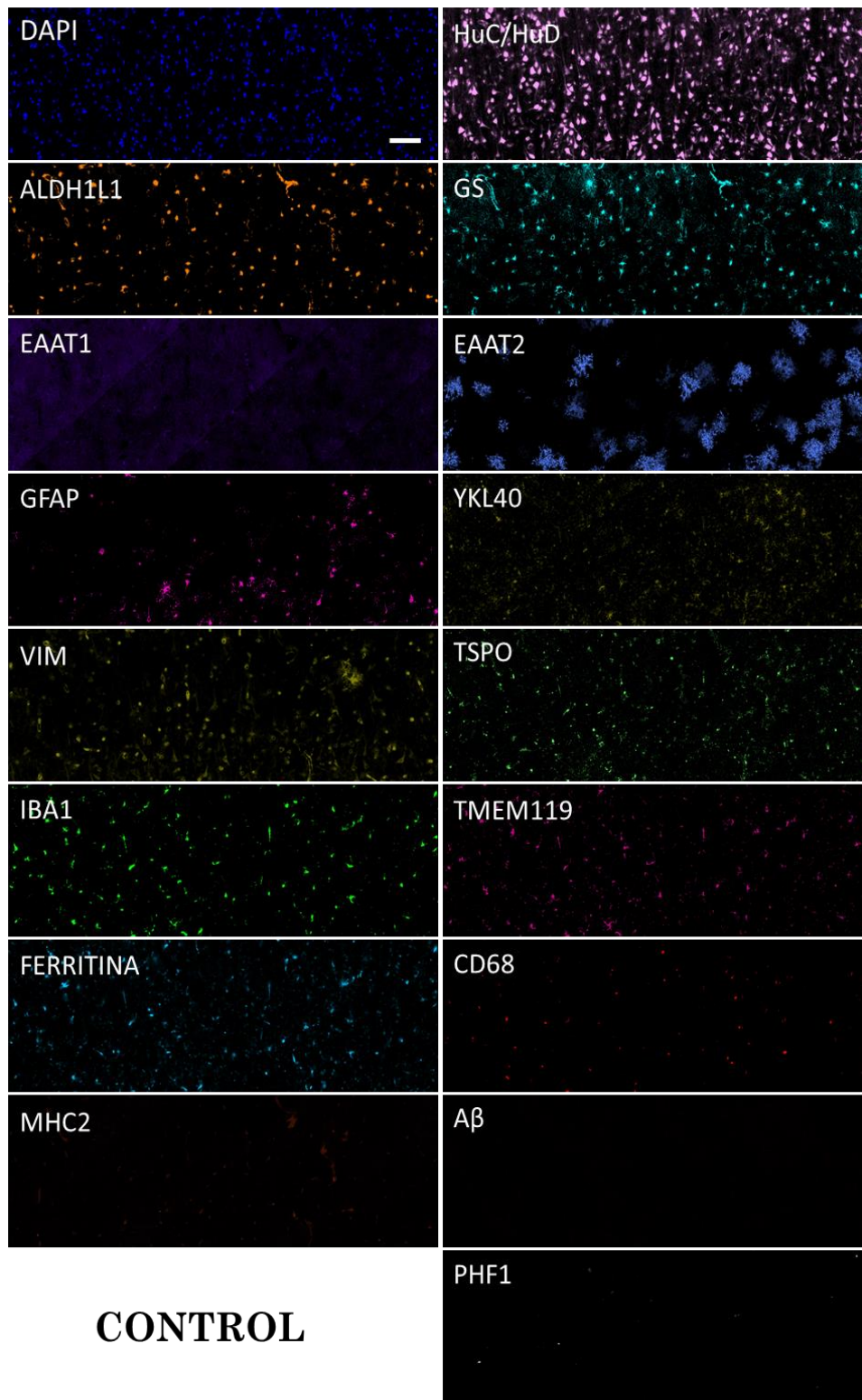


Figura D.65. Imágenes representativas de los 17 marcadores analizados en una misma zona de la capa V de la corteza temporal de un individuo control. Barra de escala: 100 μ m.



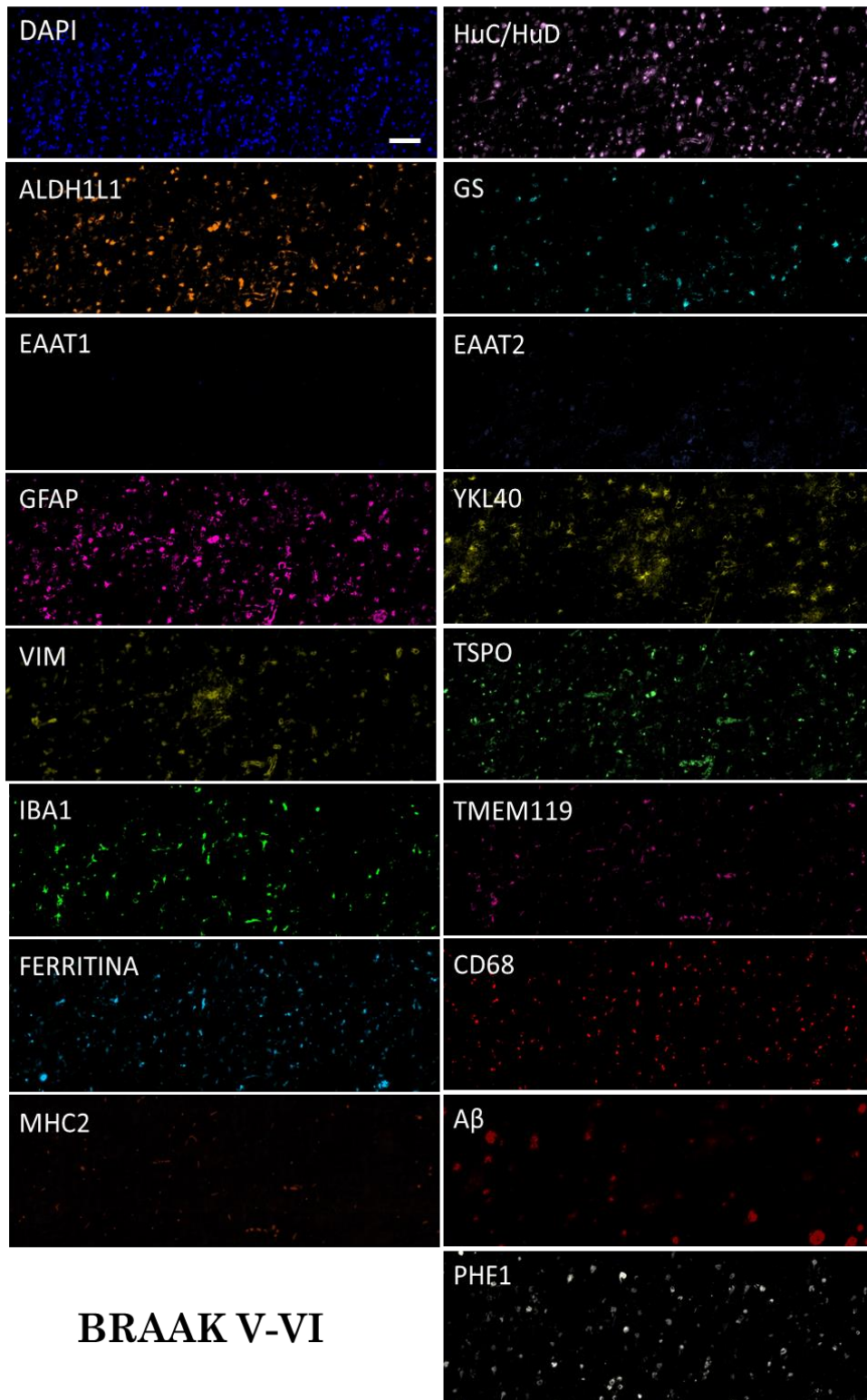


Figura D.66. Imágenes representativas de los 17 marcadores analizados en una misma zona de la capa V de la corteza temporal de un paciente de EA. Barra de escala: 100 μ m.



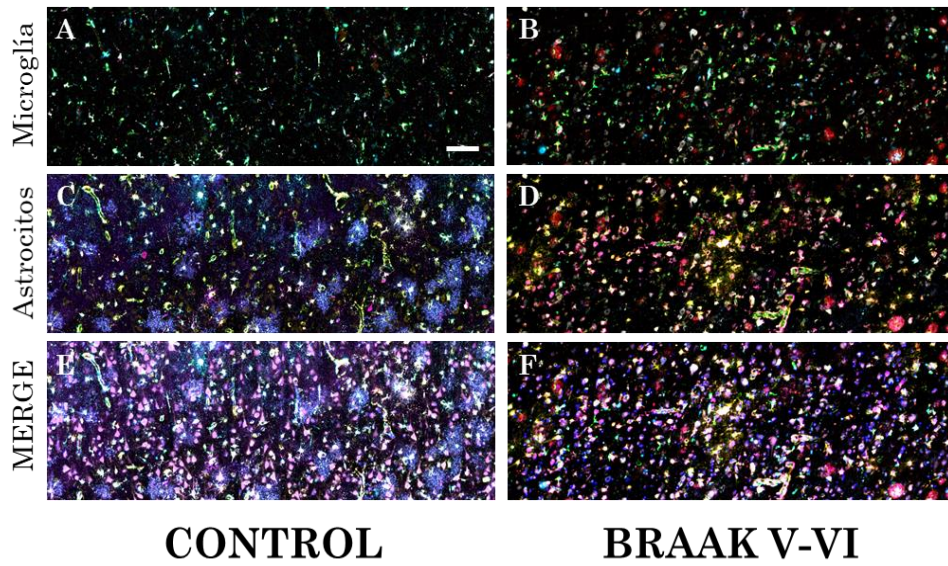


Figura D.67. Imágenes obtenidas tras el alineamiento de marcadores en la capa V de la corteza temporal de un individuo control y un paciente de Alzheimer. Se muestra la imagen resultante de alinear (A-B) IBA1, TMEM119, FERRITINA, CD68, MHC2, TSPO, A β y PHF1; (C-D) ALDH1L1, GS, EAAT1, EAAT2, GFAP, YKL40, VIM, TSPO, A β y PHF1; (E-F) los 17 marcadores analizados en este trabajo y mostrados en las figuras D.65 y D.66, manteniendo el código de color, en un individuo control y paciente de Alzheimer. Barra de escala: 100 μ m.



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



E. DISCUSIÓN

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

La enfermedad de Alzheimer es un proceso neurodegenerativo caracterizado principalmente por la presencia de depósitos amiloides y agregados de la proteína Tau hiperfosforilada. El impacto sociosanitario que supone exige una terapia eficaz urgente para evitar en los próximos años un problema más grave de salud mundial. Tras el fracaso terapéutico obtenido hasta la fecha, basado principalmente en las patologías A β y Tau (Muñoz-Castro et al., 2020), está cobrando importancia en los últimos años la hipótesis de que la respuesta inmune, mediada principalmente por microglía y astrocitos, desempeña un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad (Heneka et al., 2015). Debido a la elevada complejidad del sistema inmune en el SNC y a las múltiples interacciones entre los tipos celulares que lo modulan (ver Introducción, Apartado 3), se requiere un análisis en profundidad para entender su papel en la EA. En este sentido, en el presente proyecto planteamos que la progresión de la patología está asociada a una disfunción y aumento de toxicidad de las células gliales, que contribuiría a la neurodegeneración típica de la EA, y a la infiltración de células inmunes periféricas en el SNC.

Durante el desarrollo de este trabajo nos hemos encontrado con una serie de **limitaciones** derivadas del uso de muestras humanas *post mortem* congeladas. Un primer inconveniente es que no hemos podido realizar estudios en célula única. Para paliar esta limitación, hemos seleccionado múltiples genes específicos de cada población celular, con el fin de caracterizarlas de manera precisa. Otra restricción importante ha sido el pequeño e insuficiente tamaño muestral empleado en algunos de los aspectos estudiados, que es el único que hemos tenido disponible. En este sentido, la elevada heterogeneidad interindividual hace necesario un alto número de individuos para poder obtener resultados concluyentes. A la variabilidad intrínseca de cada persona, hay que sumar el hecho de que las muestras usadas son pequeñas biopsias de una estructura cerebral completa (hipocampo y corteza frontal), y, por tanto, no son homogéneas entre sí ni representativas de la totalidad de la estructura. Además, el tiempo transcurrido entre el fallecimiento de la persona y la toma de la muestra ha sido variable. Hay que tener en cuenta que, dependiendo del mismo y de las condiciones de extracción, que tampoco han sido homogéneas porque las muestras usadas proceden de diferentes bancos de tejidos, se puede generar estrés en el tejido, y como consecuencia liberarse masivamente ciertas moléculas que podrían afectar a nuestros resultados.

Otro problema es que no conocemos la historia clínica de cada individuo, si padece otras patologías (diabetes, hipercolesterolemia, enfermedad cerebrovascular, etc.), o está sometido a algún tratamiento farmacológico que pudieran alterar los parámetros analizados, entre ellos de los marcadores inflamatorios. En este sentido, hubiera sido de gran valor para nuestro estudio conocer en los pacientes de Alzheimer la historia evolutiva del declive cognitivo (edad de inicio, diagnóstico y muerte, resultado del examen del estado mental (MMSE; del inglés, *Mini-Mental State Examination*), clasificación en la escala de demencia clínica (CDR; del inglés, *Clinical Dementia Rating*), etc.). La única característica neuropatológica disponible en todas las muestras empleadas ha sido el estadio Braak, razón por la que hemos clasificado a los individuos en base a este criterio. También hubiera sido de utilidad conocer en cada individuo los polimorfismos de los genes de riesgo asociados al



Alzheimer esporádico. Toda esta esta información habría sido muy útil para interpretar, agrupar o evaluar con mayor precisión los resultados obtenidos, especialmente cuando son muy heterogéneos dentro de un mismo grupo.

A pesar de todas estas limitaciones, el empleo de muestras humanas es, sin lugar a duda, de tremendo valor para el entendimiento veraz de la patología de Alzheimer, debido a la ausencia de modelos animales capaces de reproducir de forma adecuada los rasgos patológicos de la enfermedad. De hecho, los datos obtenidos en este trabajo son de gran utilidad para dilucidar el papel real de las células inmunes y gliales en esta patología y, en consecuencia, poder dar respuestas al continuo fallo de traslación de los estudios en modelos a la clínica humana.



1. PATOLOGÍA AMILOIDE, NEUROFIBRILAR Y NEURODEGENERACIÓN GABAÉRGICA EN LA CORTEZA FRONTAL Y EL HIPOCAMPO DE PACIENTES DE ALZHEIMER

En los últimos años nuestro laboratorio ha caracterizado los principales rasgos patológicos de la EA en muestras de hipocampo en diferentes estadios Braak. Sin embargo, en la EA existe una elevada heterogeneidad regional en los niveles de A β y Tau hiperfosforilada (Braak y Braak, 1991; Jucker y Walker, 2011), por lo que estudiamos ambas patologías en muestras de corteza frontal de controles y pacientes de EA, con el fin de relacionarlas posteriormente con otros aspectos asociados a la enfermedad. Nuestros resultados muestran que la corteza frontal de pacientes de Alzheimer se caracteriza principalmente por una acumulación importante de A β , aunque también presenta patología neurofibrilar. Además, al igual que en el hipocampo, se produce una degeneración de neuronas PV+.

Los niveles de A β monomérico en corteza frontal aumentan significativamente desde el estadio Braak III-IV, alcanzándose desde entonces valores muy superiores a los del hipocampo. En consonancia, el número de placas en corteza frontal es mayor (Katzman et al., 1988), y comienza en estadios previos (Jucker y Walker, 2011) que en el hipocampo.

Además, nuestros resultados reflejan que los niveles de A β son más elevados en los pacientes con al menos un alelo APOE ϵ 4, principal factor de riesgo de la EA esporádica. Se ha propuesto que este alelo promueve la acumulación temprana de A β , aumenta su agregación y disminuye su aclaramiento (Liu et al., 2017b), lo que puede originar la mayor acumulación de A β en este grupo de enfermos, en consonancia con lo publicado en estudios previos (Schmechel et al., 1993; Hyman et al., 1995; Polvikoski et al., 1995; Gomez-Isla et al., 1996b; McNamara et al., 1998).

Al mismo tiempo, esta concordancia sugiere que nuestra cuantificación de A β monomérico, a pesar de sus importantes limitaciones, puede ser un buen reflejo de la carga de A β total de cada individuo, aunque posiblemente no de las formas tóxicas y/o proinflamatorias. Hay que aclarar que hemos realizado la cuantificación de A β monomérico en condiciones desnaturalizantes, por lo que probablemente gran parte proceda de las placas extracelulares (Jimenez et al., 2014). Ya que las especies solubles de A β , y no las placas, parecen ser las principales responsables de la neurodegeneración y de la respuesta inflamatoria (Ricciarelli et al., 2017; Cline et al., 2018), resulta lógico que no encontremos, en hipocampo ni en corteza frontal, una clara correlación entre los niveles de A β monomérico y la neurodegeneración GABAérgica, los diferentes fenotipos microgliales y astrogiales, y el grado de infiltración de CDM. Este hecho también permite explicar que, en la corteza frontal de individuos Braak III-IV, con una acumulación muy importante de A β monomérico, no se produzca activación microglial y astrogial. Para aclarar estas cuestiones, sería necesario un estudio detallado de las diferentes formas de A β , principalmente de las solubles no asociadas a placas, aunque también sería interesante caracterizar los tipos de placas seniles, ya que podrían presentar diferente toxicidad (Perez-Nievas



et al., 2013). Por tanto, aunque somos conscientes de que nuestra metodología no es la más adecuada, es inherente al procesamiento de nuestras muestras y resulta de gran utilidad como una primera aproximación a la patología amiloide.

Nuestros datos, aunque también son preliminares, muestran que con el avance de la EA se produce en la corteza frontal un aumento en los niveles de **Tau** agregado y de diferentes formas fosforiladas del mismo, aunque no varían los niveles de Tau monomérico. Ya que la acumulación de Tau hiperfosforilado comienza antes en el hipocampo que en la corteza frontal (Braak y Braak, 1991), parece controvertido que los niveles no sean claramente diferentes en ambas regiones cerebrales, como ocurre con la patología amiloide. Hay que tener en cuenta que nuestro estudio, además de ser preliminar, cuantifica los niveles de Tau en Braak V-VI, tras años de depósito de dicha proteína, lo que no excluye que existan diferencias en estadios intermedios. Por tanto, resulta esencial continuar con estos estudios, incluyendo individuos en estadios de Braak anteriores.

De forma similar que con la patología amiloide, la cuantificación de los niveles agregados y fosforilados de Tau también presenta limitaciones asociadas a la metodología. Aunque los ovillos neurofibrilares formados a partir de la agregación de Tau hiperfosforilado son resistentes a SDS-urea, no hemos sido capaces de distinguir distintas formas de agregación, que podrían mediar efectos diferentes (Lasagna-Reeves et al., 2014). Por otra parte, únicamente analizamos las formas fosforiladas de Tau reconocidas por los anticuerpos AT8, AT100 o AT180, por lo que nuestros resultados no reflejan todas las posibles formas existentes. Además, durante el intervalo *post mortem* se ha descrito una pérdida de fosforilación (Ferrer et al., 2007), que podría hacer que se subestimen los niveles reales de Tau fosforilado. A pesar de estas limitaciones, otros autores emplean una metodología similar, y encuentran buena correlación entre los marcadores de Tau oligomérico fosforilado y la alteración cognitiva (Koss et al., 2016). Por tanto, pensamos que, a pesar de las limitaciones descritas, esta cuantificación puede ser una buena herramienta para aproximarse a la patología neurofibrilar en nuestras muestras.

En conjunto, nuestros resultados revelan que en la corteza frontal de pacientes de EA existe mayor patología amiloide que neurofibrilar, al contrario que en el hipocampo (Navarro, 2015), lo que podría determinar las diferencias regionales en otros aspectos patológicos, como la neurodegeneración o la respuesta glial.

Respecto a la **neurodegeneración**, nuestro laboratorio ha descrito una temprana e importante pérdida de interneuronas PV+ tanto en hipocampo (Navarro, 2015) como en corteza entorrinal (Mikkonen et al., 1999; Sanchez-Mejias et al., 2020) de pacientes de EA. Estas dos regiones se caracterizan por una patología neurofibrilar temprana, y por ser las primeras afectadas por una pérdida neuronal del 60-80%, que se manifiesta desde estadios intermedios en la corteza entorrinal (Gomez-Isla et al., 1996a) y en etapas más avanzadas en el hipocampo (West et al., 1994; von Gunten et al., 2006). Parece que las interneuronas PV+ no se afectan en modelos animales amiloidogénicos (Ramos et al., 2006; Moreno-Gonzalez et al., 2009; Trujillo-Estrada et al., 2014; Sanchez-Mejias et al., 2020), aunque existen discrepancias al respecto (Takahashi et al., 2010; Cattaud et al., 2018; Ali et al.,



2019). Tampoco existen distrofias PV+ en la proximidad de las placas amiloides de los enfermos de Alzheimer (Sanchez-Mejias et al., 2020), lo que sugiere que esta población es resistente a los efectos del A β . Sin embargo, las neuronas PV+ parecen sensibles a la patología Tau, ya que degeneran en modelos animales de taupatía (Levenga et al., 2013) y de patología mixta A β y Tau (Zallo et al., 2018). En este sentido, cuando tratamos cultivos de neuronas primarios con neurosinaptosomas (NS) de modelos TAU (pero no de modelos APP y WT) se produce muerte selectiva de neuronas PV+ sin que se afecte la población neuronal total. Por tanto, postulamos que la degeneración de estas interneuronas GABAérgicas está mediada por formas tóxicas de Tau.

Aunque pueda resultar contradictorio el hecho de que la pérdida de interneuronas PV+ ocurra también en la corteza frontal de pacientes de EA, caracterizada por una importante patología amiloide, no podemos olvidar que en esta región también existe patología neurofibrilar, que podría ser la causa de dicho efecto.

La degeneración de neuronas PV+ en hipocampo no correlaciona ni con A β ni con las formas fosforiladas de Tau (este trabajo; Ali et al., 2019), lo que indica que podría estar mediada por otros factores, como la reactividad astrogliar (con activación de la respuesta del complemento) o la infiltración de CDM, con los que presenta una buena correlación. Sin embargo, considerando (i) que los neurosinaptosomas de modelos TAU producen muerte selectiva y directa de esta población neuronal y (ii) las limitaciones previamente mencionadas para caracterizar las distintas formas patológicas de Tau, no podemos descartar que la pérdida de neuronas de PV+ esté directamente mediada por formas tóxicas de Tau, y que su correlación con la reactividad astrogliar e infiltración de CDM indique simplemente que estos procesos ocurren simultáneamente en individuos con patología muy exacerbada, aunque no exista una relación directa causa-efecto. En cualquier caso, es probable que la degeneración de estas interneuronas se deba al efecto simultáneo de varios factores, entre los que destacamos la patología neurofibrilar y el sistema del complemento.

Independientemente del origen, nuestros resultados en corteza frontal e hipocampo, junto con los procedentes de estudios inmunohistoquímicos previos (Arai et al., 1987; Satoh et al., 1991; Brady y Mufson, 1997; Mikkonen et al., 1999; Takahashi et al., 2010; Sanchez-Mejias et al., 2020), muestran una muerte de neuronas PV+ en pacientes de Alzheimer. Ya que las neuronas PV+ son las principales interneuronas GABAérgicas en el neocórtex (Tremblay et al., 2016), su disfunción contribuiría de forma importante a la alteración cognitiva de los pacientes de EA (Palop y Mucke, 2016).

En conclusión, en este trabajo hemos realizado una caracterización preliminar de los principales rasgos neuropatológicos en la corteza frontal de pacientes de Alzheimer, que, aunque deben ser validados mediante técnicas inmunohistoquímicas, nos permiten obtener una visión global de la patología de cada individuo. En general, estos resultados reflejan que en la corteza frontal se produce una acumulación de A β más intensa y temprana que en el hipocampo. Además, ambas regiones presentan degeneración de neuronas PV+, que podría estar mediada por la patología Tau.



2. RESPUESTA ASTROGLIAL EN LA PATOLOGÍA DE ALZHEIMER

Los astrocitos son mediadores activos de la respuesta inmune del SNC desarrollando un importante papel en la neuroinflamación (Liu et al., 2014; Colombo y Farina, 2016; Liddeloy y Barres, 2017). Además, desarrollan múltiples y variadas funciones indispensables para el correcto mantenimiento y la homeostasis del SNC (Vasile et al., 2017; Liddeloy y Barres, 2017; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). En condiciones fisiológicas, proporcionan soporte metabólico y estructural a las neuronas (Li et al., 2019b), participan en la formación, maduración, función y eliminación de las sinapsis (Chung et al., 2015; Vasile et al., 2017), forman parte de la BHE (Broux et al., 2015; Li et al., 2019b), intervienen en la homeostasis energética y en el mantenimiento del pH y del equilibrio hidro-salino del parénquima cerebral (Covelo y Areque, 2016; Rodríguez-Arellano et al., 2016; Zulfiqar et al., 2019).

Sin embargo, una deficiencia o alteración de estas funciones astrogliales podría desencadenar o empeorar la patología asociada a la EA. En este sentido, nuestro grupo de trabajo ha analizado en los últimos años la respuesta astrocitaria en modelos animales de EA, que se caracteriza por aumento de reactividad astrogliar y del sistema del complemento, disminución de la capacidad fagocítica, hipometabolismo y pérdida de soporte neuronal (Gomez-Arboledas et al., 2018; Sanchez-Mico, 2019; Sanchez-Mico et al., 2020; manuscrito aceptado para publicación). En este trabajo, hemos comprobado que en muestras humanas de EA la firma molecular astrogliar también corresponde a un perfil transcripcional reactivo e hipometabólico, con una importante respuesta del sistema del complemento. Además, hemos analizado sus causas, efectos y asociación con otros aspectos de la EA.

2.1. Reactividad astrogliar

Tanto en el hipocampo de modelos animales con patología amiloidea y Tau, como en el de pacientes de Alzheimer, se produce una importante **reactividad astrogliar**, clásicamente caracterizada por un aumento en la expresión de GFAP y VIM (Jimenez et al., 2008; Verkhratsky et al. 2010; Fu y Jhamandas, 2014, Osborn et al., 2016; Sanchez-Mico, 2019). Con el fin de profundizar en el papel de la activación de los astrocitos en el desarrollo de la EA, hemos realizado análisis de correlación entre los distintos marcadores astrogliales analizados, comprobando que, en el hipocampo de enfermos de Alzheimer, no existe correlación entre los marcadores de activación GFAP y VIM con el resto de marcadores (ALDH1L1, S100 β y AQP-4), lo que probablemente refleje la coexistencia de múltiples fenotipos astrogliales. Para analizar en mayor profundidad este hecho, en un futuro pretendemos realizar experimentos de inmunohistoquímica fluorescente múltiple, técnica desarrollada en este trabajo de Tesis.

Aunque se ha descrito un aumento de S100 β con la progresión de la EA tanto en muestras de cerebro (Marshak et al., 1992; Van Eldik y Griffin, 1994) como en LCR (Peskind et al., 2001; Petzold et al., 2003), nuestros resultados al respecto no



revelan cambios en los distintos estadios Braak, en concordancia con lo descrito por Simpson et al. (2010) a nivel proteico. S100 β también se expresa en oligodendrocitos, células endoteliales, linfocitos y algunas neuronas (Steiner et al., 2007), por lo que nuestros datos, obtenidos a partir de tejido hipocampal total, podrían enmascarar los valores correspondientes a los propios astrocitos.

En las muestras de hipocampo analizadas la expresión de AQP-4 tampoco se modifica con el avance de la patología, al igual que ocurre a nivel proteico (Rodríguez et al., 2006; Pérez et al., 2007). Diversos autores han reportado una alteración en la inmunoreactividad perivascular de AQP-4 asociada a las placas y a la angiopatía amiloide cerebral en modelos y pacientes de EA (Wilcock et al., 2009; Hoshi et al., 2012; Hubbard et al., 2018), lo que probablemente produzca deslocalización de AQP-4 en los astrocitos (Zeppenfeld et al., 2017; Hubbard et al., 2018).

Por tanto, concluimos que, entre los genes estudiados, GFAP y VIM son los marcadores que mejor representan a la población total de astrocitos reactivos, y utilizamos su *gene set score* para analizar la correlación entre diversos aspectos patológicos de la EA y la reactividad astrogliar.

En primer lugar, analizamos el efecto del genotipo APOE, principal factor de riesgo genético del Alzheimer esporádico, expresado mayoritariamente por astrocitos y microglía. Nuestros resultados, aunque se han obtenido en un número de muestras limitado, muestran tendencia a una mayor reactividad astrogliar en el hipocampo, pero no en la corteza frontal, de pacientes de Alzheimer con al menos un alelo $\epsilon 4$. Aunque nuestros datos podrían sugerir un efecto diferencial de APOE en hipocampo y corteza frontal, el número de muestras que hemos usado no es el suficiente para obtener conclusiones fiables, especialmente considerando la gran variabilidad interindividual de las muestras humanas. En la bibliografía previa existen importantes discrepancias respecto a la relación entre el genotipo APOE y la reactividad astrogliar. Varios estudios sugieren que la respuesta de los astrocitos es más perjudicial en presencia del alelo $\epsilon 4$ (Mathur et al., 2015), lo que puede resultar lógico, ya que aumenta el riesgo de padecer EA (Garwood et al., 2017; Fernandez et al., 2019; Yamazaki et al., 2019). El genotipo APOE parece modular, al menos en modelos, el fenotipo y función de los astrocitos (Shi et al., 2017b). De hecho, en modelos *knock-in* para APOE $\epsilon 4$ se produce una mayor reactividad astrogliar en respuesta a un estímulo proinflamatorio (Zhu et al., 2012). Sin embargo, los análisis estereológicos de inmunohistoquímicas en cerebros de Alzheimer no encuentran relación entre APOE $\epsilon 4$ y el número de astrocitos reactivos y totales, la progresión de la reactividad astrogliar y la proximidad entre astrocitos reactivos y placas (revisado en Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). Por tanto, se requiere un análisis en mayor profundidad para concluir el efecto del genotipo APOE sobre los astrocitos en la EA.

Además, nuestros datos muestran que, el *gene set score* de astrocitos reactivos correlaciona sólo parcialmente con la patología amiloidea, y algo mejor con la patología neurofibrilar, en concordancia con otros autores (Ingelsson et al., 2004; Simpson et al., 2010; Serrano-Pozo et al., 2011b). Nuestros resultados no reflejan reactividad astrogliar en los individuos Braak III-IV, ni si quiera en corteza frontal,



caracterizada por una importante acumulación de A β , lo que puede resultar controvertido debido a que los astrocitos reactivos se han descrito alrededor de las placas amiloides (Alzheimer, 1910; Nagele et al., 2003; Verkhratsky et al. 2010; Dossi et al., 2018), donde participan en el aclaramiento y/o producción de A β (Nagele et al., 2003; Verkhratsky et al. 2010; Zhang y Jiang, 2015; Acosta et al. 2017; Gomez-Arboledas et al., 2018; Li et al., 2019b; Sanchez-Mico et al., 2020; manuscrito aceptado para publicación). Sin embargo, otros autores han descrito en tejidos *post mortem* de EA que la progresión de las astrogliosis diverge del depósito amiloide y correlaciona con la patología neurofibrilar y la progresión de la EA (Ingelsson et al., 2004; Simpson et al., 2010; Serrano-Pozo et al., 2011). Incluso se ha propuesto que los astrocitos pueden ser mediadores de la formación de los ovillos neurofibrilares (Liu et al., 2014). Por otra parte, no podemos olvidar las limitaciones ya comentadas referente al método de cuantificación de A β y de Tau, y al carácter *post mortem* de este estudio, que nos dificulta diferenciar las causas de las consecuencias. A pesar de ello, hipotetizamos que la patología amiloide podría participar en el inicio de la astrogliosis, mientras que la patología neurofibrilar podría contribuir a su progresión, paralela a la evolución de la EA.

A día de hoy, a pesar de que la reactividad astrogliar se considera un rasgo típico de la EA (Heneka et al., 2015; Rodríguez-Arellano et al., 2016; Garwood et al., 2017), su función sigue siendo desconocida. Estudios preclínicos en modelos transgénicos han mostrado resultados contradictorios (Tan et al., 2002; Furman et al., 2012; Fernandez et al., 2012; Kraft et al., 2013; Kamphuis et al., 2015; Katsouri et al., 2020). Algunos autores sugieren que los astrocitos reactivos poseen un papel beneficioso, ya que su ausencia dificulta el aclaramiento de A β y potencia la neuroinflamación (Katsouri et al., 2020). En este sentido, se ha descrito que la ablación de GFAP y VIM aumenta la carga amiloide y las distrofias neuríticas (Kraft et al., 2013). Sin embargo, otros autores con el mismo modelo de ablación de astrocitos reactivos describen la inducción de genes de soporte neuronal y no observan diferencias en el área cortical ocupada por placas (Kamphuis et al., 2015). Además, la inhibición o eliminación de calcineurina (Furman et al., 2012; Fernandez et al., 2012) o CD40L (Tan et al., 2002) revierte la formación de placas, lo que refleja que la activación de astrocitos implica un aumento de toxicidad. En este sentido, nuestros resultados demuestran que los individuos con mayor reactividad astrogliar presentan mayor neurodegeneración de neuronas PV+, lo que indica que los astrocitos reactivos podrían contribuir a la patología de Alzheimer, ya sea de forma directa o mediante una pérdida de función protectora. Sin embargo, la reactividad astrogliar también podría ser una consecuencia de la EA avanzada.

Se ha propuesto la existencia de diversidad fenotípica y funcional de los astrocitos reactivos. Más concretamente, se ha identificado un fenotipo dependiente de microglía con características proinflamatorias y neurotóxicas, y otro independiente de microglía con características neuroprotectoras (Zamanian et al., 2012; Liddelow et al., 2017). Aunque muy probablemente esta división en dos fenotipos contrapuestos sea una simplificación y no represente la realidad (Vasile et al., 2017; John Lin et al., 2017; Grubman et al., 2019; Zhou et al., 2020; Batiuk et al., 2020), parece evidente que el término reactivo es insuficiente para definir si los



astrocitos contribuyen a la patología de Alzheimer mediante ganancia o pérdida de función o si, por el contrario, son protectores, o incluso si tienen funciones diversas en función del estado de la patología y su localización. Además, aunque nuestros datos muestren una reactividad astrogliar similar en hipocampo y corteza frontal, es importante considerar la elevada heterogeneidad astrogliar que existe en las distintas regiones cerebrales (Matias et al., 2019).

Para profundizar en la función de los astrocitos en la EA hemos analizado en detalle la **respuesta del complemento**, mediada de manera importante por astrocitos reactivos.

En los últimos años se ha puesto de manifiesto la relevancia de la vía del complemento en la EA y otras enfermedades neurodegenerativas (Hong et al., 2016; Lian et al., 2016; Hajishengallis et al., 2017; Clarke et al., 2018; Druart y Le Magueresse, 2019). En condiciones homeostáticas, la cascada del complemento tiene un rol esencial en la plasticidad cerebral y eliminación de células apoptóticas (Stevens et al., 2007; Stephan et al., 2012; Györfy et al., 2018). El marcaje de estas sinapsis con las proteínas del complemento C1q, C3 y C4, expresadas por astrocitos, microglía y neuronas, activa su fagocitosis por parte de la microglía (Stevens et al., 2007; Schafer et al., 2012; Presumey et al., 2017).

Los resultados presentes en este trabajo muestran que, en el hipocampo y la corteza frontal de pacientes de EA se produce un aumento en la expresión de los genes involucrados en la cascada del complemento C1S, C1R, C3 y C4a-b. Se ha demostrado que un aumento de las proteínas del complemento participa en la destrucción sináptica que conduce a la toxicidad neuronal en las enfermedades neurodegenerativas (Zamanian et al., 2012; Lian et al., 2015; Liddelow et al., 2017; Peterson et al., 2017; Castro-Gomez et al., 2019; Chew y Petretto, 2019), por lo que es lógico que se manifieste antes de los primeros signos de neurodegeneración (Stephan et al., 2012). En este sentido, nuestros resultados muestran niveles intermedios en la expresión de estos genes en el hipocampo de individuos Braak III-IV, pero no en la corteza frontal, donde la neurodegeneración es posterior. Además, existen niveles elevados de proteínas del complemento en el LCR de pacientes de Alzheimer e incluso de individuos presintomáticos con mutaciones de Alzheimer familiar (Ringman et al., 2012). En conjunto, estos datos parecen apoyar un papel temprano del sistema del complemento en el desarrollo de la EA.

El *gene set score* de la respuesta del complemento correlaciona de forma importante con la disminución en la expresión de PV, sugiriendo que esta neurodegeneración podría estar precedida de la eliminación de sinapsis a través del sistema del complemento. Por tanto, postulamos que la degeneración de las neuronas PV+ parece estar mediada por múltiples factores, entre los que destacamos las formas tóxicas de Tau y el sistema del complemento.

Existen distintos factores de riesgo de la EA esporádica relacionados con el sistema del complemento, como la clusterina (APOJ), que entre otras funciones participa en su inhibición, y el receptor CR1 que reconoce a C1q, C3b y C4b (Jun et al., 2010; Brouwers et al., 2012; Pimenova et al., 2018; Hansen et al., 2018; Foster et



al., 2019). También es muy probable que APOE juegue un papel importante en la respuesta del complemento, aunque debido al reducido número de muestras de las que disponemos, el análisis de nuestros resultados no nos ha permitido obtener conclusiones robustas al respecto. En este sentido, ratones *knock-in* para APOE $\epsilon 4$ tienen disminuida la capacidad fagocítica de los astrocitos (Chung et al., 2016) de forma similar a lo que ocurre en la EA (Sanchez-Mico et al., 2020; manuscrito aceptado para publicación). Esta alteración de la capacidad fagocítica va acompañada de una mayor proporción de sinapsis marcada con C1q, que aumenta la vulnerabilidad sináptica a la neurodegeneración (Chung et al., 2016).

Nuestros análisis de correlación de los genes del complemento con microglia y astrocitos, sugieren que los astrocitos reactivos podrían ser los principales responsables del aumento de expresión de los genes implicados en la respuesta del complemento, en concordancia con lo descrito por otros autores en el envejecimiento (Boisvert et al., 2018; Clarke et al., 2018), en modelos amiloidogénicos y en muestras *post mortem* de pacientes de Alzheimer (Lian et al., 2015; Lian et al., 2016; Liddelw et al., 2017). Además, en nuestro laboratorio se ha realizado la caracterización transcriptómica de los astrocitos aislados de ratones APP y TAU y en ambos modelos, pero sobre todo en el APP, se produce una elevada expresión de varios genes del sistema del complemento (Sanchez-Mico, 2019). También se han detectado niveles elevados de factores de la cascada del complemento en exosomas plasmáticos derivados de astrocitos de pacientes de EA (Goeztl et al., 2018).

En este estudio proponemos a la respuesta inflamatoria como desencadenante de la activación de la cascada del complemento, probablemente mediada por la microglía. Previamente en nuestro laboratorio, hemos realizado un estudio transcriptómico de la línea astroglial WJE tratada con fracciones S1 procedentes de ratones PS1 Δ exón9xAPPs, ratones Thy-Tau22 y pacientes de EA (Sanchez-Mico, 2019). Durante este proyecto, también hemos analizado la expresión de genes implicados en la vía del complemento en astrocitos primarios tratados con neurosinaptosomas procedentes de ratones WT, APP y TAU (datos no mostrados). En ambos casos, no se produjeron cambios en la expresión de los genes implicados en la cascada del complemento, a pesar de la presencia de las proteínas A β y Tau. Además, la vía del complemento parece estar implicada en otras enfermedades psiquiátricas y neurodegenerativas (Druart y Le Magueresse, 2019), en las que no existe acumulación de estas proteínas anómalas, pero sí activación microglial y neuroinflamación. Por otra parte, los astrocitos humanos y murinos, en presencia del ambiente inflamatorio asociado a la EA, sintetizan factores del complemento, como C1r, C1s, C2, C3, C4 (Barnum et al., 1992; Gordon et al., 1992; Barnum et al., 1993; Gasque et al., 1993; Gasque et al., 1995a; Walker et al., 1998; Veerhuis et al., 1999), receptores como CR1, CR2, C3aR o C5aR (Gasque et al., 1995b; Gasque et al., 1996; Zamanian et al., 2012), proteínas inhibitoras del complemento, como clusterina o Serping1 (Cordero-Llana et al., 2011; Zamanian et al., 2012), y reguladores de su activación (Lian et al., 2016). Además, las señales secretadas por la microglía activa pueden modificar el fenotipo astroglial hacia un estado neurotóxico capaz de liberar factores del complemento (Liddelw et al., 2017). En conjunto, todos estos datos



reflejan que la neuroinflamación asociada a la EA contribuye a la activación de la cascada del complemento en los astrocitos.

En general, nuestros resultados muestran mayor respuesta del complemento en los individuos con más acumulación de proteínas A β y Tau, aunque no existe una clara correlación de los genes del sistema del complemento con la patología amiloidea y neurofibrilar. Esto podría ser debido a las limitaciones metodológicas previamente mencionadas, ya que diversos autores han descrito la colocalización de diferentes componentes del sistema del complemento con placas seniles y ovillos neurofibrilares (Eikelenboom et al., 1989; McGeer et al., 1989; Veerhuis et al., 1996; Afagh et al., 1996; Webster et al., 1997; Zanjani et al., 2005), que aunque probablemente no produzcan una activación directa del complemento, sí podrían mediar una mayor respuesta neuroinflamatoria.

Por otra parte, también nos planteamos que esta correlación parcial podría relacionarse con el efecto del sistema del complemento sobre las patologías amiloide y/o neurofibrilar. En este sentido, se han descrito importantes discrepancias sobre el papel de la vía del complemento en la acumulación de A β (Wyss-Coray et al., 2002; Fonseca et al., 2004; Maier et al., 2008; Fonseca et al., 2009; Fonseca et al., 2017; Shi et al., 2017a; Czirr et al., 2017). Respecto a la patología Tau, diferentes estudios en modelos animales muestran que la activación del complemento parece exacerbarla (Fonseca et al., 2009; Britschgi et al., 2012; Hansen et al., 2018; Litvinchuk et al., 2018). Por tanto, considerando nuestros datos y la bibliografía previa, no podemos concluir que exista una clara relación causa-consecuencia entre el sistema del complemento y las patologías amiloide y neurofibrilar.

En conjunto, aunque es necesario un mejor entendimiento de las funciones de las proteínas del complemento en la EA, parece claro que los astrocitos reactivos y la microglía cooperan mutuamente mediando mecanismos de neurotoxicidad dependientes del sistema del complemento (Lian et al., 2016; Hansen et al., 2018). Es posible que, incluso antes de la aparición de los síntomas, los astrocitos reactivos liberen proteínas del complemento que medien la fagocitosis de las sinapsis por parte de la microglía y la consecuente neurodegeneración, contribuyendo así a la progresión de la enfermedad de Alzheimer.

2.2. Disfunción metabólica astrogliar

Además de la participación de los astrocitos en la respuesta neuroinflamatoria y del complemento, en este proyecto planteamos que en el contexto patológico de la EA podrían alterarse sus funciones de soporte metabólico neuronal (Valori et al., 2019; Zulfiqar et al., 2019). Los resultados obtenidos indican que, dentro del entorno patológico de la EA, como consecuencia de las formas solubles de A β y/o Tau, los astrocitos sufren un proceso disfuncional, modificando su metabolismo y, probablemente, disminuyendo su capacidad neuroprotectora, lo que podría contribuir a la progresión de la patología.

Tal y como hemos descrito en la introducción, la hipótesis de la lanzadera de lactato astrocito-neurona es el modelo de metabolismo cerebral de la glucosa más



aceptado, aunque todavía controvertido (Yellen, 2018; Dienel, 2019) y, probablemente, sólo represente una de las múltiples vías para cubrir los requerimientos energéticos del SNC (Eraso-Pichot et al., 2018; Deitmer et al., 2019). Aunque aún no está clara la función del metabolismo mitocondrial, los astrocitos median la **supervivencia neuronal** y la integridad sináptica (Pfrieger y Barres, 1997; Aguirre-Rueda et al., 2015; Adamsky et al., 2018), proporcionando nutrientes, antioxidantes y factores tróficos (Bélanger y Magistretti, 2009; Bélanger et al., 2011; Vasile et al., 2017; Liu et al., 2017a), y liberando señales de comunicación directa con las neuronas (Barres, 2008; Clarke y Barres, 2013).

En este sentido, nuestros resultados muestran que los astrocitos *in vitro* producen factores de pequeña masa molecular que protegen y promueven la supervivencia de las neuronas, indicando que los factores protectores son metabolitos y no proteínas complejas. En consonancia con nuestros resultados, la presencia directa de astrocitos, murinos y humanos, o de su medio condicionado en cultivos neuronales favorece la sinaptogénesis y el mantenimiento de las sinapsis (Pfrieger y Barres, 1997; Ullian et al., 2001), y estimula la supervivencia y el crecimiento de las neuronas (Zhang et al., 2016), también en cultivos de tres dimensiones (Fang et al., 2019). Los medios condicionados por astrocitos contienen diferentes señales sinaptogénicas como trombospondinas (Christopherson et al., 2005; Hillen et al., 2018), además de metabolitos como colesterol, que promueven la actividad neuronal y la formación de sinapsis (Goritz et al., 2005; Stevens, 2008). Por tanto, aunque la función del metabolismo astroglial no está totalmente establecida, sí está claro que resulta esencial para el soporte neuronal (Bélanger y Magistretti, 2009; Bélanger et al., 2011; Liu et al., 2017a; Valori et al., 2019; Konttinen et al., 2019).

Sin embargo, estas importantes funciones metabólicas de los astrocitos podrían afectarse en el contexto de la EA. Así se refleja en el perfil transcripcional de los astrocitos procedentes de modelos animales con patología A β y Tau, con disminución en genes de rutas metabólicas centrales. Además, paralelo a la disfunción metabólica, se produce una disminución de genes implicados en procesos de desarrollo y diferenciación del SNC, indicativo de una **menor capacidad protectora de los astrocitos** (este trabajo; Sanchez-Mico, 2019).

En este proyecto hemos sido capaces de reproducir parcialmente *in vitro* estos resultados obtenidos en modelos, ya que hemos demostrado que las fracciones solubles S1 de animales APP producen una importante disminución en la capacidad respiratoria mitocondrial de los astrocitos. Para descartar que esta alteración sea consecuencia de un efecto tóxico, hemos comprobado que la respuesta a oligomicina es adecuada y que no se modifica la cantidad total de proteína ni la acidificación del medio. En cualquier caso, sería interesante corroborar dicha afirmación mediante citometría de flujo. En nuestros experimentos, la respuesta glucolítica de los astrocitos tratados con S1 de animales APP no se afecta en las condiciones ensayadas. Aunque previamente se ha reportado tanto un aumento (Allaman et al., 2010) como una disminución (Parpura-Gill et al., 1997; Soucek et al., 2003; Oksanen et al., 2017) de la utilización de glucosa en astrocitos *in vitro* expuestos a A β , o



derivados de pacientes de EA, estas diferencias probablemente sean debidas a diferencias en las condiciones del tratamiento o de los estados de agregación de A β .

Esta disfunción metabólica parece ser responsable, al menos en parte, de la pérdida de neuroprotección de los astrocitos *in vitro* observada en presencia de formas solubles de A β y Tau. En consonancia con nuestros resultados, se ha descrito una disminución en la viabilidad neuronal como consecuencia de modificaciones en los astrocitos por A β (Allaman et al., 2010) y Tau (Sidoryk-Węgrzynowicz et al., 2017; Laurent et al., 2018; Sidoryk-Węgrzynowicz y Strużyńska, 2019). Además, existen evidencias que demuestran que la activación astrogliar mediada por estas proteínas puede alterar su función moduladora en las sinapsis (Verkhatsky et al., 2010), afectando a la excitotoxicidad mediada por glutamato y a las sinapsis inhibitorias GABAérgicas (Acosta et al., 2017; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018; Ishibashi et al., 2019). Aunque existen discrepancias sobre el efecto de A β en el metabolismo astrogliar (Parpura-Gill et al., 1997; Soucek et al., 2003; Allaman et al., 2010; Oksanen et al., 2017), en general, suele asociarse a una menor producción de ATP, lo que altera los gradientes iónicos y la neurotransmisión y media la disfunción sináptica y la muerte neuronal (Butterfield y Halliwell, 2019; Muraleedharan et al., 2020). Cabe destacar que nuestros experimentos de supervivencia neuronal se han realizado condicionando los astrocitos durante 24 horas, y, que, aunque en este tiempo no se altera la capacidad respiratoria mitocondrial medida por el Seahorse, no podemos descartar que se produzca una reprogramación metabólica más sutil.

En consonancia con nuestros resultados, recientemente se ha postulado que la activación astrocitaria, que acompaña a la EA, podría conllevar una pérdida de funciones protectoras (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). De hecho, la pérdida de las funciones normales astrogliar parece desempeñar un papel importante en las alteraciones neurológicas relacionadas con el envejecimiento (Alarcón-Aguilar et al., 2014; Jiang y Cadenas, 2014; Rodríguez-Arellano et al., 2016). Sin embargo, clásicamente la activación de los astrocitos se ha asociado a una ganancia de función neurotóxica (Zhang y Jiang, 2015; Masgrau et al., 2017). Aunque los astrocitos son capaces de proteger del estrés oxidativo y del ambiente inflamatorio presentes en el cerebro de pacientes de EA (Heneka et al., 2015; Zulfiqar et al., 2019), ciertos estados de activación astrogliar podrían reducir estos efectos beneficiosos e incluso ser perjudiciales (Colombo y Farina, 2016; Liddelow et al., 2017), contribuyendo a la respuesta neuroinflamatoria en la EA (Kaur et al., 2019). De hecho, los astrocitos, en presencia de formas solubles de A β y Tau, muestran un perfil proinflamatorio (Sanchez-Mico, 2019) que podría contribuir a la neurodegeneración (Garwood et al., 2011; Kaur et al., 2019).

Por otra parte, al igual que múltiples autores (Shankar et al., 2007; Crimins et al., 2013; Viola y Klein, 2015; Forner et al., 2017; Jeong, 2017; Litvinchuk et al., 2018; Laurent et al., 2018), en nuestro laboratorio también hemos observado que el tratamiento neuronal directo con las formas solubles de A β y Tau produce alteración neuronal y sináptica (Sanchez-Mico, 2019).

A pesar de estos antecedentes, nuestros resultados también demuestran que la muerte neuronal observada no es consecuencia de un efecto tóxico directo ni del



astrocito, ni de las propias proteínas patológicas A β y Tau. Tal y como demostramos en la sección de resultados, se produce un rescate en la supervivencia neuronal tras suplementar el medio condicionado con B27, descartando así un efecto tóxico directo astrogliar o de las formas solubles de A β y Tau. Estos datos apoyan nuestra hipótesis de que estas proteínas patológicas dan lugar a una disfunción metabólica astrogliar que conlleva una menor producción de metabolitos prosupervivencia.

Además, considerando la capacidad fagocítica de los astrocitos (Ries y Sastre, 2016; Kovacs, 2020), es probable que en las condiciones experimentales empleadas en este trabajo la cantidad de A β y Tau sea muy reducida en los medios condicionados, incluso en los astrocitos tratados con S1 de modelos APP, que a su vez presentan una capacidad fagocítica limitada (Sanchez-Mico et al., 2020; manuscrito aceptado para publicación). En este sentido, Aguirre-Rueda et al. (2015) postulan que los astrocitos protegen a las neuronas de la toxicidad mediada por A β 42. En conjunto, los astrocitos podrían proteger del efecto directo de las formas patológicas de A β y Tau, aunque como consecuencia, disminuirían su capacidad de soporte neuronal.

Por tanto, hipotetizamos que, aunque la disfunción metabólica astrogliar podría promover las patologías amiloides y neurofibrilar (Zulfiqar et al., 2019; Butterfield y Halliwell, 2019), probablemente la consecuencia más importante sea la alteración de la función sináptica y la pérdida de la función neuroprotectora, como ocurre en modelos de EA (Le Douce et al., 2020).

Para confirmar de forma directa la alteración metabólica astrogliar, en este proyecto hemos intentado **evaluar metabólicamente** el estado de los astrocitos aislados de modelos APP en colaboración con la Dra. Coral Barbas (Universidad San Pablo CEU). Para ello, hemos optimizado un método para aislar astrocitos viables en el menor tiempo posible, con el fin de no alterar los metabolitos de estas células ni perder la especificidad del aislamiento. Sin embargo, no hemos podido determinar el perfil metabólico de los astrocitos, probablemente debido al uso del FACS para el aislamiento, que podría producir alteraciones metabólicas (Llufrio et al., 2018; Binek et al., 2019).

A pesar de esta limitación, los datos obtenidos en modelos y en ensayos *in vitro* indican, en conjunto, que tanto la patología amiloide como la neurofibrilar, participan en la alteración del metabolismo astrocitario y, como consecuencia, en la disminución de las funciones neuroprotectoras de estas células. Para confirmar este estudio, esperamos realizar en un futuro próximo un análisis metabólico de los medios condicionados que nos permita identificar directamente los metabolitos afectados en el contexto patológico de la EA.

Sin duda, los estudios *in vitro* y en modelos pueden aportar una información muy valiosa de cómo las patologías amiloide y neurofibrilar afectan a la funcionalidad de los astrocitos en el progreso de la enfermedad. Sin embargo, presentan importantes limitaciones y diferencias con respecto a los astrocitos presentes en el cerebro de enfermos de Alzheimer. Considerando que no es posible obtener células viables y funcionales que nos permitan realizar ensayos de



funcionalidad biológica en nuestras muestras humanas *post mortem*, en este proyecto, decidimos estudiar, como primera aproximación, la expresión de enzimas claves del metabolismo específicas de astrocitos. Nuestros resultados en muestras de hipocampo de **pacientes de Alzheimer** sugieren que, con la progresión de la EA, se produce un cambio en el perfil metabólico astroglial que concuerda con nuestros resultados de estudios *in vitro* y de modelos animales, y con resultados recientemente publicados (Konttinen et al., 2019; Zhou et al., 2020).

La principal fuente de energía del SNC es la glucosa, que es metabolizada principalmente a través de la glucólisis, el ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones (Butterfield y Halliwell, 2019). Centrándonos en la **glucólisis**, nuestros datos muestran una disminución en la expresión de las enzimas reguladoras glucolíticas PFKM y PKM en pacientes Braak V-VI con respecto a estadios previos, lo que podría reflejar una disminución en el flujo glucolítico en los astrocitos en la EA. En este sentido, se han descritos diversas modificaciones del metabolismo glucídico asociadas a la EA, como la menor expresión del transportador de glucosa GLUT1 (Simpson et al., 1994; Merlini et al., 2011) y de diversas enzimas glucolíticas (Blass et al., 2000; Liang et al., 2008), la pérdida de actividad de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de la vía de las pentosas fosfato (Bigl et al., 1999), y diversas oxidaciones en enzimas glucolíticas que disminuyen su actividad (Butterfield y Halliwell, 2019). En conjunto, estos datos implican una disminución en la capacidad glucolítica de los astrocitos, ya sea por una limitación de sustrato o por modificaciones en la expresión o actividad de las enzimas de la vía.

Otros autores han descrito mayor actividad de ciertas enzimas glucolíticas en la EA (Bigl et al., 1999; Soucek et al., 2003), que podría justificarse teniendo en cuenta la heterogeneidad celular del SNC. De manera que, aunque en la EA se produzca una disfunción en la capacidad glucolítica de los astrocitos, el flujo de esta vía se encuentre aumentado en otros tipos celulares como la microglía (Baik et al., 2019; March-Diaz et al., 2020, remitido a publicación).

El hipometabolismo astrocitario parece estar directamente implicado en la disminución en el consumo de glucosa detectado por tomografía por emisión de positrones (PET) en pacientes de EA (Mosconi et al., 2008; Chen y Zhong, 2013; Mosconi et al., 2013; Marcus et al., 2014), que permite el diagnóstico diferencial y temprano de esta patología, ya que se manifiesta antes de la aparición de síntomas (Mosconi et al., 2008; Chen y Zhong, 2013; Mosconi et al., 2013; Marcus et al., 2014). Aunque este hipometabolismo se ha asociado clásicamente a una menor actividad neuronal (Mosconi et al., 2008), se ha demostrado que los astrocitos contribuyen de forma significativa a la señal detectada mediante fluorodesoxiglucosa F-18 (FDG)-PET (Zimmer et al., 2017). De hecho, en consonancia con nuestra hipótesis, Gordon et al. (2018) han demostrado, empleando diferentes técnicas de imagen, que en primer lugar se produce una acumulación de A β , seguida de una disminución en el metabolismo de la glucosa y, por último, un adelgazamiento, como consecuencia de la neurodegeneración, de las áreas cerebrales afectadas en la EA.

Todos estos datos apoyan nuestra hipótesis de que en la EA parece disminuir la capacidad glucolítica de los astrocitos y, en consecuencia, la producción de lactato



necesario para el soporte metabólico neuronal, contribuyendo así a la progresión de la patología.

El **ciclo de Krebs y la cadena de transporte de electrones** representan una importante fuente de energía para el SNC (Butterfield y Halliwell, 2019). A este respecto, nuestros resultados muestran que en pacientes de Alzheimer y en astrocitos aislados de modelos animales de la enfermedad se produce una disminución significativa en la expresión de la enzima astrogliar del ciclo de Krebs IDH3a, lo que refleja una disminución en el flujo del ciclo. En este sentido, se ha descrito recientemente una menor capacidad catabólica en el cerebro de individuos con EA, debido a una bajada en genes del ciclo de Krebs y a modificaciones oxidativas en enzimas como la aconitasa (Butterfield y Halliwell, 2019).

Aunque hubiera sido de gran interés poder estudiar los complejos mitocondriales en los astrocitos de pacientes de EA, el abordaje experimental para ello no nos permite, por el momento, garantizar la especificidad celular. A este respecto, se ha descrito en tejido total de enfermos de Alzheimer la disminución de algunas subunidades de los complejos mitocondriales (Kenney y Bennett, 2019) y oxidaciones en la ATP sintasa (Butterfield y Halliwell, 2019). Debido a la elevada proporción de astrocitos en el SNC, es probable que estas alteraciones mitocondriales descritas en tejido total sean consecuencia, al menos en parte, de la disfunción metabólica astrogliar. Además, las alteraciones en la actividad de enzimas del ciclo de Krebs correlacionan con el deterioro cognitivo en pacientes de Alzheimer (Bubber et al., 2005), lo que apoya nuestra hipótesis de que el hipometabolismo astrogliar parece contribuir a la neurodegeneración. De hecho, recientemente se ha descrito que es indispensable una correcta fosforilación oxidativa en los astrocitos para el mantenimiento de la supervivencia neuronal (Ignatenko et al., 2018; Fiebig et al., 2019).

A pesar de que las reservas de **glucógeno** astrogliar son esenciales para el mantenimiento de los niveles de glucosa en el SNC (Liu et al., 2017a; Bak et al., 2018; Fernandez et al., 2019), nuestros resultados no muestran modificaciones significativas en su metabolismo, ni en muestras de pacientes de EA ni en los estudios de transcriptómica de astrocitos aislados de modelos animales. En estos últimos, aunque se produce una disminución en la expresión de ciertos genes del metabolismo del glucógeno, el proceso metabólico global no se encuentra diferencialmente expresado.

Aunque el principal sustrato energético en el SNC es la glucosa, en condiciones fisiológicas, aproximadamente el 20% de la energía total cerebral procede de la **β -oxidación de ácidos grasos** (Ebert et al., 2003). Los astrocitos, principales mediadores de esta vía metabólica en el cerebro (Eraso-Pichot et al., 2018), son esenciales para mantener la homeostasis lipídica cerebral (Farmer et al., 2019; Konttinen et al., 2019). De hecho, los astrocitos captan las partículas lipídicas liberadas por las neuronas hiperactivas, que contienen ácidos grasos tóxicos para estas, y los metabolizan. Durante este proceso, los astrocitos aumentan la expresión de genes involucrados en el metabolismo energético (Ioannou et al., 2019). En este sentido, nuestros resultados en pacientes de EA muestran un aumento en la



expresión de CPT1A, enzima limitante del transporte de ácidos grasos al interior mitocondrial (Jernberg et al., 2017) que podría reflejar una mayor disponibilidad de ácidos grasos en la mitocondria para la β -oxidación (Konttinen et al., 2019). Algunos autores postulan que cuando la glucólisis se ve comprometida en astrocitos, como sugieren nuestros datos, la β -oxidación adquiere mayor importancia como fuente de energía (Cabodevilla et al., 2013; Konttinen et al., 2019).

En conjunto, nuestros resultados podrían sugerir una reprogramación metabólica de los astrocitos, de un fenotipo glucolítico hacia una mayor contribución de la β -oxidación, que, aunque inicialmente pudiera ser beneficiosa y compensar la deficiencia energética glucolítica, a largo plazo podría ser perjudicial y aumentar el daño oxidativo en las neuronas, tal y como ocurre en modelos de enfermedad de Huntington (Polyzos et al., 2019). De forma que en la EA podría producirse una descoordinación del metabolismo lipídico y oxidativo entre astrocitos y neuronas, que presenta un importante papel protector (Ioannou et al., 2019). En contradicción con esta hipótesis, se ha descrito una disminución de la oxidación de ácidos grasos en astrocitos derivados de células madre pluripotentes inducidas procedentes de pacientes de EA (Konttinen et al., 2019). Además, en los astrocitos aislados de modelos de EA, observamos una disminución en la expresión de varios genes implicados en la β -oxidación de ácidos grasos, incluyendo *Cpt1a*. Aunque parecen existir importantes diferencias en la respuesta astrogial entre modelos y pacientes de EA (Zhou et al., 2020), no podemos conocer el estado real de la β -oxidación de ácidos grasos en astrocitos de enfermos de Alzheimer, ya que hemos analizado un único marcador implicado en el transporte de ácidos grasos al interior mitocondrial. Para tener más información al respecto pretendemos realizar nuevos estudios de Seahorse en astrocitos *in vitro* o recién aislados de modelos de EA, empleando etomoxir para inhibir a Cpt1 (Farmer et al., 2019). Además, realizaremos una modificación de la composición del medio para que la principal fuente energética sean los ácidos grasos, en lugar de la glucosa.

Nuestros resultados, junto con otros existentes en la literatura, podrían sugerir una alteración del metabolismo de los ácidos grasos en la enfermedad de Alzheimer. Se han descrito alteraciones en los niveles de diferentes lípidos y metabolitos de la β -oxidación en sangre (Ciavardelli et al., 2016; Fernandez et al., 2019) y cerebro (Mendis et al., 2016; Snowden et al., 2017) de pacientes de EA. Además, A β y AICD participan en la regulación fisiológica de varias vías metabólicas lipídicas, y a su vez el ambiente lipídico influye en el procesamiento de APP, pudiendo existir una retroalimentación entre ambos procesos que contribuya a la patología de Alzheimer (Grimm et al., 2017). De hecho, una dieta con alto contenido en grasas acelera la patología en modelos de EA (Takeda et al., 2010; Knight et al., 2014; Melo et al., 2020), mientras que la administración de CAD-31, que aumenta el catabolismo de ácidos grasos libres, revierte las deficiencias cognitivas (Daugherty et al., 2017). En conjunto, estos datos sugieren que en la EA también se produce una alteración en el metabolismo de los ácidos grasos, que podría estar relacionada con la patología amiloide y las deficiencias cognitivas, aunque se requiere un estudio en mayor profundidad para aclarar su papel en la patología.



En conjunto, nuestros datos apoyarían una disfunción mitocondrial de los astrocitos en la EA. En este sentido, se ha relacionado una alteración del calcio con la disfunción mitocondrial en neuronas en esta patología (Calvo-Rodriguez et al., 2020a). A día de hoy, esta posible asociación prácticamente no se ha estudiado en los astrocitos, a pesar de que podría dar lugar a potenciales estrategias terapéuticas (Calvo-Rodriguez et al., 2020b).

También se han descrito defectos en el metabolismo del **colesterol** en enfermedades del SNC y en la EA (Di Paolo y Kim, 2011). En este sentido nuestros resultados en el hipocampo de pacientes de EA muestran una disminución en la expresión de la enzima limitante de la síntesis de colesterol HMGCR, mayor que la asociada al envejecimiento (Boisvert et al., 2018), lo que refleja una reducción del flujo de la vía sintética del colesterol.

El colesterol es indispensable para la correcta homeostasis del SNC, participando en la sinaptogénesis (Goritz et al., 2005; Fester et al., 2009), guiado axonal (De Chaves et al., 1997), actividad neuronal (Linetti et al., 2010; Liu et al., 2010), y como componente estructural esencial de membranas celulares y mielina. Debido a la impermeabilidad de la BHE, la síntesis de colesterol se realiza *de novo* en el SNC, principalmente en astrocitos (Zhang y Liu, 2015; Fracassi et al., 2019; Jeong et al., 2019), por lo que una disfunción en el metabolismo astrogliar del colesterol podría tener importantes consecuencias en el SNC. En este sentido, cabe destacar que además de las modificaciones postraduccionales, la expresión de HMGCR se activa transcripcionalmente por SREBP2 (Chang et al., 2017), que se desregula por A β y Tau (Mohamed et al., 2018; Wang et al., 2019). Cuando se elimina la expresión de SREBP2 en astrocitos, se producen alteraciones cerebrales, déficits sociales, de aprendizaje y memoria (Ferris et al., 2017).

Por otra parte, existen evidencias de que con el curso clínico y progresión de la patología se produce un aumento de colesterol en los cerebros de pacientes de EA (Cutler et al., 2004; Xiong et al., 2008). Además, niveles elevados de colesterol en sangre se relacionan con un mayor riesgo de desarrollar esta patología (Pappolla et al., 2003; Solomon et al., 2009; Matsuzaki et al., 2011). De hecho, múltiples estudios indican que un aumento en los niveles de colesterol favorece la producción y agregación de A β (Sun et al., 2015a; Grimm et al., 2017). Sin embargo, también parece que concentraciones elevadas de A β 40 podrían reducir la síntesis de colesterol a través de la inhibición de la actividad de la enzima HMGCR (Grimm et al., 2005). Estos datos muestran una estrecha interacción entre la patología de Alzheimer y los niveles de colesterol y su regulación, en consonancia con nuestra hipótesis de disfunción metabólica astrogliar como consecuencia de la EA.

Existen múltiples estudios acerca del impacto en la EA de las estatinas (fármacos inhibidores de la HMGCR y capaces de atravesar la BHE), con resultados contradictorios. En general, parece que las estatinas podrían ser útiles para la prevención de la patología (Sun et al., 2015a; McGuinness et al., 2016; Chang et al., 2017; Grimm et al., 2017; Chu et al., 2018), aunque la protección podría ser consecuencia del efecto en la vasculatura cerebral y no de la disminución en los niveles de colesterol en el SNC. No podemos olvidar que niveles elevados de colesterol



median la formación de ateromas y la angiopatía amiloide cerebral, provocando una disfunción de la vasculatura cerebral que contribuiría a la patogénesis de la EA (Sun et al., 2015a).

Cabe destacar el importante papel regulador de APOE en el transporte del colesterol y otros lípidos (Liu et al., 2010). En los astrocitos APOE $\epsilon 4$ el transporte lipídico está reducido, y aunque, gracias a mecanismos de compensación, estas células suelen desarrollar funciones normales, con el envejecimiento disminuye la síntesis de colesterol en los mismos (Boisvert et al., 2018), lo que, combinado con el transporte deficiente, culmina en déficits lipídicos neuronales (Fernandez et al., 2019). Incluso individuos APOE $\epsilon 4$ cognitivamente normales presentan alteraciones en el metabolismo de ácidos grasos y carbohidratos similares a los de pacientes de Alzheimer (Farmer et al., 2019).

Por tanto, en la EA también parece existir una alteración en la homeostasis del colesterol, que podría ser consecuencia de la disfunción astrogliar y contribuir a la alteración sináptica y neurodegeneración asociadas a la EA.

La pérdida de funciones neuroprotectoras y alteración de la transmisión sináptica también ha sido asociada al envejecimiento astrogliar *in vitro* (Pertusa et al., 2007; Kawano et al., 2012). Con la edad, los astrocitos pueden volverse **senescentes** o adquirir un fenotipo secretor asociado a senescencia o SASP (del inglés, *Senescence-Associated Secretory Phenotype*) (Bellaver et al., 2017), caracterizado por la disfunción astrogliar y el desarrollo de un estado proinflamatorio (Cohen y Torres, 2019). Los astrocitos SASP secretan diversas proteasas, así como citoquinas proinflamatorias y quimiotácticas (Cohen y Torres, 2019), típicas de los astrocitos reactivos asociados a la EA (Liu et al., 2014; Heneka et al., 2015, Liddelow et al., 2017), tal y como muestran nuestros resultados. En este sentido, en cerebros de pacientes de Alzheimer, se produce un incremento de marcadores característicos del SASP en astrocitos, como CDKN2A (también denominado P16) (Bhat et al., 2012; Turnquist et al., 2016).

El fenotipo astrogliar SASP podría contribuir a la acumulación de A β y ovillos neurofibrilares, a la excitotoxicidad inducida por glutamato, alteración de la plasticidad sináptica y disfunción de la BHE (Han et al., 2020). Además, se caracteriza por una disfunción mitocondrial y disminución en la síntesis de colesterol, reflejada en una menor expresión de genes asociados a la síntesis de colesterol, como HMGCR (Boisvert et al., 2018; Han et al., 2020), tal y como describimos en este trabajo de Tesis doctoral que ocurre en pacientes de EA.

A β 42 podría ser responsable de inducir la senescencia en los astrocitos en la EA (Bhat et al., 2012), aunque también se observan células gliales con fenotipo SASP en modelos de patología Tau (Bussian et al., 2018). De hecho, la eliminación de los astrocitos SASP en dicho modelo previene la gliosis, la hiperfosforilación de Tau y la neurodegeneración cortical e hipocampal, preservando la función cognitiva (Bussian et al., 2018). Recientemente, Habib et al. (2020) han descrito mediante transcriptómica de núcleo individual un fenotipo astrogliar asociado a enfermedad en modelos de la EA, que comienza en estadios tempranos y aumenta con la



progresión de la patología. Dicho fenotipo también se produce con el envejecimiento tanto en ratones WT como en humanos (Habib et al., 2020).

Por tanto, la EA podría agravar los efectos de la edad sobre el fenotipo y función astrogial, contribuyendo así a la propia patología y neurodegeneración.

Por otra parte, también podrían contribuir a la disfunción metabólica astrogial enfermedades involucradas en la **desregulación de la glucosa y/o el metabolismo**. En este sentido, tanto la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), como el síndrome metabólico se asocian a una mayor incidencia de EA (Salas y De Strooper, 2019). También se asocian la resistencia a insulina (íntimamente relacionada con la disfunción mitocondrial), y el comienzo de la EA (Virmani et al., 2015; Butterfield et al., 2019). Ratones con deficiencias en el factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I; del inglés, *insulin-like growth factor I*) recapitulan múltiples comorbilidades asociadas a la EA (Zegarra-Valdivia et al., 2019). Sin embargo, no existe correlación entre la DMT2 y los rasgos neuropatológicos de la EA, como placas y ovillos (Arnold et al., 2018). Además, la administración intranasal de insulina no mejora la función cognitiva de los pacientes de EA (Craft et al., 2020). Es importante destacar que nuestros modelos (APP y TAU) no son obesos (de hecho, presentan un 10% de pérdida de peso con respecto a WT) y tampoco presentan hiperglucemia (Jimenez et al., 2011; Barini et al., 2016), descartando DMT2 periférica. Sin embargo, si es posible que en la EA se produzca, de manera local y restringida a los astrocitos, una reprogramación metabólica típica de la resistencia a insulina (Arnold et al., 2018). De hecho, analizando en profundidad el perfil transcriptómico hipometabólico que se produce en los astrocitos aislados de modelos de EA (Figura E.1), hemos constatado que se asemeja a la disfunción mitocondrial típica de las células musculares en la DMT2 (Cheng et al., 2010). En este sentido, García-Cáceres et al. (2016) constatan el importante papel de la señalización de insulina en los astrocitos para el correcto metabolismo cerebral.

En conjunto, nuestros resultados, obtenidos mediante estudios *in vitro* y en modelos y pacientes de Alzheimer, podrían indicar que los astrocitos sufren un proceso disfuncional que afecta a su metabolismo y que está mediado por las formas solubles de A β y/o Tau. Esta reprogramación metabólica astrogial parece estar asociada, más que a una ganancia de función tóxica, a una disminución en las funciones protectoras de los astrocitos, esenciales para el mantenimiento sináptico y neuronal, y pone de manifiesto la relevancia de un adecuado metabolismo astrogial para la salud del SNC.

Sin embargo, para poder refrendar nuestros datos necesitamos profundizar aún más en el estudio de los astrocitos en la EA. Actualmente, estamos desarrollando una aproximación *ex vivo*, para evaluar la neuroprotección tras el condicionamiento de medios por astrocitos de cortes o *slices* de cerebro de ratones WT, APP y TAU (Henrik et al., 2019; Ravi et al., 2019). En estos cortes podemos eliminar la microglía sin alterar los astrocitos con liposomas de clodronato, lo que permitiría realizar un estudio metabólico en astrocitos *ex vivo*, sin interferencias microgliales. Otra aproximación posible sería realizar un estudio metabólico mediante espectroscopía de protones por resonancia magnética de alta resolución en ángulo



mágico (HR-MAS RMN, del inglés *High Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance*) utilizando cerebros intactos de animales recién sacrificados. Aunque esta técnica tiene como limitación el escaso número de metabolitos detectados y su escasa resolución morfológica, puede ofrecer una idea directa de las deficiencias metabólicas en los modelos. De hecho, en un estudio preliminar, realizado en colaboración con la Dra. Antonia Gutiérrez, observamos ciertas diferencias en el metabolismo de aminoácidos entre animales WT y APP^{751SL}/PS1^{M146L} (datos no mostrados), aunque necesitamos analizar más muestras para obtener conclusiones fiables y robustas. También planteamos estimar la capacidad de respiración mitocondrial midiendo, por Seahorse, el consumo de O₂ de los astrocitos recién aislados de modelos de EA (Acin-Perez et al., 2020). Esta aproximación podría ser complementada mediante cuantificación en astrocitos aislados, de los complejos respiratorios por western blot y/o su actividad enzimática (Polyzos et al., 2019).

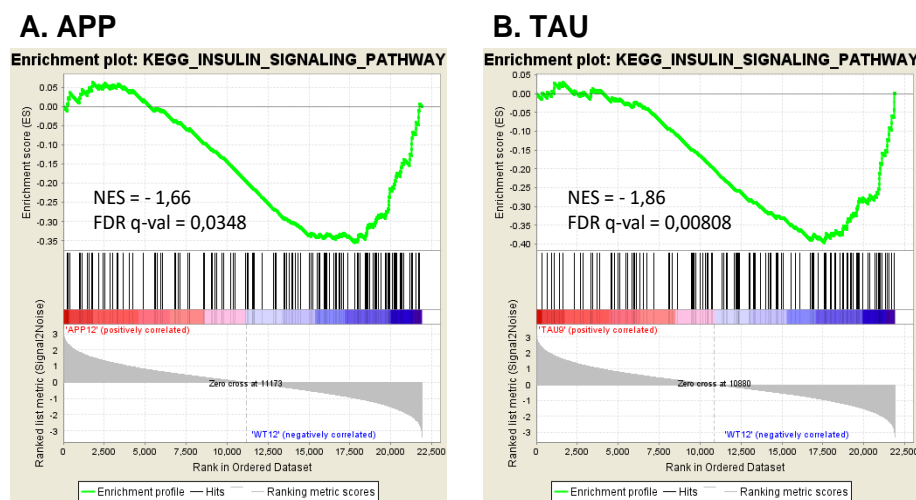


Figura E.1. Disminución en la vía de señalización de la insulina en astrocitos aislados de modelos murinos de la EA. Representación gráfica de la ruta KEGG de señalización de la insulina enriquecida en los astrocitos aislados de ratones WT de 12 meses, respecto a los aislados de ratones (A) APP (12 meses) y (B) TAU P301S (9 meses). NES: factor de enriquecimiento normalizado; FDR q-val: “false discovery rate” (valor de p-value ajustado). Experimento realizado de forma previa en nuestro laboratorio por la Dra. María V. Sánchez Micó.

Para profundizar en el estudio del metabolismo de los astrocitos en pacientes de EA, también planteamos estudiar la expresión de genes adicionales implicados en la glucólisis (ALDOC), el ciclo de Krebs (MDH1B), la β -oxidación (ACAA2, HADHB), el metabolismo de ácidos grasos (ACSS1, ACSL6) y colesterol (SEC14L2), los destinos metabólicos del piruvato (PDK2) y el transporte de moléculas (SLC1A4, SLC25A18, SLC25A20, SLC25A33, SLC7A10, SLC7A2), entre otros.



2.3. Interacción entre astrocitos y microglía

Existen numerosas evidencias de la estrecha interacción entre astrocitos y microglía en la EA, no sólo por la co-localización de ambos tipos celulares activos rodeando las placas seniles, sino también, por su correlación directa con la progresión de la enfermedad (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). Las citoquinas y otros factores liberados por la microglía pueden modificar el fenotipo astrogliar y viceversa (Lian et al., 2016; Liddel et al., 2017; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018; Vainchtein y Molofsky, 2020), por lo que esta interacción/comunicación resulta esencial para la correcta función neuronal (Jha et al., 2019). En este sentido, Liddel et al. (2017) demuestran que los factores liberados por la microglía tras su estimulación con LPS inducen en los astrocitos un fenotipo con menor capacidad de soporte sináptico y neuronal.

Tal y como hemos indicado previamente, los astrocitos y la microglía cooperan mutuamente mediando mecanismos de neurotoxicidad dependientes del sistema del complemento (Lian et al., 2016; Hansen et al., 2018). Por una parte, en el contexto patológico de la EA, los astrocitos pueden secretar factores del complemento que interaccionan con receptores microgliales, activando la fagocitosis de sinapsis (Presumey et al., 2017) y alterando la capacidad fagocítica de A β (Lian et al., 2016). Además, las señales secretadas por la microglía activa pueden modificar el fenotipo astrogliar hacia un estado neurotóxico capaz de liberar factores del complemento (Liddel et al., 2017). Por tanto, la activación microglial asociada a la EA contribuiría a la activación de la cascada del complemento en los astrocitos, que altera, a su vez, la función y fagocitosis microglial.

Resulta esencial continuar profundizando en la relación microglía-astrocito en el contexto de la patología de Alzheimer. Para ello, proponemos realizar estudios *in vitro* adicionales que nos permitan identificar los fenotipos astrocitarios con mayor toxicidad/protección neuronal y su posible vinculación con la microglía. Los cultivos primarios de astrocitos presentan un 10% de células microgliales, proporción similar a la observada *in vivo* (0.5 - 16.6% de células microgliales) (Mittelbronn et al., 2001). Hemos constatado que tres días de tratamiento con 100 μ g/ml de liposomas de clodronato (Opperman et al., 2019) eliminan prácticamente toda la microglía (99,8%) del cultivo mixto sin afectar a los astrocitos (datos no mostrados). Por tanto, con este abordaje podemos comparar la capacidad metabólica y neuroprotectora de los astrocitos en presencia y ausencia de microglía. Además, podremos evaluar directamente el papel de la microglía sobre los astrocitos utilizando medios condicionados por microglía primaria, así como profundizar en el estudio del fenotipo de estos astrocitos mediante RNA-seq. Este estudio se podría complementar con el análisis metabolómico de los medios condicionados y/o de las células en cultivo. Actualmente también estamos caracterizando en el laboratorio un modelo de depleción de la microglía *Csf1r^{flox/flox} x Cx3cr1^{cre}* con patología amiloide (con mutación adicional APP) o neurofibrilar (con mutación TAU), que también podríamos emplear para el estudio *in vivo* de los astrocitos en ausencia de interacción con la microglía.



2.4. Conclusión: papel dual de los astrocitos en la EA

Podemos concluir que los astrocitos en la enfermedad de Alzheimer presentan un fenotipo disfuncional, con un perfil transcripcional reactivo e hipometabólico, reforzando así la hipótesis de que la disfunción astrogliar podría estar implicada en la progresión de la EA (Lian et al. 2015; Masgrau et al., 2017; Acosta et al., 2017; McAvoy y Kawamata, 2019). La disfuncionalidad astrogliar propuesta en este proyecto parece mediar las deficiencias sinápticas y la neurodegeneración asociadas a la EA, que son consecuencias de una menor protección astrogliar y una activación de la respuesta del complemento. Las formas solubles de A β y/o Tau son factores que participan en el desarrollo de este fenotipo disfuncional de los astrocitos, que además es compatible con un proceso de senescencia celular (fenotipo SASP) y/o resistencia a la insulina. Dichos astrocitos también originan una respuesta proinflamatoria que contribuye a la deficiencia energética y a la neurodegeneración (Heneka et al., 2015, Zulfiqar et al., 2019). Cabe destacar que en la EA no se produce degeneración astrogliar, ya que el número de astrocitos es similar en cerebros sanos y de pacientes de Alzheimer (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). Por otra parte, aunque nuestros datos transcriptómicos muestran la presencia de astrocitos reactivos y disfuncionales en el cerebro de pacientes de Alzheimer, no podemos concluir si ambos perfiles corresponden o no a la misma célula. Para profundizar en esta cuestión, será de gran utilidad la metodología de inmunohistoquímica fluorescente múltiple, técnica puesta a punto en el desarrollo en este proyecto. También habría que contemplar la interacción astrocitos-microglía, ya que, de manera general, la función cerebral global resulta de la actividad coordinada de las redes microglía-astrogliar (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018; Hansen et al. 2018) y astrocitos-neuronas (Covelo y Araque, 2018).

Los resultados de este proyecto de Tesis doctoral nos han permitido identificar, aunque sea parcialmente, la firma molecular de los astrocitos en la patología de la EA. Estos datos son de gran utilidad para desarrollar estrategias que permitan predecir o detectar el progreso de la EA, así como la identificación de nuevas dianas terapéuticas. En este sentido, nuestros resultados, aunque preliminares, podrían sugerir que los astrocitos son capaces de recuperar su fenotipo una vez eliminado el estímulo (S1 de APP o de TAU), siendo, por tanto, una potencial diana terapéutica. Sería interesante ensayar activadores metabólicos para paliar las deficiencias astrogliar en el soporte neuronal. Considerando, además, que la disfuncionalidad astrogliar puede derivar en senescencia celular (o la adquisición de un fenotipo SASP), también planteamos la utilización de senolíticos como posible aproximación terapéutica para ralentizar el desarrollo de la EA (Baker y Petersen, 2018). En conjunto, la información obtenida de este proyecto es una herramienta traslacional muy valiosa para evaluar potenciales estrategias diagnósticas y terapéuticas dirigidas hacia una modulación astrogliar.



3. RESPUESTA MICROGLIAL EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La microglía es la principal célula inmune del cerebro (Fani Maleki y Rivest, 2019; Geirsdottir et al., 2019; Greenhalgh et al., 2020), por lo que tiene un papel esencial en la respuesta neuroinflamatoria. Son células muy dinámicas que, en condiciones homeostáticas, evalúan constantemente el parénquima cerebral y migran a zonas dañadas fagocitando virus, bacterias y restos neuronales (Nimmerjahn et al., 2005; Fuhrmann et al., 2010). La identificación en genes microgliales de polimorfismos asociados al Alzheimer esporádico, como TREM2 o CD33 (Srinivasan et al. 2016; Hansen et al. 2018; Kunkle et al, 2019), avalan un papel predominante, aún por definir, de estas células en la patogénesis de la EA.

Clásicamente la microglía activa se ha asociado en la EA a la producción de factores inflamatorios y neurotóxicos (Heneka et al., 2015), que podrían contribuir al daño neuronal y al deterioro cognitivo (Holmes et al., 2009; Navarro et al., 2018). Esta idea deriva de estudios en modelos transgénicos productores de A β , algunos caracterizados en nuestro laboratorio (Jimenez et al., 2008; Moreno-Gonzalez et al., 2009; Baglietto-Vargas et al., 2017; Gutierrez y Vitorica, 2018), en los que se produce una fuerte activación microglial (Heneka et al., 2015) mediada principalmente por oligómeros solubles de A β . Sin embargo, nuestros resultados en el hipocampo de pacientes de Alzheimer muestran una respuesta microglial leve y tardía (este trabajo; Navarro et al., 2018), así como una fuerte degeneración microglial, promovida posiblemente por formas solubles de Tau hiperfosforilada (Sanchez-Mejias et al., 2016). De forma similar, en el modelo de patología Tau ThyTau22, no se produce activación microglial (Romero-Molina et al., 2018), mientras que sus fracciones solubles con alto contenido de Tau hiperfosforilado, producen muerte microglial en cultivo (Sanchez-Mejias et al., 2016). Estos resultados ponen de manifiesto las importantes diferencias entre modelos animales y pacientes de Alzheimer (Navarro et al., 2018) y nos llevan a hipotetizar que la patología Tau, patente en el hipocampo desde estadios tempranos de la EA, podría mediar la reducción del dominio microglial y, por tanto, de la protección inmunológica (Sanchez-Mejias et al., 2016; Streit et al., 2020), mientras que la patología A β podría ser la principal responsable de la respuesta neuroinflamatoria.

Para profundizar en esta hipótesis, en el presente proyecto hemos caracterizado la respuesta microglial en muestras de corteza frontal con la progresión de la EA. Esta región se caracteriza por una acumulación amiloide temprana y severa en comparación con el hipocampo, que presenta una importante patología neurofibrilar y ha sido caracterizado previamente por nuestro grupo (Navarro, 2015; Sanchez-Mejias et al., 2016). Nuestros resultados reflejan que en la corteza frontal se produce una activación microglial, pero no observamos evidencias de degeneración, contrariamente a lo que ocurre en el hipocampo. Además, el cambio de fenotipo microglial podría estar mediado, al menos en parte, por la patología A β .

Tal y como hemos mencionado previamente, resultados previos de nuestro grupo, demuestran una importante degeneración microglial específica del giro



dentado (Sanchez-Mejias et al., 2016). Por otra parte, en el resto del hipocampo y en la corteza temporal de pacientes de Alzheimer el **número de células microgliales** se mantiene (Serrano-Pozo et al., 2013a; Sanchez-Mejias et al., 2016), sugiriendo que la degeneración podría ser específica de ciertas regiones cerebrales. De hecho, nuestros resultados transcriptómicos en corteza frontal, aunque deben validarse por técnicas inmunohistoquímicas, podrían reflejar que en esta región el número total de células microgliales permanece inalterado con la progresión de la EA. Ya que las formas solubles de Tau hiperfosforilada parecen ser las responsables de la toxicidad microglial (Streit et al., 2009; Sanchez-Mejias et al., 2016), podemos hipotetizar que la supervivencia de estas células en la corteza frontal se debe a una acumulación menor o, al menos, más tardía de estas formas fosforiladas.

En modelos de EA, la **activación microglial** conlleva la disminución de genes homeostáticos y la inducción del programa génico denominado DAM (Keren-Shaul et al., 2017), en el que se incluyen genes asociados con el riesgo de desarrollar EA, así como rutas de activación de endocitosis, fagocitosis, respuesta inmune, diferenciación y división celular. En consonancia con los modelos, nuestros resultados reflejan que en la corteza frontal de pacientes de Alzheimer se produce una activación microglial junto a una disminución en la microglía homeostática. Esta microglía activa podría presentar un papel protector, participando en el aclaramiento de A β (Ries y Sastre, 2016), pero también proinflamatorio, contribuyendo a la progresión de la patología (Heneka et al., 2015). Aunque existen contradicciones respecto al comportamiento de varios de los genes analizados en este trabajo (Masliah et al., 1991a; Colton et al., 2006; Hopperton et al., 2018), nuestros resultados muestran un aumento general en la expresión de los genes asociados a activación microglial en la corteza frontal, pero no en el hipocampo de pacientes de Alzheimer. Entre ellos, cabe destacar al receptor de superficie TREM2, implicado en activación, fagocitosis, supervivencia y proliferación microglial (Hickman y El Khoury, 2014; Ulland et al., 2017). Mutaciones en este receptor implican un mal funcionamiento de la respuesta microglial (Wang et al., 2015; Yuan et al., 2016) y se asocian a un mayor riesgo de desarrollar EA (Korvatska et al., 2015). Por tanto, la ausencia de activación de TREM2 en el hipocampo, consecuencia de una deficiencia microglial, podría reflejar la contribución de estas células en el desarrollo de la EA.

Por otra parte, CLEC7A no se altera en la corteza frontal de pacientes, a pesar de ser uno de los genes que más se induce en la microglía activa de modelos de EA (Keren-Shaul et al., 2017; Krasemann et al., 2017). En este sentido, los análisis de *RNA-seq* de células microgliales de corteza frontal de pacientes de EA, definen una microglia HAM (del inglés, *human Alzheimer's microglia*) con perfiles distintos de la microglia DAM descrita en modelos animales de EA y en humanos con otras enfermedades neurológicas, como la esclerosis múltiple (Srinivasan et al., 2020). Es pues posible que, aunque Clec7a sea importante en la activación microglial en modelos animales, su expresión no se modifique en la microglía activa de pacientes de EA. Este resultado pone de manifiesto, una vez más, la necesidad de trabajar con muestras humanas de EA para caracterizar de manera precisa el fenotipo y papel de la respuesta microglial en esta patología.



A pesar del diferente comportamiento de los genes implicados en la activación microglial, la expresión de genes **homeostáticos** disminuye en corteza frontal (este trabajo) e hipocampo de pacientes de Alzheimer (este trabajo, Navarro et al., 2018), así como en modelos animales de la enfermedad (Keren-Shaul et al., 2017; Zhou et al., 2020), lo que podría implicar una pérdida de funciones homeostáticas microgliales necesarias para el correcto funcionamiento del SNC. En este trabajo sólo hemos analizado dos marcadores homeostáticos en muestras humanas, y hemos obtenido resultados contradictorios con otros autores (Srinivasan et al., 2020; Zhou et al., 2020). Sin embargo, existe una buena correlación entre ellos (datos no mostrados), lo que nos sugiere que son buenos representantes de la población de microglía homeostática.

En consonancia con nuestra hipótesis, nuestros resultados muestran que la **patología amiloide** tiene tendencia a inducir activación microglial, y correlaciona de forma significativa con la disminución de genes microgliales homeostáticos en corteza frontal, pero no en hipocampo. Considerando el diferente patrón en la distribución de las patologías amiloide y neurofibrilar, estos datos reflejarían que A β parece mediar, al menos en parte, la activación microglial en la corteza frontal de pacientes de EA, mientras que, en el hipocampo, las formas de Tau podrían dar lugar a un efecto tóxico (Sanchez-Mejias et al., 2016) limitando la activación microglial. De hecho, diversos autores consideran que la neuroinflamación se produce en respuesta a la patología amiloide (Heneka et al., 2015; Manocha et al., 2016; Gutierrez y Vitorica, 2018; Sierksma et al., 2020), al menos en estadios iniciales de la EA (Ismail et al., 2020).

Sin embargo, y en contradicción con esta hipótesis, los individuos Braak III-IV, a pesar de la importante acumulación de A β en corteza frontal, no presentan activación microglial ni disminución en la expresión de marcadores homeostáticos, lo que nos hace plantear que las diferentes respuestas microgliales entre hipocampo y corteza frontal también podrían deberse a la propia heterogeneidad microglial existente entre diferentes regiones cerebrales (Grabert et al., 2016; Böttcher et al., 2019). Sin embargo, una vez más debemos considerar las limitaciones de nuestra metodología (ver Discusión, Apartado 1). Como hemos explicado previamente, los niveles de A β se han cuantificado en condiciones capaces de desagregar las placas amiloides extracelulares (Jimenez et al., 2014), lo que hace probable que gran parte del monómero provenga de las mismas. Puesto que los oligómeros de A β parecen ser los principales responsables de la activación microglial (Jimenez et al., 2008; Heurtaux et al., 2010), esta aproximación metodológica puede no ser la más adecuada. En este sentido, postulamos que en la corteza frontal de individuos Braak III-IV la mayor parte del A β podría encontrarse formando placas seniles, que podríamos considerar protectoras al disminuir la cantidad de oligómeros solubles libres en el parénquima cortical, produciendo, por tanto, una menor activación glial.

Además, los diferentes tipos de placas existentes en cada región cerebral podrían producir diferentes respuestas microgliales. Aunque en el cerebro de modelos amiloideos el tipo de placas es homogéneo, en los pacientes de EA se han descrito diversos tipos morfológicos, cuya distribución depende de la región cerebral



(DeTure y Dickson, 2019). Incluso encontramos diferencias dentro de una misma estructura, como el hipocampo (Sanchez-Mejias, 2015). Así pues, en la región CA1 existen principalmente placas de tipo clásico, con forma redondeada y un núcleo fibrilar compacto rodeado de un halo periférico oligomérico difuso, con neuritas distróficas entre el núcleo fibrilar y el halo, mientras que, en el giro dentado, encontramos preferentemente placas de tipo fibrilar, con forma estrellada, un núcleo que ocupa casi la totalidad de la placa y un pequeño halo oligomérico periférico rodeado por gran cantidad de neuritas distróficas. Estas diferencias podrían implicar distintos niveles de oligómeros solubles de A β y, por tanto, distinta toxicidad neuronal (Knowles et al., 1999) y activación microglial. En este sentido, se ha descrito que los pacientes de EA poseen mayor proporción de placas fibrilares y clásicas y niveles más elevados de oligómeros de A β que los individuos con niveles similares de placas totales, pero sin síntomas de demencia (Perez-Nievas et al., 2013; Esparza et al., 2013). Por tanto, las diferentes respuestas microgliales podrían ser consecuencia de las formas o agregados de A β existentes en cada región cerebral, además de las diferencias en el tiempo o nivel de acumulación de estas formas patológicas.

Ya que los genes de susceptibilidad a la EA se inducen con la **edad** (principal factor de riesgo del Alzheimer esporádico) y median un fenotipo microglial asociado al envejecimiento (Galatro et al., 2017; Olah et al., 2018), es necesario diferenciar si el fenotipo microglial descrito en los enfermos de Alzheimer es consecuencia de la patología *per se* y/o está determinado por la edad del paciente. En este proyecto no hemos observado diferencias en los perfiles de genes microgliales entre los individuos cognitivamente sanos Braak 0, más jóvenes, y Braak II, con edades similares a la de los enfermos de Alzheimer, por lo que podemos considerar que las alteraciones microgliales descritas son consecuencia de la patología *per se* y no del envejecimiento fisiológico.

Considerando que **APOE** se produce principalmente en células gliales, cabría esperar buena correlación entre el alelo $\epsilon 4$ y la activación microglial. $\epsilon 4$ se asocia a una respuesta inflamatoria microglial (Zhu et al., 2012; Friedberg et al., 2020) y a una menor eficiencia en el aclaramiento de A β (Jiang et al., 2008). De hecho, los pacientes de EA con al menos un alelo $\epsilon 4$ poseen mayores niveles de A β . Además, la interacción APOE-TREM2 media el cambio de microglía homeostática a activa (Krasemann et al., 2017). Sin embargo, nuestros datos no encuentran asociación entre el genotipo APOE y la expresión de genes de microglía, ni activa ni homeostática. Aunque es posible que nuestros resultados se deban al número limitado de muestras usadas asociado a la elevada variabilidad interindividual de las muestras humanas, Serrano-Pozo et al. (2013b) proponen que el genotipo APOE no afecta a la respuesta microglial a placas, en consonancia con nuestros datos. Olah et al. (2018) puntualizan al respecto que el genotipo $\epsilon 2$ disminuye la expresión de genes de susceptibilidad a la EA en la microglía envejecida, mientras que APOE $\epsilon 4$ no produce ningún efecto. Desafortunadamente, en nuestro estudio no hemos contado con un número suficiente de individuos $\epsilon 2$ para estudiar su efecto sobre la función microglial.



Para resolver algunas de las limitaciones mencionadas, proponemos realizar estudios complementarios. Por una parte, sería interesante profundizar en la caracterización de los múltiples fenotipos microgliales en la EA (Friedman et al., 2018; Sankowski et al., 2019), ya que probablemente los fenotipos homeostáticos y DAM solo sean una simplificación de la enorme heterogeneidad funcional existente. Por ello, pretendemos analizar un mayor número de genes asociados a los diferentes estados microgliales. Hasta la fecha, la mayor parte de la información disponible procedía de modelos animales. Sin embargo, muy recientemente se han realizado estudios transcriptómicos a nivel de célula única en microglía humana (Zhou et al., 2020; Srinivasan et al., 2020) que, aunque presentan importantes limitaciones para el estudio de la activación microglial (Thrupp et al., 2020), pueden ser útiles para definir marcadores específicos de los distintos fenotipos microgliales existentes en pacientes de EA. Además, actualmente continuamos caracterizando las diferentes formas fosforiladas y agregadas de Tau, con el fin de estudiar posibles asociaciones con otros aspectos de la patología. Nuestros resultados deben ser avalados por análisis más potentes de relación, así como por ensayos inmunohistoquímicos que permitan asociar la patología amiloidea y neurofibrilar a las diferentes subpoblaciones microgliales. En este sentido, la técnica de inmunohistoquímica fluorescente múltiple desarrollada en este trabajo será de gran utilidad. Por último, cabe destacar que en la neuroinflamación también juegan un papel esencial los astrocitos (Heneka et al., 2015). Por ello, tal y como se ha comentado previamente, el estudio de la interacción microglia-astrocitos resulta crucial en el contexto de la enfermedad de Alzheimer.

En conclusión, en este trabajo demostramos que en la EA se produce heterogeneidad regional en la respuesta microglial. Mientras que en el hipocampo de pacientes de EA se produce una respuesta microglial parcial o atenuada (este trabajo, Sanchez-Mejias et al., 2016), en la corteza frontal nuestros resultados reflejan un aumento en la activación microglial y, en consecuencia, una disminución en la microglía homeostática, efecto que parece estar mediado, al menos en parte, por la importante patología amiloide desarrollada en esta región. Como consecuencia podrían perderse funciones protectoras microgliales a cambio de una ganancia de efecto tóxico (Sarlus y Heneka, 2017; Hansen et al., 2018). Además de esta heterogeneidad regional, también existen importantes diferencias en la respuesta microglial de pacientes y modelos de EA. Por tanto, para dilucidar los estados funcionales reales de la microglia con el progreso de la patología de Alzheimer, resulta fundamental un estudio amplio y detallado con un mayor número de muestras humanas. Únicamente entendiendo las funciones de estas células mieloides, podremos aprender a modular su actividad y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que frenen la progresión patológica del Alzheimer.



4. INFILTRACIÓN DE CÉLULAS INMUNES EN EL PARÉNQUIMA CEREBRAL DE PACIENTES DE ALZHEIMER

En condiciones fisiológicas, las barreras físicas que forman la interfaz entre el SNC y la inmunidad periférica restringen y regulan la entrada de células inmunes periféricas al SNC (Engelhardt et al., 2017; Kierdorf et al., 2019). Sin embargo, los procesos neuroinflamatorios se asocian frecuentemente con la alteración de la BHE y la infiltración de células inmunes periféricas (De Laere et al., 2018). Ejemplos típicos son la infiltración de linfocitos y de CDM en la esclerosis múltiple y la esclerosis lateral amiotrófica, que parecen desempeñar un papel importante en el desarrollo de estas patologías neurodegenerativas (Bogie et al., 2014; Zondler et al., 2016; Engelhardt et al., 2017, Prinz y Priller, 2017; Sevenich, 2018). Sin embargo, en la EA no está claro si se produce infiltración de células periféricas (Hohsfield y Humpel, 2015; Prinz y Priller, 2017; Sweeney et al., 2018; Fani Maleki y Rivest, 2019), debido principalmente a la dificultad para diferenciar estas células mieloides de la microglía (Bennett et al., 2016). Por ello, en el presente trabajo, hemos realizado distintos abordajes experimentales con el fin de aclarar si se produce o no infiltración de células inmunes periféricas en el parénquima cerebral de modelos animales de la enfermedad y de pacientes de Alzheimer. Nuestros datos revelan que en el SNC de los pacientes de EA se produce infiltración de CDM, mientras que, en los modelos animales, dicha entrada es muy limitada.

En el presente proyecto hemos sido capaces de aislar y validar de manera específica las poblaciones de microglía (CD11b+/CD45^{medium}/Ly6c-/Trem2+/Cx3cr1+/Ccr2-/CD3-), CDM (CD11b+/CD45^{hi}/Ly6c+/Trem2-/Cx3cr1-/Ccr2+/CD3-) y linfocitos (CD11b-/CD45^{hi}/Ly6c+/Trem2-/Cx3cr1-/Ccr2+/CD3+) en corteza e hipocampo de ratones WT, APP y TAU. Nuestros datos indican que se produce una infiltración limitada de CDM en el **modelo APP** y prácticamente nula en el modelo de patología **TAU**. Estos resultados coinciden con publicaciones recientes, que, empleando diferentes aproximaciones experimentales, demuestran que no se produce infiltración de células mieloides periféricas en el SNC de modelos de EA (Wang et al., 2016; Shukla et al., 2019; Reed-Geaghan et al., 2020). En contraposición a estos resultados, estudios anteriores describen que existe infiltración de CDM en modelos con patología A β , a las que asignan importantes funciones en la restricción de la formación de placas (Malm et al., 2005; Simard et al., 2006). Hay que tener en cuenta que en dichos estudios se aplica radiación al animal, lo que puede producir alteración de la BHE e inflamación, facilitando la entrada de células externas al SNC. También se ha demostrado que las CDM pueden reemplazar a la microglía cuando la capacidad de ésta para repoblar el nicho se ve comprometida, sin necesidad de irradiación, inflamación o alteración de la BHE (Cronk et al., 2018; Lund et al., 2018; Plemel et al., 2020; Hohsfield et al., 2020). Por tanto, las patologías A β y Tau no serían suficientes para producir infiltración de CDM en ausencia de otros factores, como afectación del nicho microglial y/o de la BHE.



Por otra parte, con el envejecimiento del animal, observamos infiltración de linfocitos T CD3+ en ambos modelos, APP y TAU. En consonancia con estos resultados, nuestro grupo ha demostrado hace años la presencia de estas células en el hipocampo de ratones PS1xAPP751sl de 18 meses (Jiménez et al., 2008). Además, otros autores también describen infiltración de linfocitos en modelos de patología A β y Tau (Ferretti et al., 2016; Laurent et al., 2017; Mrdjen et al., 2018; Unger et al., 2018), e incluso en animales WT envejecidos (Mrdjen et al., 2018). Sin embargo, existen discrepancias importantes en la función de estos linfocitos infiltrados. Algunos autores sugieren que los linfocitos Treg podrían ser beneficiosos, disminuyendo la progresión de la enfermedad y modulando la respuesta microglial a la deposición de A β (Dansokho et al., 2016; Marsh et al., 2016). Sin embargo, otras evidencias apuntan a que los linfocitos Treg y Tc podrían exacerbar la patología, ya que su depleción revierte el declive cognitivo (Baruch et al., 2015; Laurent et al., 2017). Considerando que en los pacientes de EA también parece existir infiltración de linfocitos CD3+ (este trabajo, Navarro, 2015; Zenaro et al., 2017; Merlini et al., 2018), sería interesante caracterizar con mayor detalle la población o poblaciones de linfocitos T presentes en el parénquima de modelos animales con patología amiloidea y neurofibrilar, así como de pacientes de EA, con el fin de dilucidar su papel en la patología.

En el trabajo actual nos hemos encontrado con importantes limitaciones para distinguir de forma precisa las células residentes de las infiltradas en el parénquima cerebral de **pacientes de Alzheimer**. Como se ha indicado previamente, las mayores dificultades surgen debido a la expresión de los mismos marcadores por diversos tipos de células mieloides (Bennett et al., 2016), así como por la expresión de marcadores distintos para un mismo tipo celular en humanos y en modelos, siendo en estos últimos donde se han realizado la mayoría de los estudios hasta la fecha (Ludewig et al., 2016; Teh et al., 2019). Además, cuando las CDM se infiltran en el parénquima cerebral, aunque mantienen su identidad transcripcional y funcional (Cronk et al., 2018; Shemer et al., 2018), podrían modificar su fenotipo al exponerse al ambiente del SNC y asemejarse aún más a la microglía (Lund et al., 2018; Bennett et al., 2018; Kierdorf et al., 2019; Greenhalgh et al., 2020). El uso de tejido humano congelado nos imposibilita realizar análisis a nivel de células individuales, que sí hemos podido realizar con los modelos animales. Aunque esta limitación podría ser superada mediante el empleo de técnicas novedosas, como el aislamiento de células individuales en tejido congelado para una posterior secuenciación de ARN (Srinivasan et al., 2020), o la transcriptómica de núcleo individual (Mathys et al., 2019; Zhou et al., 2020), estas técnicas también pueden presentar problemas asociados a una baja integridad del ARN o a una disminución del número de células y transcritos recuperados (Bakken et al., 2018; Slyper et al., 2020), respectivamente. De hecho, recientemente se ha publicado que la secuenciación de núcleo individual no es apropiada para detectar la activación microglial en muestras humanas (Thrupp et al., 2020). Otro factor a considerar es que en las muestras humanas hay contaminación de células sanguíneas, debido a la imposibilidad de perfundir el tejido humano, lo que hace indispensable un estudio inmunohistoquímico que confirme la localización exacta de las células periféricas (en el interior del parénquima cerebral



o de los vasos sanguíneos). Todo ello, sumado a las limitaciones propias del uso de muestras humanas mencionadas previamente, ha dificultado, hasta la fecha, la identificación y clasificación de las diferentes poblaciones mieloides en los pacientes de Alzheimer.

Sin embargo, y a pesar de las limitaciones señaladas, en este trabajo hemos **agrupado de forma no supervisada** múltiples genes de células inmunes en base a su expresión en individuos controles y en pacientes de diferentes estadios de la EA. Apoyándonos en bibliografía previa, asociamos estos grupos de genes a microglía homeostática, microglía activa o DAM y monocitos o CDM (Hickman et al., 2013; Kamphuis et al., 2016; Keren-Shaul et al., 2017; Mathys et al., 2017; Navarro et al., 2018; Hansen et al., 2018; Rustenhoven et al., 2018; Hopperton et al., 2018; Friedman et al., 2018; Böttcher et al., 2019; Van Hove et al., 2019; Hemonnot et al., 2019; Zhou et al., 2020). Aunque el análisis de clúster es una herramienta muy útil para agrupar datos, hay que considerar que la propia naturaleza del algoritmo de *clustering* jerárquico conlleva la asignación obligatoria de cada observación a un grupo, por lo que, si existe en la muestra algún *outlier*, el algoritmo lo asignará a un grupo concreto, a pesar de que realmente no pertenezca a ninguno, lo que provoca una distorsión del clúster en cuestión. Además, si se realiza una mala división en los pasos iniciales, no se puede corregir en los pasos siguientes. Todo ello hace que, algunos genes puedan agruparse de forma errónea, como TMEM119, clasificado en el clúster de microglía DAM, a pesar de que se relaciona clásicamente con microglía homeostática (Keren-Shaul et al., 2017; Navarro et al., 2018; Zhou et al., 2020), motivo por el que lo excluimos del clúster en análisis posteriores. Dicha asociación seguramente sea debida a que la expresión de los genes homeostáticos CX3CR1 y P2RY12 disminuye de forma patente con la activación microglial, mientras que la de TMEM119 no se modifica con la patología. Estos resultados se han obtenido en nuestro laboratorio de forma consistente, tanto en el hipocampo como en la corteza frontal de pacientes de EA. Sin embargo, pueden parecer controvertidos debido a la disminución en la expresión de TMEM119 en la microglía activa procedente de modelos animales (Keren-Shaul et al., 2017) y al aumento descrito por algunos autores en pacientes de EA (Zhou et al., 2020). Respecto a IBA1, aunque su expresión puede aumentar con la activación, suele considerarse un marcador de toda la población microglial (Hendrickx et al., 2017; Hopperton et al., 2018). Por ello, también se ha excluido del *gene set score* de microglía DAM.

Tal y como habíamos descrito previamente (Sanchez-Mejias et al., 2016; Navarro et al., 2018), en el hipocampo de pacientes de Alzheimer se produce una activación microglial muy limitada o ausente, acompañada de una importante disminución en la expresión de genes relacionados con la microglía homeostática. Además, nuestros resultados proporcionan por primera vez, evidencias de infiltración de CDM en la EA. Para caracterizar esta población, tras realizar un exhaustivo estudio bibliográfico, seleccionamos marcadores específicos de las mismas (respecto a microglía) en base a análisis de célula única (Villani et al., 2017; Van Hove et al., 2019; Böttcher et al., 2019; Grubman et al., 2019) y a patologías donde se produce infiltración de CDM en el SNC, como gliomas, esclerosis múltiple o neuroinflamación producida por virus (Zhang et al., 2011b; Venteicher et al., 2017;



Müller et al., 2017a; DePaula-Silva et al., 2019; Haage et al., 2020). Además, en este trabajo empleamos y proponemos a CD163 como marcador específico de CDM y macrófagos asociados al SNC, ausente en microglía. Nuestros datos, obtenidos en colaboración con la Dra. Antonia Gutiérrez, muestran una población CD163+ en el parénquima cerebral de enfermos de EA ausente en controles. Este hecho ya había sido observado por otros autores, aunque se había relacionado con la activación microglial o con macrófagos asociados al SNC (Pey et al., 2014; Nguyen et al., 2020).

Nuestros resultados muestran una **distribución heterogénea** de células CD163+ en el parénquima hipocampal de pacientes de Alzheimer, diferente a la microglial (IBA1+), que es mucho más homogénea. Observamos CDM principalmente en zonas cercanas a vasos sanguíneos y asociadas a placas amiloides. También encontramos células microgliales, asociadas o no a placas, sin expresión de CD163, lo que indica que existe microglía homeostática y activa que es negativa para este marcador. Aunque, debido a la gran heterogeneidad microglial, es difícil descartar que las células CD163+ correspondan a diferentes fenotipos microgliales (Stratoulis et al., 2019; Masuda et al., 2020), en conjunto, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que las células CD163+ son CDM procedentes de la periferia.

CD163, además de expresarse en monocitos y CDM, es un marcador típico de **macrófagos asociados al SNC** (Borda et al., 2008; Thériault et al., 2015; Faraco et al., 2017; Kierdorf et al., 2019; Jordão et al., 2019). Nuestros resultados revelan que, en controles y en la mayoría de los individuos Braak II, la localización de CD163 queda prácticamente restringida al espacio perivascular, en consonancia con Swanson et al. (2020). Estas células presentan una morfología alargada y relativamente simple, en comparación con la microglía del parénquima, altamente ramificada, lo que, sumado a su disposición en vasos, nos permite identificarlas como macrófagos perivascuales (Zeisel et al., 2015; Goldmann et al., 2016). Al analizar las células infiltradas en el parénquima de pacientes de EA comprobamos que son negativas para MRC1, marcador específico de macrófagos asociados al SNC no expresado por monocitos ni microglía (Galea et al., 2005; Holder et al., 2014; Goldmann et al., 2016; Mrdjen et al., 2018), hecho que apoya el origen monocítico de la infiltración periférica. Se ha demostrado en modelos animales que los macrófagos asociados al SNC pueden regular negativamente MRC1 (Jordão et al., 2019) en respuesta a la neuroinflamación, por lo que sería interesante estudiar otros marcadores como integrina $\alpha 5$ (CD49e) o CD44 expresados por células inmunes periféricas, pero no por macrófagos asociados al SNC (Ajami et al., 2018; Mrdjen et al., 2018; Jordão et al., 2019). Otro marcador específico de células infiltradas descrito en modelos es CD11a (Shukla et al., 2019), aunque nuestros resultados no muestran correlación con el *gene set score* de CDM (datos no mostrados). Hay que tener en cuenta que estos estudios se han realizado en modelos animales, que podrían tener importantes discrepancias con los marcadores en humanos. A pesar de la limitación en el número de marcadores estudiados, en consonancia con nuestros resultados, no se ha descrito por otros autores ni activación ni alteración en el número de los macrófagos perivascuales en el cerebro de pacientes con EA en comparación con controles sanos (revisado en Kierdorf et al., 2019).



En base a los estudios con modelos animales, las **patologías A β y Tau** no parecen suficientes por sí mismas para producir la entrada de CDM en el SNC. De hecho, nuestros datos no muestran correlación entre los niveles de estas proteínas y el *gene set score* de CDM en el hipocampo de pacientes de Alzheimer. En modelos de depleción microglial con patología amiloide y Tau si existen CDM infiltradas, pero no se modifica la carga de A β ni los niveles de Tau total y fosforilado, respectivamente (Varvel et al., 2015; Prokop et al., 2015; Zhu et al., 2020). Sin embargo, nuestros resultados en pacientes de EA muestran que los individuos con infiltración de CDM poseen mayor carga de A β y Tau total, aunque no de formas fosforiladas. Además, muchas de las células CD163+ se encuentran asociadas a placas amiloides. Por lo que, considerando las limitaciones asociadas a nuestra metodología, estos datos sugieren una posible relación con la patología A β , aunque sería necesario realizar un estudio más detallado de la patología amiloide (cuantificando el área y número de placas) en presencia y ausencia de infiltración para obtener conclusiones más certeras al respecto.

Las células inmunes periféricas podrían acceder al SNC como consecuencia de la **alteración o aumento de permeabilidad de la BHE**, un rasgo característico del envejecimiento, que se acelera con la EA (Farrall y Wardlaw, 2009; Johanson et al., 2018). Nuestros datos muestran que en torno al 80% de los individuos con algún tipo de patología vascular descrita presentan infiltración periférica, lo que no ocurre en individuos sin alteraciones vasculares. De hecho, las células CD163+ del parénquima tienden a localizarse próximas a daños de la BHE (Pey et al., 2014). Además, las alteraciones en la permeabilidad están relacionadas significativamente con el aumento de CCL2 en suero (Ott et al., 2018).

En general, para poder reclutar células inmunes periféricas, las células residentes del SNC (astrocitos, microglía, células endoteliales y otras), secretan citoquinas y otras moléculas quimioatrayentes (Liu et al., 2014; De Laere et al., 2018). Las **quimioquinas**, aunque presentan múltiples funciones, son conocidas principalmente por su capacidad para activar, atraer y estimular la migración de leucocitos mediante un proceso llamado quimiotaxis. Para que los leucocitos puedan responder a estas quimioquinas deben expresar un receptor complementario (Hughes y Nibbs, 2018). Nuestros datos revelan que, en el hipocampo de pacientes de Alzheimer, la microglía, astrocitos u otras células residentes podrían estar liberando quimioquinas, como CCL2 y CCL4, con el fin de generar una respuesta por células CCR2+, expresado altamente y de manera constitutiva en CDM (Zenaro et al., 2017) y linfocitos (Bakos et al., 2017). Estudios previos han demostrado un aumento en la expresión de CCL2 en el SNC de pacientes de Alzheimer (Ishizuka et al., 1997; Sokolova et al., 2009; Zenaro et al., 2017; Joly-Amado et al., 2020). De hecho, los niveles de CCL2 en LCR y plasma parecen correlacionar con una mayor severidad y declive cognitivo en la EA (Westin et al., 2012; Lee et al., 2018; Kimura et al., 2018), por lo que se ha propuesto como un marcador potencial de diagnóstico de la enfermedad (Olsson et al., 2016). En modelos quiméricos de EA se ha demostrado que el reclutamiento de CDM al parénquima es dependiente de CCR2 (Mildner et al., 2011). Además, la expresión de CCL2 correlaciona con la infiltración de CDM (este trabajo). Sin embargo, nuestros resultados en pacientes de EA no



muestran cambios en la expresión de CCL3 y CCL5, ni de su receptor CCR5, a pesar de que otros autores han descrito subidas en estas dos quimioquinas en cerebros *post mortem* y vasos de pacientes de EA (Tripathy et al., 2010). Nuestros resultados podrían estar enmascarados por la posible expresión microglial de CCR5 (Hickman et al., 2013). Curiosamente, se ha descrito una disminución de CCL5 en sangre de pacientes de Alzheimer (Kester et al., 2011). Aunque el papel de CCL3, CCL5 y CCR5 no está claro en la EA (Zuena et al., 2019), podrían participar en el reclutamiento de linfocitos T (Martin y Delarasse, 2018, Guedes et al., 2018). Tampoco parece alterarse la expresión de CCR1 con la patología, aunque se ha observado un aumento específico de este marcador en neuritis distróficas asociadas a placas de A β 42 (Halks-Miller et al., 2003). Es importante considerar que la actividad de las quimioquinas se afecta de forma importante por modificaciones postraduccionales (Hughes et al., 2018), no analizadas en este trabajo. En conclusión, nuestros resultados sugieren que CCL2 y CCL4 participarían en el reclutamiento de CDM y linfocitos al SNC de pacientes de Alzheimer, aunque aún sigue sin establecerse el mecanismo explícito del proceso por el que estas quimioquinas y sus receptores pueden afectar a otros aspectos de la patología como la deposición de A β , la hiperfosforilación de Tau, la respuesta inflamatoria y la degeneración neuronal (Domingues et al., 2017; Guedes et al., 2018; Martin y Delarasse, 2018).

Además, nuestros datos indican una correlación entre la **reactividad astrogliar**, la respuesta del complemento y la infiltración de CDM. Aunque los astrocitos podrían dificultar la migración de células periféricas, esta capacidad parece perderse tras tiempos largos de exposición a A β (Spampinato et al., 2019). La activación astrogliar, además de producir quimioquinas atrayentes, implica un cambio morfológico que afecta a los pies de los astrocitos y por tanto a la unidad neurovascular (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018) y a la integridad de la BHE (Liu et al. 2014). Ya que nuestros resultados muestran una gran correlación entre la infiltración y la alteración metabólica de los astrocitos, hipotetizamos que los astrocitos, como consecuencia de la exposición crónica a A β , son incapaces de ejercer su función normal, favoreciéndose así la entrada de CDM. Además, en otros tejidos, la señal del complemento participa en el reclutamiento de monocitos a la zona dañada (Zhang et al., 2017). También se ha descrito que, en gliomas, existe correlación entre la infiltración de CDM y la activación del sistema del complemento por parte de los astrocitos reactivos, que probablemente contribuye a la entrada de CDM en el SNC (Venteicher et al., 2017).

Las CDM, una vez reclutadas, pueden entrar en el SNC mediante mecanismos de **transmigración a través de la BHE**, o bien a través de los vasos meníngeos y plexos coroideos (Zenaro et al., 2017; De Laere et al., 2018), importantes puntos de regulación de la entrada al SNC (Kunis et al., 2013; Shechter et al., 2013). En la fase de rodaje de la transmigración, las CDM establecen contacto con moléculas como las selectinas E y P, expresadas por células endoteliales activadas (Ye Zhang et al., 2016). Posteriormente, las CDM se adhieren de forma firme al endotelio y comienza la diapédesis, principalmente mediada por VE-cadherina, JAMs, CD99 y PECAM-1, por la que el leucocito atraviesa el endotelio y entra en el SNC (Vestweber, 2015; Zenaro et al., 2017; De Laere et al., 2018; Rudziak et al.,



2019). Nuestros datos muestran un aumento de selectina E y PECAM1, marcadores altamente expresados por las células endoteliales (Ye Zhang et al., 2016), en los individuos con infiltración de CDM, sugiriendo que estas células podrían estar entrando, al menos en parte, mediante mecanismos de trans migración. Es importante considerar que la infiltración de linfocitos T, que ocurre de forma paralela a la de CDM, podría producirse por un mecanismo similar. Estos resultados coinciden con el aumento de moléculas como selectina E, selectina P, PECAM1, VCAM1 o ICAM1, en el plasma de pacientes de EA (Zenaro et al., 2017). Estudios *in vitro* han demostrado que A β interacciona con el receptor RAGE de las células endoteliales, lo que origina la migración transendotelial de monocitos, regulada por PECAM1 (Giri et al., 2000).

Por otra parte, en los individuos con mayor infiltración de CDM nuestros resultados muestran un aumento de PDGFRB, marcador implicado en la proliferación y migración de **pericitos** (Winkler et al., 2014), lo que refleja la posible participación de estas células en la trans migración de leucocitos, además de en la formación y mantenimiento de la BHE (Rudziak et al., 2019). Aunque este dato puede parecer contradictorio, ya que se ha descrito una degeneración de pericitos en pacientes de Alzheimer (Sengillo et al., 2013; Winkler et al., 2014; Miners et al., 2018), hay que tener en cuenta que estamos cuantificando niveles de ARNm, que no correlacionan obligatoriamente con la cantidad de proteínas. Curiosamente, se ha descrito un aumento de células positivas para PDGFRB, probablemente pericitos, en las áreas dañadas de cerebro de ratones que han sufrido traumatismos o isquemias (Lendahl et al., 2019), por lo que el aumento en la expresión de PDGFRB descrito en este trabajo también podría ser un reflejo de una alteración o daño vascular en la BHE. De hecho, la activación proinflamatoria de los pericitos conduce a la rotura de la BHE, en un proceso mediado por la expresión astrocítica de APOE ϵ 4, pero no de ϵ 2 o ϵ 3 (Bell et al., 2012).

Recientemente se ha demostrado que ante una lesión del SNC se produce una expansión y activación microglial que impide la infiltración de CDM (Plemel et al., 2020). Sin embargo, existen evidencias de que, en la EA, al igual que en otras enfermedades neurodegenerativas, la **respuesta microglial** está comprometida (Prinz y Priller, 2014; Sanchez-Mejias et al., 2016; Navarro et al., 2018). De hecho, nuestros datos muestran que en pacientes de Alzheimer se produce una disminución de las células microgliales (IBA1+) en el giro dentado (Sanchez-Mejias et al., 2016), aunque no en el hipocampo completo (este trabajo), paralelamente a un aumento de las CDM (CD163+). También observamos tendencia a una menor expresión de TMEM119, que podría ser marcador de la población microglial, en los individuos con mayor infiltración, aunque no existe una buena correlación entre el *gene set score* de CDM y TMEM119 (datos no mostrados). Esto podría ser debido a que la expresión de TMEM119 puede variar con la activación microglial, por lo que el estudio transcriptómico podría no ser una aproximación adecuada para analizar el número de células. Otros autores han descrito, también en pacientes de EA, una disminución en las células microgliales IBA1+ y un aumento en la población positiva para IBA1 y MHC-II (HLA-DP-DQ-DR, otro marcador estudiado asociado a CDM) (Serrano-Pozo et al., 2013a). Nuestros resultados también indican que en los individuos con



infiltración de CDM se produce un cambio fenotípico en la microglía, principalmente caracterizado por una disminución en la expresión de genes homeostáticos, así como una ligera activación microglial. En conjunto, estos datos podrían sugerir que la infiltración de CDM ocurre cuando se produce una disminución o alteración en el nicho microglial, tal y como ocurre en los modelos animales (Cronk et al., 2018; Lund et al., 2018, Plemel et al., 2020). De tal forma que la microglía, en condiciones normales, podría impedir la entrada, proliferación o supervivencia de las CDM al interior del parénquima cerebral, ya sea de forma directa, mediante la fagocitosis de las CDM o la secreción de moléculas que podrían prevenir la infiltración, frenar la proliferación o producir la muerte de las CDM. Aunque la microglía también podría dificultar esta entrada de forma indirecta, mediante su interacción con astrocitos y/o protegiendo y reparando la BHE. Sin embargo, tras una inflamación mantenida, la microglía parece fagocitar los pies astrocíticos y alterar la función de la BHE (Haruwaka et al., 2019). Además, la depleción microglial da lugar a una cascada de citoquinas, que pueden provocar una activación vascular, coincidente con la entrada al SNC de los monocitos Ly6c^{high} (Lund et al., 2018). Actualmente estamos caracterizando en el laboratorio un modelo de depleción de la microglía Csf1r^{flox/flox} x Cx3cr1^{cre} con patología amiloide (con mutación adicional APP) o neurofibrilar (con mutación TAU), con el fin de aclarar el efecto de la microglía sobre la infiltración de CDM, así como el papel de estas células periféricas en el parénquima cerebral en la EA.

Aunque diversos estudios muestran una importante heterogeneidad en la respuesta inmune y microglial en función del género (Oertelt-Prigione, 2012; Klein y Flanagan, 2016; Villa et al., 2018; Thion et al., 2018; Sala Frigerio et al., 2019), nuestros datos no indican asociación entre la infiltración de CDM y el género. La entrada de CDM al cerebro tampoco correlaciona, en principio, con el genotipo APOE, la edad de inicio de la patología, el tiempo de progresión y la edad de muerte. Sin embargo, estos resultados son preliminares, debido a la escasa información clínica disponible de muchos pacientes, por lo que necesitarían ser validados con un tamaño muestral mayor. De hecho, la capacidad para mantener la integridad de la BHE es menor en individuos APOE ϵ 4, lo que podría favorecer una mayor infiltración periférica (Chang et al., 2017). También hipotetizamos que podría existir asociación entre la entrada de las CDM en el SNC y la presencia de diferentes variantes de riesgo de la EA en genes expresados por las CDM, como HLA-DRB1, HLA-DRB5, LGALS3, PILRA, PILRB, MS4A (Pimenova et al., 2018; Kunkle et al., 2019, Boza-Serrano et al., 2019).

Por otra parte, se ha demostrado que los pacientes de Alzheimer son más vulnerables a los cambios cognitivos relacionados con **procesos infecciosos**. En este sentido, existe asociación entre el desarrollo de EA e infecciones crónicas de origen bacteriano, vírico y fúngico, aunque no está claro si estos patógenos son causa directa de la demencia, o si colonizan más fácilmente el SNC como consecuencia de la patología, contribuyendo así a una exacerbación de la neuroinflamación ya existente (revisado en McManus y Heneka, 2017). Los eventos inflamatorios sistémicos pueden producir un aumento en la permeabilidad de la BHE (Ludewig et al., 2016), hecho que facilitaría la entrada de las células inmunes periféricas al SNC.



Por ello, sería interesante estudiar si el grado de infiltración correlaciona con la presencia de algunos de estos patógenos, como citomegalovirus (Barnes et al., 2015), virus del herpes simple tipo I (Honjo et al., 2009) o varias bacterias productoras de gingivitis (Cestari et al., 2016), entre otros. De hecho, las proteínas transmembrana inducibles por interferón, como IFITM2 e IFITM3, tienen un importante papel en la respuesta antiviral (Liao et al., 2019). Estas proteínas se expresan intensamente en las CDM infiltradas, aunque también las expresan neuronas y astrocitos (Hur et al., 2020). Además, las infecciones recurrentes o crónicas podrían contribuir a un aumento de la respuesta inflamatoria periférica, que parece participar en el proceso patogénico de la EA (King et al., 2018), favoreciendo que las células inmunes proinflamatorias entren en el SNC. Aunque en la EA parece existir una alteración de los niveles y papel de las células inmunes en sangre con el progreso de la patología, existen importantes discrepancias acerca de si se produce un aumento o disminución de las poblaciones proinflamatorias con respecto a estadios prodrómicos (Shad et al., 2013; Crispolti et al., 2017; Thome et al., 2018). Es importante profundizar en las alteraciones y el papel de las células inmunes periféricas con el progreso de la EA ya que, debido a su accesibilidad (en comparación con las células en el SNC), son potenciales herramientas diagnósticas y dianas terapéuticas.

En resumen, la infiltración de CDM probablemente sea consecuencia de **múltiples factores** asociados a la edad que se acentúan en la patología de Alzheimer, ya que, aunque también se produce en personas sin patología, la mayor parte de los individuos con infiltración son pacientes de EA. Estos factores (vasculares, aumento de quimioquinas, disfunción glial, genéticos, otras enfermedades infecciosas, etc.), en diferente medida, facilitan o median la entrada de estas células al SNC. En consonancia con esta hipótesis, nuestros resultados sugieren que la infiltración de CDM se produce de forma paralela en múltiples áreas cerebrales de enfermos de Alzheimer, a pesar de que existe una enorme heterogeneidad regional. Puesto que el aumento de quimioquinas o de la respuesta del complemento también ocurren en modelos animales sin infiltración de CDM (este trabajo; Sanchez-Mico, 2019; Zenaro et al., 2017), concluimos que ambos factores pueden facilitar la infiltración de CDM, pero no parecen ser suficientes para desencadenarla *per se*.

Como se ha mencionado previamente, dentro de las CDM existe una elevada **heterogeneidad**, que hemos tratado de caracterizar en este trabajo de Tesis doctoral. Debido a la limitada infiltración de CDM en modelos, tuvimos que recurrir a otras estrategias. Por una parte, hemos aislado y estudiado el fenotipo de las células mieloides del peritoneo y médula ósea de ratones, así como las CDM y microglía del cerebro de ratones tras la inyección de células de glioma GL-21 (datos no mostrados, en colaboración con el Dr. Manuel Sarmiento). Sin embargo, debido a las diferencias de marcadores entre ratones y humanos (Ludewig et al., 2016), la traslacionalidad de estos experimentos es muy limitada y no nos ha permitido concluir el tipo y función de las células infiltradas.

En otras patologías del SNC, las CDM infiltradas presentan un **papel** proinflamatorio y fagocítico (Yamasaki et al., 2014; Varvel et al., 2016). De hecho,



varios de los marcadores que hemos asociado a esta población celular se relacionan con actividad fagocítica, como CD163 (Swanson et al., 2020), CD68 (Murray y Wynn, 2011), LGALS3 (Chen et al., 2015) o MSR1 (Bonilla et al., 2013). Basándonos en una posible similitud con otras patologías y considerando que la infiltración de estas células en la EA correlaciona con un aumento en la producción de IL1 β y TNF α , podríamos pensar que las CDM en pacientes de Alzheimer también poseen una función proinflamatoria. Apoya esta idea el hecho de que en los pacientes con mayor infiltración de CDM existe una mayor neurodegeneración GABAérgica, que podría ser consecuencia, entre otros factores, de un mayor ambiente inflamatorio. También podría ocurrir que las CDM en pacientes de EA tuvieran una función neurotrófica alterada (Ciaramella et al., 2013), lo que contribuiría a la neurotoxicidad. Sin embargo, debido a las limitaciones de nuestra aproximación experimental, no podemos discernir si la infiltración es la consecuencia o la causa de una mayor severidad en la patología. También hay que contemplar la posibilidad de que, aunque las células periféricas puedan presentar un papel beneficioso o nulo, su entrada al SNC ocurra en un momento demasiado avanzado o tardío para modificar la evolución de la patología.

En modelos animales de EA se ha descrito que las CDM desempeñan un importante papel en la eliminación de depósitos cerebrales y de placas amiloides de A β , pudiendo incluso ser más eficientes que la propia microglía (Butovsky et al., 2007; Mildner et al., 2011; Koronyo et al., 2015; Thériault et al., 2015; Zuroff et al., 2017). Estos datos concuerdan con el hecho de que las CDM están asociadas a placas amiloides, probablemente con el fin de participar en el aclaramiento de estos depósitos. Además, también podrían reducir la hiperfosforilación de Tau y los déficits cognitivos (Rosenzweig et al., 2019). Una vez en el SNC, las CDM podrían modificar su fenotipo, y asemejarse aún más a la microglía residente, desempeñando sus mismas funciones (Lund et al., 2018; Bennett et al., 2018). Sin embargo, como se ha indicado previamente, la presencia de CDM en modelos de depleción microglial con patología amiloide y Tau no modifica la carga de A β ni los niveles de Tau total y fosforilado (Varvel et al., 2015; Prokop et al., 2015; Zhu et al., 2020). En sentido contrario, se ha sugerido muy recientemente que las CDM también podrían contribuir a la patología aumentando el ambiente inflamatorio (Ní Chasaide y Lynch, 2020), como ocurre en modelos de Parkinson (Tentillier et al., 2016), o mediando déficits cognitivos y sinápticos (Hohsfield et al., 2020), lo cual mantiene el debate sobre el posible papel (beneficioso, perjudicial o nulo) de estas células en la EA.

Las CDM infiltradas expresan HLA-DR (Villani et al., 2017), molécula esencial para la **presentación de antígenos**, por lo que podrían ser células dendríticas (CD). En consonancia con nuestros resultados transcriptómicos, otros autores han observado por técnicas inmunohistoquímicas que las células CD163+ tienen elevada expresión de HLA-DR (Swanson et al., 2020). Como se ha mencionado previamente, las CD son fagocitos mononucleares que coordinan la respuesta innata y adaptativa, actuando como células presentadoras de antígenos, a través de MHC I y II (este último también es denominado HLA-DP-DQ-DR) (Pérez, 2019). Aunque otras células también podrían presentar esta función, las CD tienen una mayor



capacidad para sensar, procesar y presentar antígenos, así como para migrar a nodos linfáticos en busca de linfocitos T *naive* (Ludewig et al., 2016). Esta hipótesis concuerda con el descenso en la población de CD en sangre periférica que existe en enfermos de Alzheimer (Ciaramella et al., 2016) y que podría ser consecuencia de su reclutamiento al cerebro (Brezovakova et al., 2018). En cualquier caso, en ratones modelos de encefalitis experimental autoinmune, donde existe una clara infiltración de células inmunes periféricas, se ha observado que la presentación de antígenos se realiza principalmente por las CD y CDM, siendo las células mieloides residentes prácticamente irrelevantes (Jordão et al., 2019). Por tanto, es muy probable que las células infiltradas en la EA participen en la presentación de antígenos a linfocitos. Las CD o CDM podrían entrar en contacto con los péptidos de A β excretados a través de la BHE, madurar y migrar a los ganglios linfáticos cervicales para activar a los linfocitos T *naive* (Ludewig et al., 2016). Esta hipótesis coincide con el aumento paralelo observado en cerebros de Alzheimer en la infiltración de linfocitos T CD3+. Estudios previos han localizado linfocitos T CD4+ y CD8+ en el endotelio vascular y en el parénquima de pacientes de Alzheimer (Unger et al., 2018; Merlini et al., 2018), así como en el LCR en pacientes leves de EA y MCI (Lueg et al., 2015). Sin embargo, aunque existen bastantes evidencias de la infiltración de linfocitos en la EA, actualmente, no se sabe con certeza la función desempeñada por estas células (Browne et al., 2013; McManus et al., 2014; McManus et al., 2015; Späni et al., 2015; Marsh et al., 2016; Dansokho et al., 2016), lo que nos dificulta concluir, si la posible presentación de antígenos por parte de las CDM o CD podría ayudar a frenar o, por el contrario, contribuir a la patología.

El hecho de que la expresión de CCL2 sea un factor predictivo de severidad de la patología (Sokolova et al., 2009; Westin et al., 2012; Lee et al., 2018) sugiere un posible papel perjudicial de la infiltración de CDM en la EA. En base a estudios con modelos animales, algunos autores proponen que el aumento de CCL2 coincide con una mayor patología amiloide y Tau, reactividad glial, disfunción sináptica y cognitiva en pacientes de Alzheimer (Yamamoto et al., 2005; Kiyota et al., 2009; Kiyota et al., 2013; Joly-Amado et al., 2020). Estos datos concuerdan con un estudio reciente en el que la depleción de esta quimioquina mejora la función cognitiva, reduciendo a su vez la neurodegeneración, neuroinflamación, astrogliosis y acumulación de A β (Gutiérrez et al., 2019). En sentido contrario, se ha descrito, también en modelos de EA, que el déficit de CCR2 y CCL2 agrava la progresión de la patología, acelerando los déficits de memoria, la patología A β y la mortalidad (El Khoury et al., 2007; Naert y Rivest, 2011; Kiyota et al., 2013). Sin embargo, no está claro si este papel beneficioso propuesto para CCL2/CCR2 es debido a las CDM, ya que existen múltiples evidencias que apuntan hacia los macrófagos perivasculares (El Khoury et al., 2007; Hawkes y McLaurin, 2009; Mildner et al., 2011). Por tanto, considerando las importantes discrepancias descritas, la utilidad de estas aproximaciones para estudiar la función de las CDM infiltradas es cuestionable.

CD163, uno de los principales marcadores empleados en este proyecto, es un receptor *scavenger* de membrana que se expresa de forma predominante en monocitos y CDM. Varios estímulos pueden desencadenar su escisión por la metaloproteasa ADAM17 (Etzerodt et al., 2010; Etzerodt et al., 2014), con función α -



secretasa (Qian et al., 2016; Hartl et al., 2020), originando un péptido truncado soluble (sCD163). Se ha descrito que sCD163 puede actuar como citoquina antiinflamatoria e inhibir la proliferación de linfocitos (Högger y Sorg, 2001; Frings et al., 2002; Timmermann et al., 2004; O'Connell et al., 2017), por lo que el aumento en la expresión de CD163 en los pacientes de EA podría implicar un aumento de este factor soluble. De hecho, se ha descrito un aumento importante de sCD163 a nivel periférico en pacientes con ictus isquémico (O'Connell et al., 2017), y en pacientes de esclerosis múltiple, que podría ser indicativo de la activación de las CDM y tener un efecto inhibitorio sobre el sistema inmune adaptativo y antiinflamatorio (Fabriek et al., 2007; Stilund et al., 2014). Por otra parte, sCD163 aumenta en el LCR de pacientes de Parkinson de forma paralela a la neurodegeneración. Sin embargo, este aumento se asocia a una activación de la inmunidad adaptativa, a un aumento de permeabilidad de la BHE ya la infiltración de monocitos y/o linfocitos (Nissen et al., 2020). Por tanto, aunque existan discrepancias acerca de su papel en la regulación de linfocitos, el estudio de sCD163 en pacientes de Alzheimer a nivel periférico podría ser de gran interés como un potencial biomarcador de la patología, que podría relacionarse con la activación e infiltración de CDM.

Debido a nuestro fracaso con las estrategias usadas para identificar a la población celular infiltrada y, sobre todo, para conocer su papel en la patología de Alzheimer, actualmente estamos caracterizando un modelo de depleción microglial *Csf1rflox/flox x Cx3cr1cre* con patología amiloide (con mutación adicional APP) o neurofibrilar (con mutación TAU), que podría ayudarnos a conocer el papel de las CDM en el parénquima cerebral en la EA. Una vez aclarada su función, se podrían desarrollar aproximaciones terapéuticas para facilitar su entrada al SNC con el fin de reemplazar a una microglía disfuncional o insuficiente para combatir la patología de Alzheimer (Cronk et al., 2018; Shemer et al., 2018). También podrían desarrollarse estrategias para favorecer el eje CCL2/CCR2, favoreciendo el flujo de monocitos y CDM al cerebro (Guedes et al., 2018). En el caso de desempeñar un papel perjudicial, podría bloquearse su entrada, así como la de los linfocitos, mediante estrategias farmacológicas similares a las propuestas para tratar la esclerosis múltiple y otras patologías que implican aumento de permeabilidad de la BHE (Ajami et al., 2018). En este sentido, existen actualmente fármacos inhibidores de quimioquinas y sus receptores, aprobados para otras patologías autoinmunes, inflamatorias o infecciosas (Martin y Delarasse, 2018; Robichon et al., 2020), que también podrían dificultar la entrada de las células inmunes periféricas en el SNC. Estas células, mucho más accesibles que las residentes, podrían ser reguladas, además, mediante vacunación basada en células dendríticas (Brezovakova et al., 2018), o eliminadas de forma periférica sin necesidad de desarrollar fármacos que sean capaces de atravesar la BHE. También pueden ser usadas para introducir al SNC moléculas de interés (Böttcher et al., 2019) o moduladas de forma específica mediante liposomas dirigidos hacia CD163 (Tentillier et al., 2016).

En conclusión, en este trabajo hemos demostrado que existe infiltración de CDM en el parénquima cerebral de pacientes de Alzheimer. Esta infiltración probablemente sea debida a un conjunto de factores, entre los que podemos destacar la alteración vascular, el reclutamiento mediante el eje CCL2/CCR2, con la



consiguiente transmigración de las CDM a través de la BHE para acceder al SNC, y una alteración de la función o nicho glial. Su presencia en el SNC está claramente asociada a una patología más severa, de forma que las CDM pueden contribuir a una respuesta proinflamatoria y neurotóxica o, por el contrario, ser una consecuencia de la EA avanzada, por lo que, aunque tuvieran un papel beneficioso, su entrada ocurre cuando la enfermedad se encuentra en estadios demasiado avanzados. En cualquier caso, debido a su potencial utilidad como diana terapéutica, son necesarios estudios futuros para dilucidar la causa de esta infiltración y, sobre todo, la función que estas células desarrollan en el SNC.

ÁMBITO- PREFIJO
GEISER

Nº registro

00008745e2000059958**CSV****GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a****DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN****<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>****FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO****23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular**

5. CARACTERIZACIÓN DE SUBPOBLACIONES O ESTADOS DE ASTROCITOS Y MICROGLIA EN PACIENTES DE ALZHEIMER MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA FLUORESCENTE MÚLTIPLE

A pesar de que la caracterización detallada de las células gliales es indispensable para entender su función en la patología de Alzheimer y otros procesos neurodegenerativos, su abordaje técnico presenta limitaciones importantes, como se demuestra en el presente trabajo. Actualmente existen técnicas transcriptómicas que permiten analizar un número elevado de marcadores en una misma célula, como la secuenciación de ARN en células aisladas de tejido congelado (Srinivasan et al., 2020) o la transcriptómica de núcleo individual (Grubman et al., 2019; Mathys et al., 2019; Zhou et al., 2020), pero que, además de presentar importantes limitaciones (Thrupp et al., 2020), no aportan información de la morfología y localización tisular, como lo hacen las técnicas inmunohistoquímicas clásicas. Sin embargo, estas técnicas de imagen impiden el análisis simultáneo de un gran número de proteínas en el mismo tejido. Gracias a una estancia predoctoral de 5 meses en el laboratorio de los doctores Alberto Serrano-Pozo y Bradley Hyman, en el *Massachusetts General Hospital (Harvard Medical School, Estados Unidos)*, hemos podido poner a punto una novedosa aproximación experimental que permite estudiar, por primera vez y de forma cuantitativa, hasta 17 marcadores diferentes de una misma célula del cerebro de pacientes de Alzheimer, sin perder detalles morfológicos y de distribución espacial en el tejido.

La metodología, basada en la inmunohistoquímica fluorescente, aumenta de forma considerable el número de antígenos estudiados, proporcionando un perfil de expresión proteico y morfológico completo a nivel de célula única. La técnica, además, preserva bien las estructuras, y permite caracterizar de forma simultánea varios fenotipos celulares, aunque posean alta co-expresión de antígenos, así como establecer las relaciones espaciales entre dichas células y los rasgos neuropatológicos de la enfermedad de Alzheimer (placas amiloides y ovillos neurofibrilares). Por tanto, aporta una información amplia, robusta y completa de la expresión proteica, morfología y distribución de las células gliales en el tejido cerebral, así como su posible relación con otros rasgos neuropatológicos de la EA.

Además, la inmunohistoquímica fluorescente múltiple puede aplicarse de forma sencilla y paralela a un número elevado de muestras. De hecho, aunque establecer la secuencia adecuada de anticuerpos requiere cierto tiempo, el protocolo es relativamente rápido una vez optimizado. En este sentido, en función de las características del microscopio y de los anticuerpos disponibles, podría plantearse utilizar incluso un mayor número de antígenos en cada ciclo.

La limitación más importante de esta técnica es la reactividad cruzada, que podría detectar señales de rondas previas y originar falsos positivos. Este problema lo hemos minimizado en nuestro protocolo realizando etapas de desnaturalización de anticuerpos y *quenching* de fluorescencia, así como estableciendo la secuencia más adecuada con los anticuerpos primarios; empezamos por los anticuerpos que



producen una señal más tenue o que están dirigidos contra las proteínas menos abundantes, y terminamos con los que originan una señal más intensa o dirigidos contra las proteínas más abundantes. Como control interno, en cada ciclo alternamos marcadores microgliales y astrogiales producidos en ratón *versus* conejo, lo que nos permite comprobar la morfología de las células que se marcan en el ciclo y descartar reactividad cruzada con los anticuerpos primarios del ciclo previo. Aunque otros autores han descrito métodos similares empleando anticuerpos primarios marcados con fluoróforos, que eliminan el riesgo de reactividad cruzada (Gerdes et al., 2013; Lin et al., 2018), el uso de anticuerpos secundarios en nuestro protocolo tiene la ventaja de amplificar la señal y aumentar la sensibilidad. Para reducir el daño del tejido tras varios ciclos de inmunohistoquímica, después de cada ciclo retiramos el cubreobjetos con un tampón con detergente suave. Sin embargo, siguen existiendo las limitaciones asociadas a la inmunohistoquímica fluorescente tradicional y al uso de muestras humanas.

Existen otras técnicas novedosas capaces de aportar información conjunta de múltiples marcadores, junto a la identidad celular, morfología y distribución, entre las que destacan el sistema comercial NanoString nCounter (Prokop et al., 2019), la combinación de transcriptómica espacial y secuenciación *in situ* (Chen et al., 2020a), *imaging mass cytometry* (Giesen et al., 2014), la secuenciación de ARN *in situ* fluorescente (FISSEQ, del inglés *fluorescent in situ RNA sequencing*) (Lee et al., 2014), *multiplexed ion beam imaging* (MIBI) (Angelo et al., 2014), *co-detection by indexing* (CODEX) (Goltsev et al., 2018) y *DNA Exchange Imaging* (DEI) (Wang et al., 2017). Sin embargo, todas ellas requieren una elevada especialización técnica, instrumental y de reactivos, por lo que no están al alcance de muchos laboratorios. En este sentido, nuestra metodología sólo requiere un microscopio de fluorescencia y reactivos comerciales estándares. Además, las técnicas mencionadas anteriormente se basan en la expresión de ARNm, por lo que una integridad baja del ARN (habitual en muestras de bancos de cerebros), puede afectar negativamente a los resultados (Bakken et al., 2018; Slyper et al., 2020). La inmunohistoquímica fluorescente múltiple detecta de forma directa antígenos proteicos, más estables que el ARN, por lo que resuelve esta limitación. Además, permite al investigador seleccionar para cada muestra la secuencia de anticuerpos específicos en función de su hipótesis, ofrece gran versatilidad y tiene un coste razonable. Por otro lado, estas técnicas de imagen con fluorescencia poseen una resolución muy elevada respecto a las de amplificación enzimática o disección láser (Lin et al., 2018). Otra ventaja es que permite emplear muestras embebidas en parafina, que es como generalmente las proporcionan los bancos de tejido. Además, su uso permite reducir las necesidades de tejido, lo que resulta muy útil en el caso de muestras humanas con escasa disponibilidad. En conjunto, todas estas ventajas hacen que esta metodología pueda ser fácilmente implementada en el laboratorio para caracterizar cualquier tipo de célula, sin necesidad de equipamiento caro ni altamente especializado.

En los datos preliminares que hemos obtenido para poner a punto esta metodología hemos observado diferencias claras en la microglía y astrocitos de enfermos de Alzheimer respecto a controles sanos de edad similar. Además, nuestros resultados preliminares sugieren una gran heterogeneidad glial tanto en el cerebro



envejecido normal como en la EA. Sin embargo, se requiere trabajo adicional para obtener conclusiones fiables. Actualmente estamos trabajando en el desarrollo y optimización de técnicas adecuadas para el análisis, como técnicas de reducción de múltiples dimensiones (WCNA y clusterización espectral), y de aprendizaje automático o *Machine Learning*. Además, pensamos ampliar la cohorte de pacientes y las áreas cerebrales estudiadas, incluyendo individuos que han participado en ensayos clínicos, resilientes a la EA o que presentan otras enfermedades neurodegenerativas.

En conclusión, la inmunohistoquímica fluorescente múltiple es una herramienta simple, accesible, robusta, versátil y con elevada resolución, que presenta enorme interés para profundizar en el estudio de las células gliales y otros tipos celulares en la EA. En este sentido, esta técnica también promete ser muy útil para diferenciar las CDM de las células microgliales en nuestras muestras de cerebros de Alzheimer, tras el análisis de las proteínas específicas cuyos genes hemos caracterizado en este trabajo.



6. CONCLUSIONES Y REFLEXIÓN FINAL

El desarrollo de terapias que frenen o, al menos, retrasen el avance de la patología asociada al Alzheimer es uno de los principales retos biomédicos a los que se enfrenta nuestra sociedad. Los continuos fracasos terapéuticos, basados principalmente en la hipótesis de la cascada amiloide (Muñoz-Castro et al., 2020), han promovido el desarrollo de hipótesis alternativas en las que la respuesta inmune, tanto central (mediada por microglía y astrocitos) como periférica, desempeña un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad (Heneka et al., 2015). En esta línea, en el presente trabajo de Tesis Doctoral planteamos que la progresión de la patología está asociada a una disfunción de las células gliales, que puede contribuir a la neurodegeneración típica de la EA, y, junto a otros factores, a la infiltración de células inmunes periféricas en el SNC.

Para afrontar este proyecto, nos hemos centrado en el estudio de la respuesta inmune y glial en el hipocampo y corteza frontal con la progresión de la patología de EA, que presentan un patrón de distribución contrario (en cierto grado) de las patologías A β y Tau. En este sentido, nuestros resultados reflejan que en la corteza frontal se produce una acumulación de A β más temprana (desde el estadio Braak III-IV) e intensa que en el hipocampo. Además, ambas regiones presentan una severa degeneración de neuronas PV+, que podría estar mediada por la patología Tau y la reactividad astrogliar.

En este trabajo también proponemos que los **astrocitos** presentan un fenotipo disfuncional en la EA, con un perfil transcripcional reactivo e hipometabólico, reforzando así la hipótesis de que la disfunción astrogliar podría estar implicada en la progresión de la enfermedad (Lian et al. 2015; Masgrau et al., 2017; Acosta et al., 2017; McAvoy y Kawamata, 2019). La disfuncionalidad astrogliar propuesta en este proyecto, parece ser responsable de una menor protección astrogliar y una activación de la respuesta del complemento, que, junto a la respuesta inflamatoria (Heneka et al., 2015, Zulfiqar et al., 2019), podrían estar implicadas en las deficiencias sinápticas y la neurodegeneración asociadas a la EA. Por tanto, destacamos la importancia de un adecuado metabolismo y función astrogliar para la salud del SNC. Las formas solubles de A β y/o Tau, ya sea directamente o a través de la microglía, son factores que participan en el desarrollo de este fenotipo disfuncional de los astrocitos, que además es compatible con un proceso de senescencia celular (fenotipo SASP) y/o resistencia a la insulina.

A diferencia de lo observado en la reactividad astrogliar, la respuesta de la **microglía** en la EA manifiesta heterogeneidad regional. Mientras que en el hipocampo de pacientes de EA se produce una respuesta microglial parcial o atenuada (este trabajo, Sanchez-Mejias et al., 2016), en la corteza frontal nuestros resultados reflejan un aumento en la activación microglial acompañado de una disminución en el fenotipo homeostático. Este efecto parece estar mediado, al menos en parte, por la patología amiloide. Por tanto, las diferencias en el tiempo y grado de acumulación de A β y Tau, así como en las formas de agregación que estas proteínas



anómalas presenten, podrían mediar las distintas respuestas microgliales existentes en pacientes de Alzheimer.

Por otra parte, nuestros resultados apuntan hacia la existencia de **infiltración de CDM** en el parénquima cerebral de pacientes de Alzheimer. Esta infiltración probablemente es debida a un conjunto de factores, entre los que podemos destacar la alteración vascular, el reclutamiento mediante el eje CCL2/CCR2, con la consiguiente transmigración de las CDM a través de la BHE, y una alteración de la función o nicho glial. Debido a la limitada infiltración de CDM en modelos, y a las diferencias de marcadores entre ratones y humanos (Ludewig et al., 2016), la traslacionalidad de los experimentos en animales es muy limitada y no nos ha permitido concluir el tipo y función de las células infiltradas. En cualquier caso, la presencia de CDM en el SNC de enfermos de Alzheimer está claramente asociada a una patología más severa, de forma que pueden contribuir a una respuesta proinflamatoria y neurotóxica, como ocurre en otras patologías neurodegenerativas (Yamasaki et al., 2014; Varvel et al., 2016), o, por el contrario, ser una consecuencia de la EA avanzada, por lo que, aunque tuvieran un papel beneficioso o nulo, su entrada sería incapaz de frenar una enfermedad en estadios demasiado avanzados.

Este proyecto también refleja las importantes discrepancias existentes entre pacientes y modelos de EA, incapaces de reproducir de forma adecuada todos los rasgos patológicos de la enfermedad. Por ello, este trabajo, basado principalmente en el estudio de la patología humana, presenta un alto valor para comprender el papel de las células inmunes y gliales en la EA y, en consecuencia, poder dar respuestas al continuo fallo de traslación de los estudios en modelos a la clínica humana.

Sin embargo, realizar el estudio en muestras de pacientes también conlleva una serie de limitaciones. Entre ellas, podemos destacar la pérdida de celularidad en nuestros estudios transcriptómicos, realizados en tejido total. En consecuencia, resulta indispensable validar estos resultados mediante técnicas inmunohistoquímicas. En este sentido, puede ser de gran utilidad la **inmunohistoquímica fluorescente múltiple**, desarrollada durante una estancia predoctoral en el laboratorio de los Dr. Alberto Serrano y Bradley Hyman. Esta herramienta es simple, accesible, robusta, versátil y presenta una elevada resolución. Por lo que nos va a permitir en un futuro próximo profundizar en el estudio de los diferentes fenotipos gliales a nivel de célula única, sin perder detalles morfológicos y de distribución espacial en el tejido. Con ella, podremos concluir si los diferentes perfiles funcionales que hemos descrito para las células gliales de cerebros de EA describen a toda la población o corresponden a diferentes estados o subpoblaciones. Además, promete ser muy útil para diferenciar las CDM de la microglía empleando los marcadores descritos en este proyecto.

Esta técnica también nos permitirá analizar de forma simultánea los fenotipos microgliales y astrogliales, con el fin de estudiar la relación astrocitos-microglía. Debido a la dificultad de afrontar este abordaje con nuestras muestras humanas, también planteamos continuar el proyecto mediante estudios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, tal y como hemos explicado previamente. Considerando la estrecha



interacción existente entre las diferentes células del SNC es indispensable un abordaje global para comprender el papel desempeñado por la glía y las células inmunes periféricas en la EA. En este sentido, las citoquinas y otros factores liberados por la microglía pueden modificar el fenotipo astrogliar y viceversa (Lian et al., 2016; Liddelow et al., 2017; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018; Vainchtein y Molofsky, 2020). En esta interacción desempeña un papel fundamental el sistema del complemento, ya que la activación microglial asociada a la EA podría contribuir a la activación de la cascada del complemento en los astrocitos, que alteraría, a su vez, la función y fagocitosis microglial. Por tanto, resulta indispensable continuar este proyecto para mejorar la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la comunicación y cooperación de las células gliales, lo que va a modular la evolución de la patología, y, en definitiva, la supervivencia y función neuronal.

En conjunto, proponemos que en pacientes de EA se produce una importante alteración glial, caracterizada por un aumento en la respuesta reactiva y neurotóxica, pero sobre todo por una disminución en las funciones homeostáticas y protectoras. Este papel dual podría facilitar y permitir, en presencia de otros factores, la infiltración de CDM mediante la liberación de quimioquinas atrayentes, alteraciones en la unidad neurovascular, disminución de las funciones reguladoras y depleción parcial del nicho microglial. De forma que postulamos la disfunción microglial, astrogliar e inmune como mecanismo patogénico fundamental en la EA. Aunque los mecanismos asociados a la EA no pueden entenderse de forma aislada, estos resultados nos acercan hacia la comprensión de la patología. Por tanto, son una herramienta traslacional muy valiosa para evaluar potenciales estrategias diagnósticas y terapéuticas dirigidas hacia una modulación glial e inmune. Ya que, como dijo Ben Barres “*glia already know how to save neurons, whereas neuroscientists still have no clue*” (la glía ya sabe cómo salvar a las neuronas, mientras que los neurocientíficos aún no tienen ni idea) (Barres, 2008).



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



F. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



1. La corteza frontal de pacientes de Alzheimer, aunque presenta patología neurofibrilar, se caracteriza principalmente por una importante acumulación de A β , que es más temprana e intensa que en el hipocampo. Además, tanto en corteza frontal como en hipocampo, se produce una severa degeneración de neuronas PV+, probablemente mediada por especies tóxicas de Tau y la reactividad astrogliar.
2. En la enfermedad de Alzheimer la respuesta microglial, al igual que otros rasgos patológicos, varía según la región cerebral estudiada. Así, en la corteza frontal de pacientes no se produce, como en el hipocampo, una disminución en la población microglial, pero sí una alteración hacia un fenotipo activo que podría estar mediado por especies de A β .
3. Tanto en hipocampo como en corteza frontal de pacientes de Alzheimer se produce una reactividad astrogliar generalizada, que parece ser responsable del aumento en la respuesta del complemento. Dicha astrocitosis progresa con las patologías amiloide y neurofibrilar, y podría estar mediada por la microglía. La acción conjunta de astrocitos y microglía activaría los mecanismos de destrucción sináptica y toxicidad neuronal, contribuyendo a la progresión de la patología.
4. En la EA, los astrocitos sufren un proceso metabólico disfuncional mediado por las formas solubles de A β y/o Tau. En concreto, presentan alteración en el metabolismo de la glucosa, el ciclo de Krebs, la síntesis de colesterol, y el transporte de ácidos grasos al interior mitocondrial. Esta reprogramación metabólica astrogliar está asociada, más que a una ganancia de función tóxica, a una disminución en las funciones neuroprotectoras de los astrocitos.
5. En múltiples regiones del parénquima cerebral de pacientes de Alzheimer se produce infiltración de CDM como consecuencia de un conjunto de factores, entre los que destacamos la alteración vascular, el reclutamiento a través del eje CCL2/CCR2 que favorece la transmigración a través de la BHE, y la alteración general de la función glial. La presencia de CDM en el SNC se asocia claramente a una patología más severa. Estas células podrían contribuir a la respuesta proinflamatoria y neurotóxica, o ser consecuencia de la EA avanzada, por lo que, aunque tuvieran un papel beneficioso, resultarían poco eficaces para compensar los daños de una enfermedad en estadios demasiado avanzados.
6. Hemos desarrollado una novedosa aproximación experimental que nos permite, por primera vez, estudiar de forma cuantitativa y con elevada resolución, hasta 17 marcadores gliales diferentes, en una misma muestra de pacientes de Alzheimer y sin perder la celularidad, morfología y distribución espacial. La inmunohistoquímica fluorescente múltiple es una herramienta robusta, simple, accesible y versátil, y presenta grandes ventajas respecto a la inmunohistoquímica tradicional. Su uso de manera sistemática nos permitirá en un futuro profundizar en la firma molecular de la microglía y los astrocitos en la enfermedad de Alzheimer, así como caracterizar mejor las CDM infiltradas en el parénquima de los enfermos de Alzheimer.



7. Proponemos que en pacientes de EA se produce una importante disfunción glial, caracterizada por un aumento en la respuesta reactiva y neurotóxica, pero sobre todo por una disminución en las funciones homeostáticas y protectoras. Este papel dual podría facilitar y permitir, en presencia de otros factores, la infiltración de CDM. Por tanto, postulamos que la disfunción microglial, astrogial e inmune constituyen un mecanismo patogénico fundamental en la EA, y, como consecuencia, una herramienta muy valiosa para evaluar potenciales estrategias diagnósticas y terapéuticas futuras.



1. Frontal cortex of AD patients, although having neurofibrillary pathology, is mainly characterized by an important accumulation of A β starting at early stages (Braak III-IV). Moreover, this amyloid pathology is more severe than in the hippocampus. In both brain regions there is an important degeneration of PV + neurons that could be mediated by toxic Tau species and astrocyte reactivity.
2. In Alzheimer's disease, the microglial response depends on the brain region studied, like other pathological features. In the frontal cortex of AD patients, unlike the hippocampus, there is no decrease in the microglial population and an alteration towards an active phenotype that could be mediated by A β .
3. A generalized astroglial reactivity occurs in AD patients' hippocampus and frontal cortex, which seems to be responsible for the upregulation in the complement response. This astrocytic response progresses with amyloid and neurofibrillary pathologies and could be mediated by microglia. Consequently, astrocytes and microglia activate the mechanisms of synaptic destruction and neuronal toxicity, contributing to the progression of the disease.
4. In AD, soluble forms of A β and/or Tau mediate a dysfunctional metabolic process in astrocytes. Astrocytes show alterations in glucose metabolism, citric acids cycle, cholesterol synthesis, and fatty acids transport into the mitochondria. This astroglial metabolic reprogramming is associated with a decrease in the neuroprotective functions of astrocytes, rather than with a gain in toxic function.
5. There is infiltration of MDC in multiple regions of AD brain parenchyma. This infiltration occurs because of several factors, among which we can highlight vascular alteration, recruitment through the CCL2 / CCR2 axis and transmigration through the BBB, and an alteration in glial function. The presence of MDC in the CNS is clearly associated with a more severe pathology. These cells could contribute to the pro-inflammatory and neurotoxic response or, on the contrary, be a consequence of advanced AD, so that, although they might have a beneficial role, they would not be effective in compensating the damage in such advanced stages.
6. We have developed a novel experimental approach that allows, for the first time in AD, to study in a quantitative way and with high resolution, up to 17 different glial markers, in the same section and without losing cellularity, morphology and spatial distribution. Multiplex fluorescent immunohistochemistry is a robust, simple, accessible and versatile tool, and it has great advantages over traditional immunohistochemistry. Its systematic use will allow us to delve into the molecular signature of microglia and astrocytes, as well as better characterize infiltrated MDC in AD.
7. We propose that AD courses with a significant glial dysfunction, characterized by an increase in the reactive and neurotoxic response, but mainly by a decrease in homeostatic and protective functions. This dual role could facilitate and allow, in the presence of other factors, the infiltration of MDC. Thus, we postulate microglial, astroglial and immune dysfunction as a fundamental pathogenic mechanism in AD and, consequently, a valuable tool for evaluating potential diagnostic and therapeutic future strategies.



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

G. ANEXO I: Figuras suplementarias

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

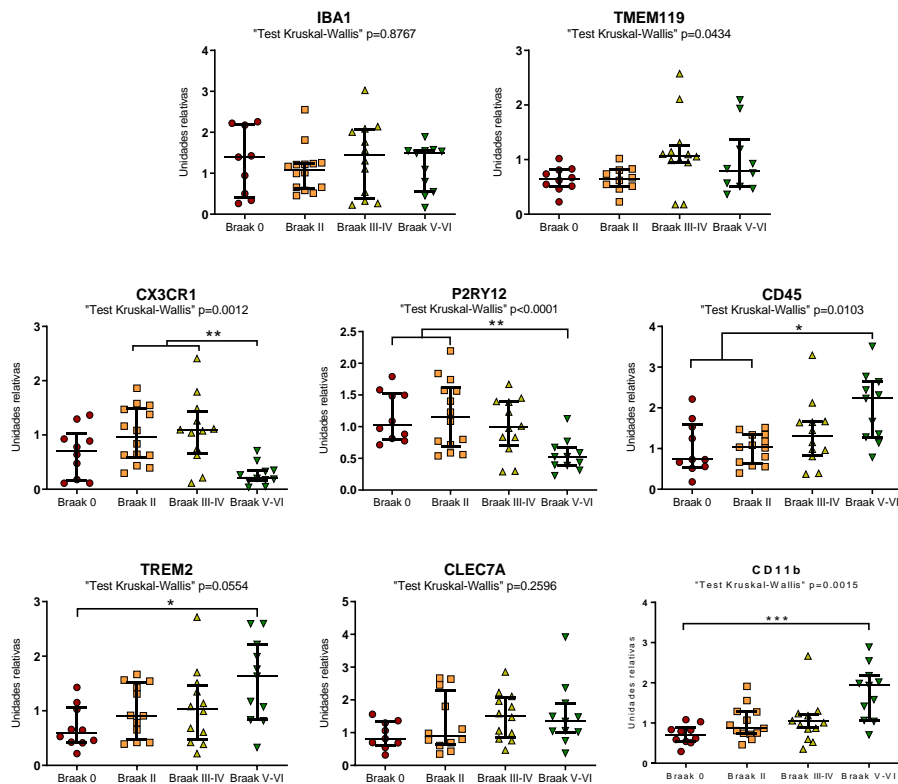


Figura S1. Expresión de ARNm de diferentes genes microgliales en muestras *post mortem* de corteza frontal. Expresión relativa medida mediante RT-PCR en tiempo real en corteza frontal de individuos Braak 0 (n=9-11), II (n=12-14), III-IV (n=12) y V-VI (n=11-19). Se indican los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

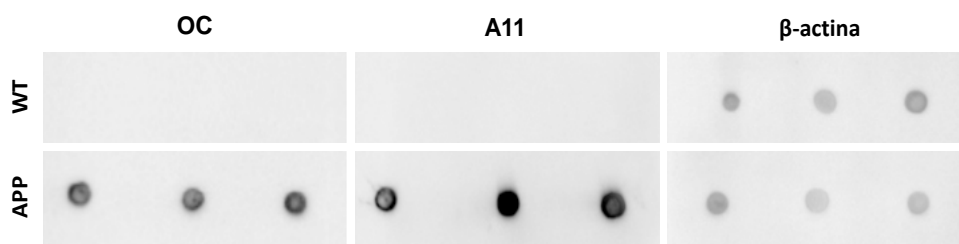


Figura S2. Presencia de formas oligoméricas de Aβ en las fracciones solubles S1 de modelos APP de 12 meses. Análisis, mediante dot blot, de las formas solubles oligoméricas (OC y A11 positivas) en fracciones S1 de animales WT y APP de 12 meses.



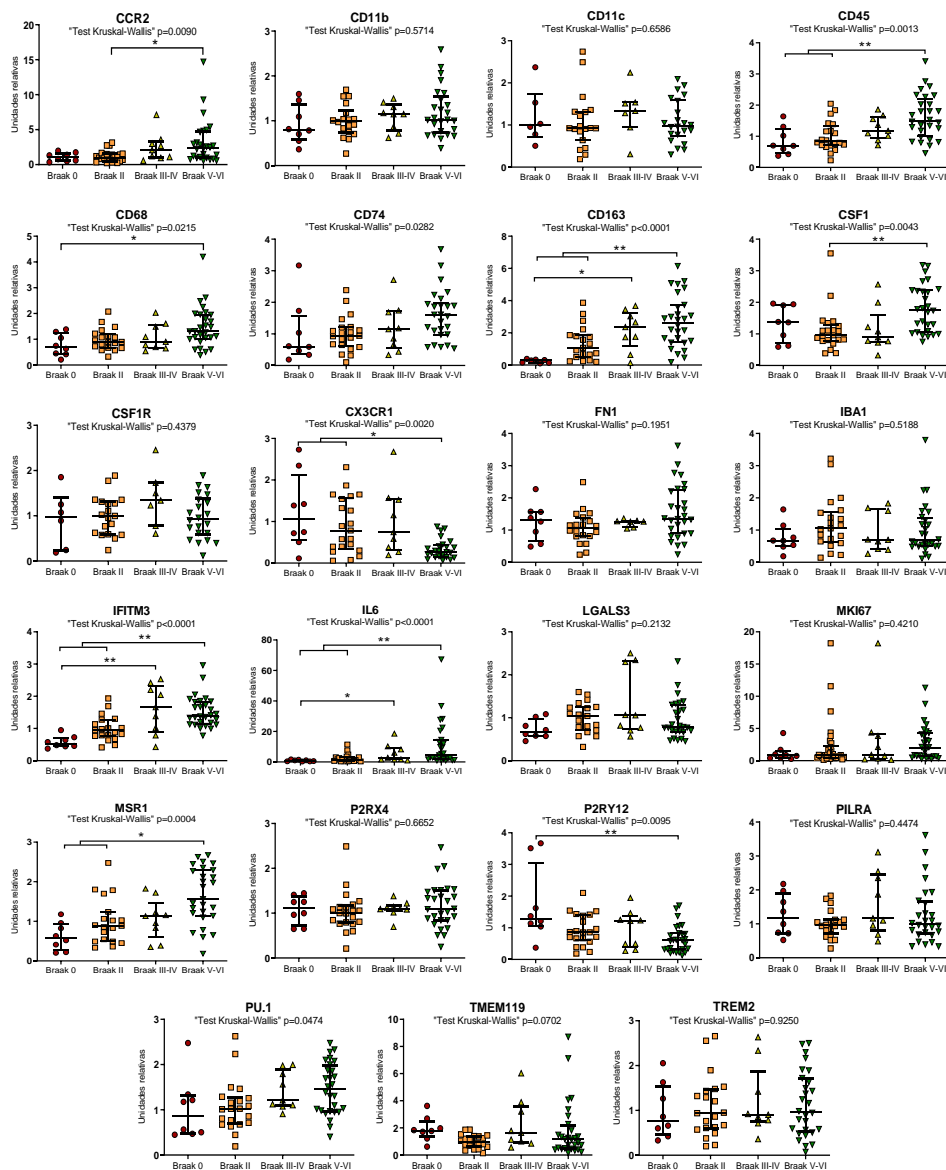


Figura S3. Expresión de ARNm de diferentes genes clásicamente expresados por células microgliales y/o CDM en muestras *post mortem* humanas. Expresión relativa medida mediante RT-PCR en tiempo real en el hipocampo de individuos Braak 0 (n=8), II (n=21), III-IV (n=9) y V-VI (n=28). Se representan los valores individuales de cada muestra, así como la mediana y los rangos intercuartílicos de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn (*p<0,05; **p<0,01).



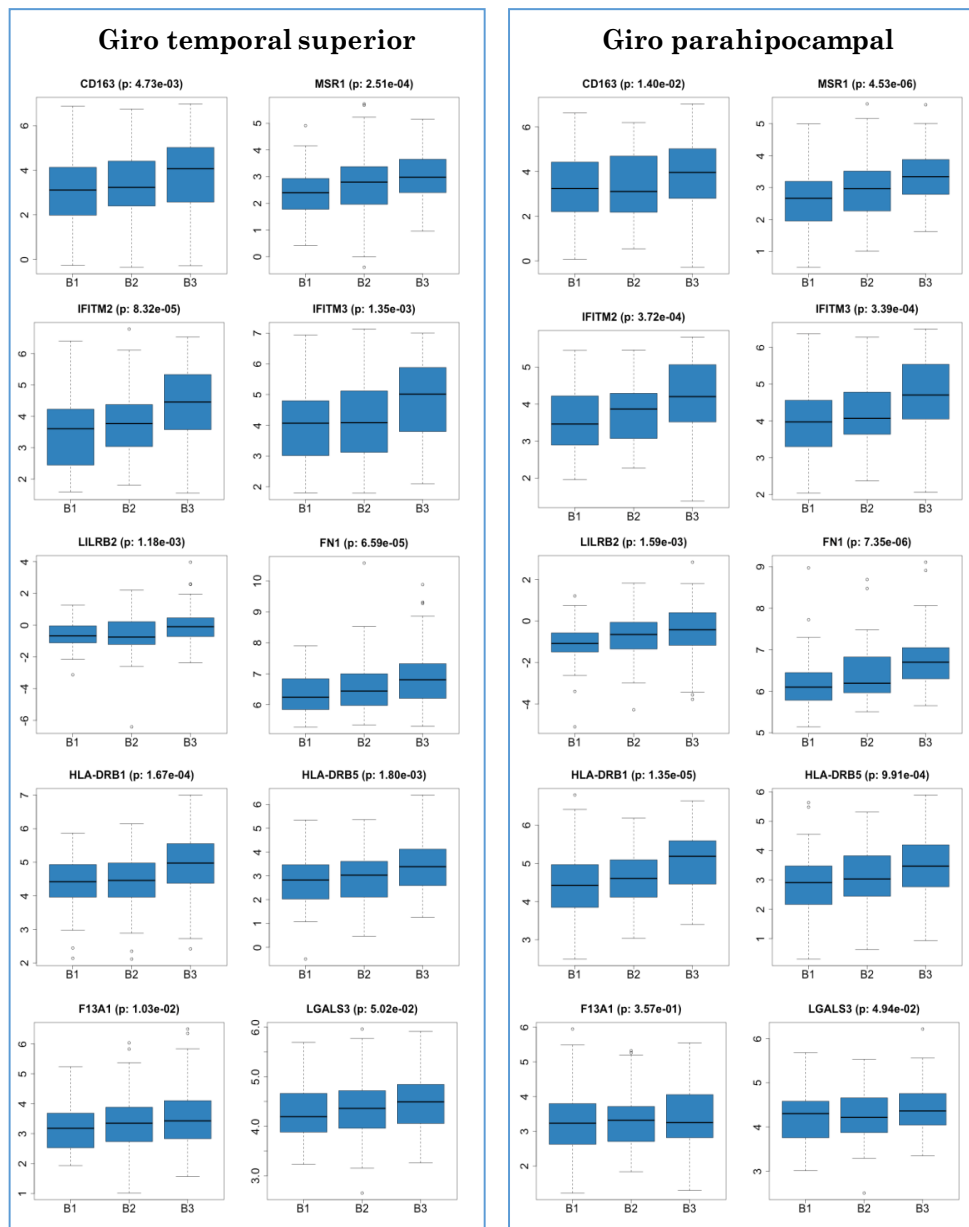


Figura S4. Aumento de los niveles de ARNm de genes de CDM en giro temporal superior y giro parahipocampal en pacientes Braak V-VI respecto a controles. Se representa la expresión relativa de los genes CD163, MSR1, IFITM2, IFITM3, LILRB2, FN1, HLA-DRB1, HLA-DRB5, F13A1 y LGALS3 en giro temporal superior (GTS) y giro parahipocampal (GPH) con la progresión de la patología de EA [B1 = Braak 0-II, n=58 (GTS) y 62 (GPH), B2 = Braak III-IV, n=72 (GTS) y 54 (GPH), B3 = Braak V-VI, n=87 (GTS) y 70 (GPH)]. Los niveles de los genes se obtuvieron de la base de datos del Mount Sinai Brain Bank. Se representan los datos utilizando un diagrama de caja (*Box and whisker plot*) que refleja la mediana, los rangos intercuartílicos, el valor mínimo y el valor máximo de los grupos representados. La significancia se ha analizado mediante la prueba ANOVA seguido del test de comparación múltiple Tukey, considerando significativo los valores de $p < 0.05$. Análisis cedido por los doctores Alberto Serrano-Pozo y Sudeshna Das.



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

H. SUMMARY

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

1. INTRODUCTION

Alzheimer's Disease (AD) is a progressive and irreversible neurodegenerative disorder, characterized by cognitive decline and behavioral alterations. AD patients suffer a selective neuronal death in brain regions which is implicated in progressive memory loss, severe personality disorders, cognitive alterations, spatial and temporal disorientation, anxiety, insomnia and dementia (Hane et al., 2017b; Kumar and Tsao, 2019). This progressively disabling and ultimately fatal disease is responsible for most cases of dementia (Robinson et al., 2017; OMS, 2020). The global prevalence of dementia has been estimated to be around 50 million (Alzheimer's Disease International, 2019) and, considering the aging of the population, is predicted to triple in 2050 (Robinson et al., 2017; Alzheimer's Disease International, 2019; Kumar and Tsao, 2019). Therefore, AD is a serious public health issue (Robinson et al., 2017) that will get worse in the future. However, the cause (or probably causes) and molecular mechanisms of this disease remain unclear yet, and there is no effective pharmacological therapy to treat or palliate AD (Hane et al., 2017b; Kumar and Tsao, 2019; Muñoz-Castro et al., 2020).

Based on the onset age, incidence and etiology, we can define two types of AD (familial and sporadic AD) (Gomez-Isla et al., 2008; Perl, 2010; Ballard et al., 2011; Bagyinszky et al., 2014). Familial AD is an uncommon form of this disease that occurs before the age of 60 (usually between 30 and 40 years of age) and follows an autosomal dominant inheritance pattern (Bertram et al., 2010; Karch et al., 2014; Calero et al., 2015; Ringman et al., 2015; Hane et al., 2017a; Robinson et al., 2017; Kumar and Tsao, 2019). On the other hand, sporadic AD is responsible for most cases of AD and its symptoms appear after 60 years of age. Though multiple risk factors have been associated with the onset and progression, its etiology is still unknown (Ballard et al., 2011; Scheltens et al., 2016; Robinson et al., 2017; Kumar and Tsao, 2019).

Both forms of AD share symptomatology, histopathological lesions and anatomopathological features (Gomez-Isla et al., 2008; Perl, 2010; Ballard et al., 2011; Bagyinszky et al., 2014; Scheltens et al., 2016), being mostly affected brain regions implicated in memory and language (DeTure and Dickson, 2019). The main microscopical alterations observed in AD patients are (1) synaptic loss, neuronal degeneration and neuritic pathology (Duyckaerts et al., 2009; Torres et al., 2012; Sanchez-Varo et al., 2012; Forner et al., 2017; Hane et al., 2017a), (2) accumulation of extracellular A β plaques and soluble forms (Glennner and Wong, 1984; Masters et al., 1985; Takahashi et al., 2017; Hane et al., 2017a; Kumar and Tsao, 2019), (3) intracellular hyperphosphorylated Tau neurofibrillary tangles (Spillantini and Goedert, 2013; Iqbal et al., 2016; Gao et al., 2018; Kumar and Tsao, 2019), and (4) a neuroinflammatory process mediated mainly by reactive microglia and astrocytes (Serrano-Pozo et al., 2011a; Heneka et al., 2015; Zhang and Jiang, 2015).

To date, most of the therapies used in clinical trials have been targeted, without success, against A β and Tau pathologies (Muñoz-Castro et al., 2020). In recent years, a novel hypothesis is gaining attention, suggesting that the immune



response mediated mainly by glial cells plays a crucial role in the development of the disease (Heneka et al., 2015). However, the role of immune system and glial cells in the pathological progression of AD is still to discover.

Microglia have been classically associated with the production of inflammatory and neurotoxic factors in AD (Heneka et al., 2015), which could contribute to neuronal damage and cognitive impairment (Holmes et al., 2009; Navarro et al., 2018). This idea derives mainly from transgenic mouse models (Jimenez et al., 2008; Moreno-Gonzalez et al., 2009; Baglietto-Vargas et al., 2017; Keren-Shaul et al., 2017; Gutierrez and Vitorica, 2018). However, our group described a mild and late microglial response and a significant microglial degeneration mediated by soluble forms of phospho-Tau (Sanchez-Mejias et al., 2016; Navarro et al., 2018) in AD patients' hippocampus. This result questions the neurotoxic role of microglia and suggests an insufficient beneficial effect. Moreover, there are still multiple interrogations about the functional and regional heterogeneity of microglia in the human brain in AD (Sankowski et al., 2019).

Considering the astrogliosis observed in AD patients (Verkhratsky et al., 2010; Heneka et al., 2015; Rodríguez-Arellano et al., 2016; Garwood et al., 2017), astrocytic contribution could be crucial in the appearance and progression of AD (Heneka et al., 2015). In fact, astrocytes seem to have a proinflammatory and neurotoxic effect in AD (Morales et al., 2014; Zhang and Jiang, 2015; Liddelow et al., 2017; Li et al., 2019b). However, it is not clear if this response is a cause or a consequence of the pathology. Moreover, though the specific role of astrocytes in AD is unknown, these glial cells have essential neuroprotective functions in non-pathological conditions (Vasile et al., 2017; Liddelow and Barres, 2017; Perez-Nievas and Serrano-Pozo, 2018). Therefore, astrocytes could contribute to the pathology not only producing an inflammatory or toxic effect, but also suffering an alteration of these neuroprotective functions (Farris et al., 2007; Tarasoff-Conway et al., 2015).

Glial cells are the main mediators of the immune response in the brain parenchyma in physiological conditions (Liu et al., 2014; Heneka et al., 2015; Hane et al. 2017a). Nevertheless, in AD, these cells could mediate an inflammatory environment that would facilitate, along with possible alterations in the blood brain barrier, the entry of cells from the peripheral immune system, as occurs in other neurodegenerative pathologies (Bogie et al., 2014; Zondler et al., 2016; Engelhardt et al., 2017, Prinz and Priller, 2017; Sevenich, 2018). The monocyte-derived cells, once infiltrated, could contribute to the proinflammatory and cytotoxic environment (Hohsfield et al., 2020), or perform protective functions and help dysfunctional glial cells (El Khoury et al., 2007; Naert and Rivest, 2013; Zenaro et al., 2017). However, to date, it is not clear whether peripheral myeloid cell infiltration occurs in the brain of AD patients (Hohsfield and Humpel, 2015; Prinz and Priller, 2017; Sweeney et al., 2018; Fani Maleki and Rivest, 2019).



2. AIMS

In this project, we propose a new pathogenetic scenario in AD in order to resolve some of the problems resulting in poor translation of animal research to humans. Our **hypothesis** suggests that the pathological progression of AD is associated with glial cell dysfunction, which is characterized by a high phenotypic and regional heterogeneity. In this sense, clarifying the functional glial profiles (neuroprotective, neurotoxic and/or degenerative) during the disease progression is pivotal.

Our **main objective** is to define microglial and astrocytic molecular signatures in AD patients, characterizing their morphological, regional and functional heterogeneity. Furthermore, we pretend to determine if peripheral immune cells infiltrate the central nervous system (CNS) of these patients. Therefore, our specific aims are:

1. Characterizing the main pathological features and microglial response in *postmortem* frontal cortex samples from AD patients.
2. Evaluating astrocytic response in AD pathology. We will focus on the study of AD reactivity, complement response, metabolism and neuroprotective function alterations in the context of AD pathology.
3. Clarifying if peripheral immune cells infiltrate the brain parenchyma of AD mouse models and patients.
4. Characterizing different subpopulations of astrocytes and microglia in AD patients using multiplex fluorescent immunohistochemistry.

Our results will help to unveil new mechanisms involved in AD and to identify possible targets of therapeutic interest that can be used in the development of new neuroprotective strategies.

3. METHODS

This project is based on the study of *postmortem* human hippocampus and frontal cortex samples. Human samples are classified depending on the Tau pathology present in the brain tissue, according to Braak stages (Braak and Braak, 1991). We also use APP (APPSL) and TAU (TAU P301S, Line PS19) AD models, and wildtype (WT) mice with the same genetic background (C57BL/6J) and age as controls. We generate astrocytic and neuronal primary cultures from WT mice with CD1 genetic background. In each experimental procedure, samples from different Braak stage (human) or genotypes and ages (mouse models) are processed simultaneously.

Human hippocampus and frontal cortex samples were homogenized, and RNA, DNA and proteins were isolated from each sample. We developed a reverse transcription to study genetic expression by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and TaqMan® Array Cards (Thermo Fisher Scientific). Using DNA, we identified APOE genotype for each sample, using Taqman® single-nucleotide polymorphism



genotyping assays. Total proteins were quantified by Lowry method to normalization and specific proteins of interest were analyzed by western blot. Some of these results are supported by immunohistochemical techniques, in collaboration with Dra. Antonia Gutierrez's group (Universidad de Málaga).

We have evaluated the toxicity of A β and Tau species in primary neurons. For that, we isolated neurosynaptosomes (NS) from the cortex of APP and TAU models. Results were quantified by immunocytochemistry. We extracted S1 fractions from the cortex of adult APP and TAU mice to get soluble A β and phospho-Tau forms. These soluble fractions, once quantified by micro-lowry and normalized, were used for multiple *in vitro* assays. We performed a bioenergetics analysis in primary astrocytes treated with S1 from APP models using the Agilent Seahorse XFp (Agilent) analyzer. We also evaluated by immunocytochemistry the alteration of the neuroprotective effect of S1 from APP and TAU mice in astrocytes.

Astrocytic cells were specifically isolated from the cortex and hippocampus of APP and WT mice, using a modification of Miltenyi Biotec protocol, the specific astroglial antibody ACSA2 (Kantzer et al., 2017) and *Fluorescence-activated Cell Sorting* (FACS). Next, we developed a metabolomic analysis in collaboration with Dra. Coral Barbas (Universidad San Pablo CEU). Microglia, monocytes-derived cells and lymphocytes were isolated and quantified from the cortex and hippocampus of transgenic mouse models (APP and TAU) at different ages (pre and post-pathology), with FACS. This protocol is based in the different expression profile of CD45 and CD11b in each cell type (Ford et al., 1995; Chiu et al., 2013; Goldmann et al., 2016; Rosenzweig et al., 2019). Next, we extracted RNA and perform RT-PCR to confirm their identity.

All experiments were repeated a minimum of 3 times. We performed data and statistical analysis, according to the required test in each case, using GraphPad Prism 8, IBM® SPSS® Statistics and the publicly available R programming language and statistical computing environment (version 3.6.0). We consider statistically significant differences when $p < 0.05$.

4. RESULTS AND DISCUSSION

One of the main biological challenges our society is facing is the development of new treatments, to stop, or, at least, slow AD progression. The continuous therapeutic failures, based mainly on the amyloid hypothesis (Muñoz-Castro et al., 2020), have promoted the development of an alternative hypothesis in which the immune response, central (mediated by microglia and astrocytes) and peripheral, plays a pivotal role in the development of the disease (Heneka et al., 2015). In this sense, our results propose that AD progression is associated with glial cell dysfunction, which may contribute to the neurodegeneration observed in AD, and, together with other factors, to the infiltration of peripheral immune cells in the CNS.

In this project, we have focused mainly on the study of immune and glial responses associated to AD progression in the human hippocampus and frontal cortex. These brain regions show an opposite distribution pattern (to some degree)



of the main neuropathological features. In this sense, our results demonstrate that **A β** accumulation starts at earlier stages (Braak III-IV) in frontal cortex samples and presents higher levels than in hippocampal areas (Katzman et al., 1988). Moreover, A β levels are higher in AD patients carrying APOE ϵ 4 polymorphism (Schmechel et al., 1993; Hyman et al., 1995; Polvikoski et al., 1995; Gomez-Isla et al., 1996b; McNamara et al., 1998), which could promote the early accumulation of A β (Liu et al., 2017b). Overall, the frontal cortex of AD patients, unlike hippocampus (Navarro, 2015), has a more prominent amyloid pathology when compared to Tau. This heterogeneity could lead to regional differences in other pathological aspects, such as neurodegeneration or glial response.

Our results in frontal cortex and hippocampus, together with those from previous immunohistochemical studies (Arai et al., 1987; Satoh et al., 1991; Brady and Mufson, 1997; Mikkonen et al., 1999; Takahashi et al., 2010; Sanchez-Mejias et al., 2020), show a severe death of **PV + neurons** in AD patients. Tau pathology, maybe together with other factors as the complement system, might mediate this specific neurodegeneration. Considering that PV + neurons are the main GABAergic interneurons in the neocortex (Tremblay et al., 2016), their degeneration could contribute significantly to cognitive impairment in AD patients (Palop and Mucke, 2016).

Our results show a generalized **astrocyte** reactivity in hippocampus and frontal cortex of AD patients, which seems to be responsible for the complement response (Lian et al., 2015; Lian et al., 2016; Liddelov et al., 2017). This astrocytic response progresses with amyloid and neurofibrillary pathologies and could be mediated by microglia (Liddelov et al., 2017). Consequently, microglia and astrocytes would activate synaptic destruction and neuronal toxicity mechanisms (Lian et al., 2016; Hansen et al., 2018), as PV+ neurons degeneration, contributing to the progression of the pathology.

On the other hand, also in AD, astrocytes undergo a hypometabolic process mediated by soluble forms of A β and/or Tau. Using *in vitro* models, we observe that this astroglial metabolic reprogramming is associated with a decrease in the essential protective functions of astrocytes (Valori et al., 2019; Zulfiqar et al., 2019), rather than with a gain in toxic function. To develop this beneficial function, astrocytes release essential metabolites for synaptic and neuronal maintenance (Bélanger and Magistretti, 2009; Bélanger et al., 2011; Liu et al., 2017a; Valori et al., 2019; Konttinen et al., 2019). Moreover, we observed that astrocytes show alterations in glucose and fatty acid metabolism, citric acid cycle and cholesterol synthesis in AD patients.

Therefore, we propose that astrocytes in AD have a dysfunctional phenotype, with a reactive and hypometabolic transcriptional profile, thus reinforcing the hypothesis that astrocyte dysfunction could be involved in the progression of AD (Lian et al. 2015; Masgrau et al., 2017; Acosta et al., 2017; McAvoy and Kawamata, 2019). The astrocyte dysfunction proposed in this project, together with astroglial contribution to inflammatory response (Heneka et al., 2015, Zulfiqar et al., 2019), may be implicated in synaptic deficiencies and neurodegeneration associated with AD. These effects would be produced because of a milder astroglial protection and



an activation of the complement system. Thus, we highlight the importance of a correct metabolism and astroglial function for the health of the CNS. The soluble forms of A β and/or Tau, either directly or through microglia, are factors that participate in the development of this dysfunctional phenotype of astrocytes, which is also compatible with a process of cellular senescence (SASP) and/or insulin resistance (García-Cáceres et al., 2016; Boisvert et al., 2018; Arnold et al., 2018; Han et al., 2020).

Unlike astrocyte reactivity, there is a regional heterogeneity in the response of **microglia in AD**. While a partial or attenuated microglial response occurs in AD hippocampus (this work, Sanchez-Mejias et al., 2016), our results in frontal cortex show an upregulation of activation genes and a downregulation of homeostatic markers, which could be mediated, at least in part, by the amyloid pathology (Heneka et al., 2015; Manocha et al., 2016; Gutierrez and Vitorica, 2018; Sierksma et al., 2020; Ismail et al., 2020). Consequently, microglial protective functions could be lost in exchange for a gain in toxic effect (Sarlus and Heneka, 2017; Hansen et al., 2018). A β and Tau species differences, together with time and level of accumulation, could explain these dissimilarities in microglial responses. We did not find an association between APOE genotype and microglial genes (Serrano-Pozo et al., 2013b; Olah et al., 2018). However, our limited number of samples in some subgroups does not allow us to reject the existence of a relationship (Zhu et al., 2012; Friedberg et al., 2020).

On the other hand, our results provide, for the first time in AD patients, evidence of monocyte-derived cells (**MDC infiltration**) in different brain regions. Our transcriptomic data show a significant increase of MDC markers in AD (Zhang et al., 2011b; Venteicher et al., 2017; Müller et al., 2017a; DePaula-Silva et al., 2019; Haage et al., 2020). Though other authors have previously observed this increase in some of the markers analyzed, it was related to microglial activation or to CNS-associated macrophages (Pey et al., 2014; Stratoulis et al., 2019; Masuda et al., 2020; Nguyen et al., 2020). However, our gene expression results, added to immunohistochemical studies (carried out in collaboration with Dr. Antonia Gutiérrez), show a CD163+ population in AD patients brain parenchyma which is absent in controls. These cells have a heterogeneous distribution in the hippocampal parenchyma, different from microglial, and are located mainly - but not exclusively - close to blood vessels and amyloid plaques. These data support a peripheral and non-microglial origin. In addition, cells infiltrated into the parenchyma of AD patients are negative for the CNS-associated macrophage specific marker MRC1 (Galea et al., 2005; Holder et al., 2014; Goldmann et al., 2016; Mrdjen et al., 2018), supporting a monocytic origin of the peripheral infiltration.

Our results in models and humans, together with previous studies (Malm et al., 2005; Simard et al., 2006; Wang et al., 2016; Cronk et al., 2018; Lund et al., 2018; Shukla et al., 2019; Reed-Geaghan et al., 2020; Plemel et al., 2020; Hohsfield et al., 2020), might indicate that A β and Tau pathologies would not be enough to produce MDC infiltration, in the absence of other factors, such as an alteration in the microglial niche and/or blood-brain barrier (BBB). Therefore, we propose that MDC infiltration in AD might be the consequence of multiple factors associated with the



pathology: upregulation of chemokines with the consequent transmigration of MDC through the BBB, alteration of glial function or niche, vascular alteration, and other infectious diseases, among others. These factors facilitate or mediate the entry of these cells into the CNS.

Due to the limited MDC infiltration in models, and the differences in markers between mice and humans (Ludewig et al., 2016), animal experiments did not conclude the nature or function of infiltrated cells. In any case, their presence in the CNS is clearly associated with a more severe pathology. Therefore, MDC could contribute to a pro-inflammatory and neurotoxic response (Ní Chasaide and Lynch, 2020; Hohsfield et al., 2020), like in other neurodegenerative pathologies (Yamasaki et al., 2014; Varvel et al., 2016); or, on the contrary, be a consequence of advanced AD. In that case its entry occurs in a too advanced stages to produce any course-changing effect, independently of it having a beneficial (Butovsky et al., 2007, Mildner et al., 2011; Koronyo et al., 2015; Thériault et al., 2015; Zuroff et al., 2017; Rosenzweig et al., 2019) or, even, no role at all (Varvel et al., 2015; Prokop et al., 2015; Zhu et al., 2020).

Overall, this project also reflects the significant discrepancies between patients, and AD models, unable to adequately reproduce all the pathological features of the disease. Therefore, our work - based mainly on the study of human pathology - is highly valuable to understand the role of immune and glial cells in AD.

However, human samples also have several limitations. Among them, we can highlight the loss of cellularity in our transcriptomic studies, carried out in bulk tissue. Consequently, it is essential to validate these results using immunohistochemical techniques. In this sense, **multiplex fluorescent immunohistochemistry** can be very useful. This novel technique has been developed in Dr. Serrano-Pozo and Dr. Hyman's lab, thanks to a fellowship at the Massachusetts General Hospital (Harvard Medical School; EEUU). This tool is simple, accessible, robust, versatile and has a high resolution. So, we will be able to study more in-depth glial phenotypes at single cell level, without losing morphological details and spatial distribution in the tissue. We will be able to conclude whether the different functional profiles described for glial cells are associated to the entire population or to different states/subpopulations. In addition, we could use the markers describe in this project to differentiate MDC from microglia. Moreover, this technique will also allow us to simultaneously analyze microglial and astroglial phenotypes, in order to study the astrocyte-microglia interaction.

Overall, we propose that there is an important glial alteration in AD patients, characterized by an increase in the reactive and neurotoxic response and, mainly, by a decrease in homeostatic and protective functions. This dual role could facilitate and allow the infiltration of MDC through the release of attractive chemokines, alterations in the neurovascular unit, decreased regulatory functions, and partial depletion of the microglial niche. Thus, we postulate microglial, astroglial and immune dysfunction as a fundamental pathogenetic mechanism in AD. Therefore, they are a very valuable translational tool for evaluating potential diagnostic and



therapeutic strategies directed towards glial and immune modulation. Although the mechanisms associated with AD cannot be understood in isolation, these results bring us closer to understanding the pathology. In fact, as Ben Barres said, “*glia already know how to save neurons, whereas neuroscientists still have no clue*” (Barres, 2008).

5. CONCLUSIONS

1. Frontal cortex of AD patients, although having neurofibrillary pathology, is mainly characterized by an important accumulation of A β starting at early stages (Braak III-IV). Moreover, this amyloid pathology is more severe than in the hippocampus. In both brain regions there is an important degeneration of PV + neurons that could be mediated by toxic Tau species and astrocyte reactivity.

2. In Alzheimer's disease, the microglial response depends on the brain region studied, like other pathological features. In the frontal cortex of AD patients, unlike the hippocampus, there is no decrease in the microglial population and an alteration towards an active phenotype that could be mediated by A β .

3. A generalized astroglial reactivity occurs in AD patients' hippocampus and frontal cortex, which seems to be responsible for the upregulation in the complement response. This astrocytic response progresses with amyloid and neurofibrillary pathologies and could be mediated by microglia. Consequently, astrocytes and microglia activate the mechanisms of synaptic destruction and neuronal toxicity, contributing to the progression of the disease.

4. In AD, soluble forms of A β and/or Tau mediate a dysfunctional metabolic process in astrocytes. Astrocytes show alterations in glucose metabolism, citric acids cycle, cholesterol synthesis, and fatty acids transport into the mitochondria. This astroglial metabolic reprogramming is associated with a decrease in the neuroprotective functions of astrocytes, rather than with a gain in toxic function.

5. There is infiltration of MDC in multiple regions of AD brain parenchyma. This infiltration occurs because of several factors, among which we can highlight vascular alteration, recruitment through the CCL2 / CCR2 axis and transmigration through the BBB, and an alteration in glial function. The presence of MDC in the CNS is clearly associated with a more severe pathology. These cells could contribute to the pro-inflammatory and neurotoxic response or, on the contrary, be a consequence of advanced AD, so that, although they might have a beneficial role, they would not be effective in compensating the damage in such advanced stages.

6. We have developed a novel experimental approach that allows, for the first time in AD, to study in a quantitative way and with high resolution, up to 17 different glial markers, in the same section and without losing cellularity, morphology and spatial distribution. Multiplex fluorescent immunohistochemistry is a robust, simple, accessible and versatile tool, and it has great advantages over traditional immunohistochemistry. Its systematic use will allow us to delve into the molecular signature of microglia and astrocytes, as well as better characterize infiltrated MDC in AD.



7. We propose that AD courses with a significant glial dysfunction, characterized by an increase in the reactive and neurotoxic response, but mainly by a decrease in homeostatic and protective functions. This dual role could facilitate and allow, in the presence of other factors, the infiltration of MDC. Thus, we postulate microglial, astroglial and immune dysfunction as a fundamental pathogenic mechanism in AD and, consequently, a valuable tool for evaluating potential diagnostic and therapeutic future strategies.

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

I. BIBLIOGRAFÍA

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

- Abramov E, Dolev I, Fogel H, Ciccotosto GD, Ruff E, Slutsky I.** Amyloid-beta as a positive endogenous regulator of release probability at hippocampal synapses. *Nat Neurosci.* **2009**;12(12):1567-76. doi: 10.1038/nn.2433.
- Absinta M, Ha SK, Nair G, Sati P, Luciano NJ, Palisoc M, et al.** Human and nonhuman primate meninges harbor lymphatic vessels that can be visualized noninvasively by MRI. *Elife.* **2017**;6:e29738. doi: 10.7554/eLife.29738.
- Acin-Perez R, Benador IY, Petcherski A, Veliova M, Benavides GA, Lagarrigue S, et al.** A novel approach to measure mitochondrial respiration in frozen biological samples. *EMBO J.* **2020**;39(13):e104073. doi: 10.15252/embj.2019104073.
- Acosta C, Anderson HD, Anderson CM.** Astrocyte dysfunction in Alzheimer disease. *J Neurosci Res.* **2017**;95(12):2430-2447. doi: 10.1002/jnr.24075.
- Adamsky A, Kol A, Kreisel T, Doron A, Ozeri-Engelhard N, Melcer T, et al.** Astrocytic Activation Generates De Novo Neuronal Potentiation and Memory Enhancement. *Cell.* **2018**;174(1):59-71.e14. doi: 10.1016/j.cell.2018.05.002.
- Afagh A, Cummings BJ, Cribbs DH, Cotman CW, Tenner AJ.** Localization and cell association of C1q in Alzheimer's disease brain. *Exp Neurol.* **1996**;138(1):22-32. doi: 10.1006/exnr.1996.0043.
- Aguirre-Rueda D, Guerra-Ojeda S, Aldasoro M, Iradi A, Obrador E, Ortega A, et al.** Astrocytes protect neurons from A β 1-42 peptide-induced neurotoxicity increasing TFAM and PGC-1 and decreasing PPAR- γ and SIRT-1. *Int J Med Sci.* **2015**;12(1):48-56. doi: 10.7150/ijms.10035.
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM.** Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci.* **2007**;10(12):1538-43. doi: 10.1038/nn2014.
- Ajami B, Samusik N, Wieghofer P, Ho PP, Crotti A, Bjornson Z, et al.** Single-cell mass cytometry reveals distinct populations of brain myeloid cells in mouse neuroinflammation and neurodegeneration models. *Nat Neurosci.* **2018**;21(4):541-551. doi: 10.1038/s41593-018-0100-x.
- Alarcón-Aguilar A, Luna-López A, Ventura-Gallegos JL, Lazzarini R, Galván-Arzate S, González-Puertos VY, et al.** Primary cultured astrocytes from old rats are capable to activate the Nrf2 response against MPP+ toxicity after tBHQ pretreatment. *Neurobiol Aging.* **2014**;35(8):1901-12. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.143.
- Aletrino MA, Vogels OJ, Van Domburg PH, Ten Donkelaar HJ.** Cell loss in the nucleus raphes dorsalis in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* **1992**;13(4):461-8. doi: 10.1016/0197-4580(92)90073-7.
- Ali F, Baringer SL, Neal A, Choi EY, Kwan AC.** Parvalbumin-Positive Neuron Loss and Amyloid- β Deposits in the Frontal Cortex of Alzheimer's Disease-Related Mice. *J Alzheimers Dis.* **2019**;72(4):1323-1339. doi: 10.3233/JAD-181190.
- Allaman I, Gavillet M, Bélanger M, Laroche T, Viertl D, Lashuel HA, Magistretti PJ.** Amyloid-beta aggregates cause alterations of astrocytic metabolic phenotype: impact on neuronal viability. *J Neurosci.* **2010**;30(9):3326-38. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5098-09.2010.
- Allegra A, Innao V, Allegra AG, Pugliese M, Di Salvo E, Ventura-Spagnolo E, et al.** Lymphocyte Subsets and Inflammatory Cytokines of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance and Multiple Myeloma. *Int J Mol Sci.* **2019**;20(11):2822. doi: 10.3390/ijms20112822.
- Allen NJ, Eroglu C.** Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron.* **2017**;96(3):697-708. doi: 10.1016/j.neuron.2017.09.056.
- Alzheimer A.** Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin.* **1907**;64 Band, Verlag von Georg Reimer.



Alzheimer A. Beiträge zur Kenntnis der pathologischen Neuroglia und ihrer Beziehungen zu den Abbauvorgängen im Nervengewebe. In: Nissl F, Alzheimer A, eds. *Histologische und Histopathologische Arbeiten über die Grosshirnrinde mit besonderer Berücksichtigung der pathologischen Anatomie der Geisteskrankheiten* Jena: Verlag von Gustav Fischer 1910; 401–562.

Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia. London. 2015. Disponible en: <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2015>

Alzheimer's Disease International. World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia. London: Alzheimer's Disease International. 2019. Disponible en: <https://www.alz.co.uk/research/world-report-2019>

Andreeva TV, Lukiw WJ, Rogaev EI. Biological Basis for Amyloidogenesis in Alzheimer's Disease. *Biochemistry (Mosc)*. 2017;82(2):122-139. doi: 10.1134/S0006297917020043.

Andrew RJ, Kellett KA, Thinakaran G, Hooper NM. A Greek Tragedy: The Growing Complexity of Alzheimer Amyloid Precursor Protein Proteolysis. *J Biol Chem*. 2016;291(37):19235-44. doi: 10.1074/jbc.R116.746032.

Angelo M, Bendall SC, Finck R, Hale MB, Hitzman C, Borowsky AD, et al. Multiplexed ion beam imaging of human breast tumors. *Nat Med*. 2014;20(4):436-42. doi: 10.1038/nm.3488. E

Arai H, Emson PC, Mountjoy CQ, Carassco LH, Heizmann CW. Loss of parvalbumin-immunoreactive neurones from cortex in Alzheimer-type dementia. *Brain Res*. 1987;418(1):164-169. doi:10.1016/0006-8993(87)90974-7

Arnold SE, Arvanitakis Z, Macauley-Rambach SL, Koenig AM, Wang HY, Ahima RS, et al. Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums. *Nat Rev Neurol*. 2018;14(3):168-181. doi: 10.1038/nrneurol.2017.185.

Askew K, Li K, Olmos-Alonso A, Garcia-Moreno F, Liang Y, Richardson P, et al. Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain. *Cell Rep*. 2017;18(2):391-405. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.041.

Aspelund A, Antila S, Proulx ST, Karlsen TV, Karaman S, Detmar M, et al. A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *J Exp Med*. 2015;212(7):991-9. doi: 10.1084/jem.20142290.

Atwood CS, Martins RN, Smith MA, Perry G. Senile plaque composition and posttranslational modification of amyloid-beta peptide and associated proteins. *Peptides*. 2002;23(7):1343-50. doi: 10.1016/s0196-9781(02)00070-0.

Bachiller S, Jiménez-Ferrer I, Paulus A, Yang Y, Swanberg M, Deierborg T, Boza-Serrano A. Microglia in Neurological Diseases: A Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:488. doi: 10.3389/fncel.2018.00488.

Baglietto-Vargas D, Sánchez-Mejias E, Navarro V, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Gómez-Arboledas A, et al. Dual roles of Aβ in proliferative processes in an amyloidogenic model of Alzheimer's disease. *Sci Rep*. 2017;7(1):10085. doi: 10.1038/s41598-017-10353-7.

Bagyinszky E, Youn YC, An SS, Kim S. The genetics of Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging*. 2014;9:535-51. doi: 10.2147/CIA.S51571.

Baik SH, Cha MY, Hyun YM, Cho H, Hamza B, Kim DK, et al. Migration of neutrophils targeting amyloid plaques in Alzheimer's disease mouse model. *Neurobiol Aging*. 2014;35(6):1286-92. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.003.

Baik SH, Kang S, Lee W, Choi H, Chung S, Kim JI, Mook-Jung I. A Breakdown in Metabolic Reprogramming Causes Microglia Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Cell Metab*. 2019;30(3):493-507.e6. doi: 10.1016/j.cmet.2019.06.005.



- Bak LK, Walls AB, Schousboe A, Waagepetersen HS.** Astrocytic glycogen metabolism in the healthy and diseased brain. *J Biol Chem.* **2018**;293(19):7108-7116. doi: 10.1074/jbc.R117.803239.
- Baker DJ, Petersen RC.** Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: evidence and perspectives. *J Clin Invest.* **2018**;128(4):1208-1216. doi: 10.1172/JCI95145.
- Bakken TE, Hodge RD, Miller JA, Yao Z, Nguyen TN, Aevermann B, et al.** Single-nucleus and single-cell transcriptomes compared in matched cortical cell types. *PLoS One.* **2018**;13(12):e0209648. doi: 10.1371/journal.pone.0209648.
- Bakos E, Thaiss CA, Kramer MP, Cohen S, Radomir L, Orr I, et al.** CCR2 Regulates the Immune Response by Modulating the Interconversion and Function of Effector and Regulatory T Cells. *J Immunol.* **2017**;198(12):4659-4671. doi: 10.4049/jimmunol.1601458.
- Ballard C, Gauthier S, Corbett A, Brayne C, Aarsland D, Jones E.** Alzheimer's disease. *Lancet.* **2011**;377(9770):1019-31. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61349-9.
- Ballatore C, Lee VM, Trojanowski JQ.** Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci.* **2007**;8(9):663-72. doi: 10.1038/nrn2194.
- Baranello RJ, Bharani KL, Padmaraju V, Chopra N, Lahiri DK, Greig NH, et al.** Amyloid-beta protein clearance and degradation (ABCD) pathways and their role in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* **2015**;12(1):32-46. doi: 10.2174/1567205012666141218140953.
- Barini E, Antico O, Zhao Y, Asta F, Tucci V, Catelani T, et al.** Metformin promotes tau aggregation and exacerbates abnormal behavior in a mouse model of tauopathy. *Mol Neurodegener.* **2016**;11:16. doi: 10.1186/s13024-016-0082-7.
- Barnes LL, Capuano AW, Aiello AE, Turner AD, Yolken RH, Torrey EF, Bennett DA.** Cytomegalovirus infection and risk of Alzheimer disease in older black and white individuals. *J Infect Dis.* **2015**;211(2):230-7. doi: 10.1093/infdis/jiu437.
- Barnum SR, Ishii Y, Agrawal A, Volanakis JE.** Production and interferon-gamma-mediated regulation of complement component C2 and factors B and D by the astrogloma cell line U105-MG. *Biochem J.* **1992**;287 (Pt 2):595-601. doi: 10.1042/bj2870595.
- Barnum SR, Jones JL, Benveniste EN.** Interleukin-1 and tumor necrosis factor-mediated regulation of C3 gene expression in human astrogloma cells. *Glia.* **1993**;7(3):225-36. doi: 10.1002/glia.440070306.
- Barrera-Ramirez LM, Drago-Serrano ME, Pérez-Ramos J, Sainz-Espuñes TR, Zamora AC, Gómez-Arroyo F et al.** Citometría de flujo: Vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev Inst Nal Enf Resp Méx.* **2004**;17(1): 42-55.
- Barres BA.** The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron.* **2008**;60(3):430-40. doi: 10.1016/j.neuron.2008.10.013.
- Barros LF, Brown A, Swanson RA.** Glia in brain energy metabolism: A perspective. *Glia.* **2018**;66(6):1134-1137. doi: 10.1002/glia.23316.
- Baruch K, Rosenzweig N, Kertser A, Deczkowska A, Sharif AM, Spinrad A, et al.** Breaking immune tolerance by targeting Foxp3(+) regulatory T cells mitigates Alzheimer's disease pathology. *Nat Commun.* **2015**;6:7967. doi: 10.1038/ncomms8967.
- Batiuk MY, Martirosyan A, Wahis J, de Vin F, Marneffe C, Kusserow C, et al.** Identification of region-specific astrocyte subtypes at single cell resolution. *Nat Commun.* **2020**;11(1):1220. doi: 10.1038/s41467-019-14198-8.
- Bayer TA, Wirths O.** Intracellular accumulation of amyloid-Beta - a predictor for synaptic dysfunction and neuron loss in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci.* **2010**;2:8. doi: 10.3389/fnagi.2010.00008.



- Beccari S, Diaz-Aparicio I, Sierra A.** Quantifying Microglial Phagocytosis of Apoptotic Cells in the Brain in Health and Disease. *Curr Protoc Immunol.* **2018**; 24:e49. doi: 10.1002/cpim.49.
- Bélanger M, Magistretti PJ.** The role of astroglia in neuroprotection. *Dialogues Clin Neurosci.* **2009**;11(3):281-95.
- Bélanger M, Allaman I, Magistretti PJ.** Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab.* **2011**;14(6):724-38. doi: 10.1016/j.cmet.2011.08.016.
- Bell RD, Winkler EA, Singh I, Sagare AP, Deane R, Wu Z, et al.** Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature.* **2012**;485(7399):512-6. doi: 10.1038/nature11087.
- Bellaver B, Souza DG, Souza DO, Quincozes-Santos A.** Hippocampal Astrocyte Cultures from Adult and Aged Rats Reproduce Changes in Glial Functionality Observed in the Aging Brain. *Mol Neurobiol.* **2017**;54(4):2969-2985. doi: 10.1007/s12035-016-9880-8.
- Bennett ML, Bennett FC, Liddelov SA, Ajami B, Zamanian JL, Fernhoff NB, et al.** New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2016**;113(12):E1738-46. doi: 10.1073/pnas.1525528113.
- Bennett FC, Bennett ML, Yaqoob F, Mulinyawe SB, Grant GA, Hayden Gephart M, et al.** A Combination of Ontogeny and CNS Environment Establishes Microglial Identity. *Neuron.* **2018**;98(6):1170-1183.e8. doi: 10.1016/j.neuron.2018.05.014.
- Bertram L, Lill CM, Tanzi RE.** The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron.* **2010**;68(2):270-81. doi: 10.1016/j.neuron.2010.10.013.
- Bhaskar K, Konerth M, Kokiko-Cochran ON, Cardona A, Ransohoff RM, Lamb BT.** Regulation of tau pathology by the microglial fractalkine receptor. *Neuron.* **2010**;68(1):19-31. doi: 10.1016/j.neuron.2010.08.023.
- Bhat R, Crowe EP, Bitto A, Moh M, Katsetos CD, Garcia FU, et al.** Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease. *PLoS One.* **2012**;7(9):e45069. doi: 10.1371/journal.pone.0045069.
- Bi X, Gall CM, Zhou J, Lynch G.** Uptake and pathogenic effects of amyloid beta peptide 1-42 are enhanced by integrin antagonists and blocked by NMDA receptor antagonists. *Neuroscience.* **2002**;112(4):827-40. doi: 10.1016/s0306-4522(02)00132-x.
- Bigl M, Brückner MK, Arendt T, Bigl V, Eschrich K.** Activities of key glycolytic enzymes in the brains of patients with Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna).* **1999**;106(5-6):499-511. doi:10.1007/s007020050174
- Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM.** Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron.* **2005**;45(5):675-88. doi: 10.1016/j.neuron.2005.01.040.
- Binek A, Rojo D, Godzien J, Rupérez FJ, Nuñez V, Jorge I, et al.** Flow Cytometry Has a Significant Impact on the Cellular Metabolome. *J Proteome Res.* **2019**;18(1):169-181. doi: 10.1021/acs.jproteome.8b00472.
- Blass JP, Sheu RK, Gibson GE.** Inherent abnormalities in energy metabolism in Alzheimer disease. Interaction with cerebrovascular compromise. *Ann N Y Acad Sci.* **2000**;903:204-21. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06370.x.
- Bogie JF, Stinissen P, Hendriks JJ.** Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol.* **2014**;128(2):191-213. doi: 10.1007/s00401-014-1310-2.
- Boisvert MM, Erikson GA, Shokhirev MN, Allen NJ.** The Aging Astrocyte Transcriptome from Multiple Regions of the Mouse Brain. *Cell Rep.* **2018**;22(1):269-285. doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.039.
- Bolmont T, Haiss F, Eicke D, Radde R, Mathis CA, Klunk WE, et al.** Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance. *J*



- Neurosci.* **2008**;28(16):4283-92. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4814-07.2008.
- Bolós M, Llorens-Martín M, Jurado-Arjona J, Hernández F, Rábano A, Avila J.** Direct Evidence of Internalization of Tau by Microglia In Vitro and In Vivo. *J Alzheimers Dis.* **2016**;50(1):77-87. doi: 10.3233/JAD-150704.
- Bonilla DL, Bhattacharya A, Sha Y, Xu Y, Xiang Q, Kan A, et al.** Autophagy regulates phagocytosis by modulating the expression of scavenger receptors. *Immunity.* **2013**;39(3):537-47. doi: 10.1016/j.immuni.2013.08.026.
- Borda JT, Alvarez X, Mohan M, Hasegawa A, Bernardino A, Jean S, et al.** CD163, a marker of perivascular macrophages, is up-regulated by microglia in simian immunodeficiency virus encephalitis after haptoglobin-hemoglobin complex stimulation and is suggestive of breakdown of the blood-brain barrier. *Am J Pathol.* **2008**;172(3):725-37. doi: 10.2353/ajpath.2008.070848.
- Böttcher C, Schlickeiser S, Sneeboer MAM, Kunkel D, Knop A, Paza E, et al.** Human microglia regional heterogeneity and phenotypes determined by multiplexed single-cell mass cytometry. *Nat Neurosci.* **2019**;22(1):78-90. doi: 10.1038/s41593-018-0290-2.
- Bouvier DS, Jones EV, Quesseveur G, Davoli MA, A Ferreira T, Quirion R, et al.** High Resolution Dissection of Reactive Glial Nets in Alzheimer's Disease. *Sci Rep.* **2016**;6:24544. doi: 10.1038/srep24544.
- Boza-Serrano A, Ruiz R, Sanchez-Varo R, García-Revilla J, Yang Y, Jimenez-Ferrer I, Paulus A, et al.** Galectin-3, a novel endogenous TREM2 ligand, detrimentally regulates inflammatory response in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **2019**;138(2):251-273. doi: 10.1007/s00401-019-02013-z.
- Braak H, Braak E, Grundke-Iqbal I, Iqbal K.** Occurrence of neuropil threads in the senile human brain and in Alzheimer's disease: a third location of paired helical filaments outside of neurofibrillary tangles and neuritic plaques. *Neurosci Lett.* **1986**;65(3):351-5. doi: 10.1016/0304-3940(86)90288-0.
- Braak H, Braak E.** Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* **1991**;82(4):239-259. doi:10.1007/bf00308809
- Brady DR, Mufson EJ.** Parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampal formation of Alzheimer's diseased brain. *Neuroscience.* **1997**;80(4):1113-1125. doi:10.1016/s0306-4522(97)00068-7
- Brendecke SM, Prinz M.** Do not judge a cell by its cover--diversity of CNS resident, adjoining and infiltrating myeloid cells in inflammation. *Semin Immunopathol.* **2015**;37(6):591-605. doi:10.1007/s00281-015-0520-6
- Brezovakova V, Valachova B, Hanes J, Novak M, Jadhav S.** Dendritic Cells as an Alternate Approach for Treatment of Neurodegenerative Disorders. *Cell Mol Neurobiol.* **2018**;38(6):1207-1214. doi:10.1007/s10571-018-0598-1
- Briggs R, Kennelly SP, O'Neill D.** Drug treatments in Alzheimer's disease. *Clin Med (Lond).* **2016**;16(3):247-253. doi:10.7861/clinmedicine.16-3-247
- Britschgi M, Takeda-Uchimura Y, Rockenstein E, Johns H, Masliah E, Wyss-Coray T.** Deficiency of terminal complement pathway inhibitor promotes neuronal tau pathology and degeneration in mice. *J Neuroinflammation.* **2012**;9:220. doi: 10.1186/1742-2094-9-220.
- Brouwers N, Van Cauwenberghe C, Engelborghs S, Lambert JC, Bettens K, Le Bastard N, et al.** Alzheimer risk associated with a copy number variation in the complement receptor 1 increasing C3b/C4b binding sites. *Mol Psychiatry.* **2012**;17(2):223-33. doi: 10.1038/mp.2011.24.
- Broux B, Gowing E, Prat A.** Glial regulation of the blood-brain barrier in health and disease. *Semin Immunopathol.* **2015**;37(6):577-90. doi: 10.1007/s00281-015-0516-2.
- Brown GC, St George-Hyslop PH.** Deciphering microglial diversity in Alzheimer's disease. *Science.*



- 2017;356(6343):1123-1124. doi: 10.1126/science.aan7893.
- Browne TC, McQuillan K, McManus RM, O'Reilly JA, Mills KH, Lynch MA.** IFN- γ Production by amyloid β -specific Th1 cells promotes microglial activation and increases plaque burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Immunol.* **2013**;190(5):2241-2251. doi:10.4049/jimmunol.1200947
- Bruttger J, Karram K, Wörtge S, Regen T, Marini F, Hoppmann N, et al.** Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System. *Immunity.* **2015**;43(1):92-106. doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.012.
- Bubber P, Haroutunian V, Fisch G, Blass JP, Gibson GE.** Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications. *Ann Neurol.* **2005**;57(5):695-703. doi:10.1002/ana.20474
- Bussian TJ, Aziz A, Meyer CF, Swenson BL, van Deursen JM, Baker DJ.** Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature.* **2018**;562(7728):578-582. doi:10.1038/s41586-018-0543-y
- Bustin SA.** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* **2000**;25(2):169-93. doi: 10.1677/jme.0.0250169.
- Bustin SA.** Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol.* **2002**;29(1):23-39. doi: 10.1677/jme.0.0290023.
- Butterfield DA, Halliwell B.** Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci.* **2019**;20(3):148-160. doi:10.1038/s41583-019-0132-6
- Butovsky O, Talpalar AE, Ben-Yaakov K, Schwartz M.** Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective. *Mol Cell Neurosci.* **2005**;29(3):381-93. doi: 10.1016/j.mcn.2005.03.005.
- Butovsky O, Kunis G, Koronyo-Hamaoui M, Schwartz M.** Selective ablation of bone marrow-derived dendritic cells increases amyloid plaques in a mouse Alzheimer's disease model. *Eur J Neurosci.* **2007**;26(2):413-416. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05652.x
- Cabodevilla AG, Sánchez-Caballero L, Nintou E, Boiadjeva VG, Picatoste F, Gubern A, Claro E.** Cell survival during complete nutrient deprivation depends on lipid droplet-fueled β -oxidation of fatty acids. *J Biol Chem.* **2013**;288(39):27777-88. doi: 10.1074/jbc.M113.466656.
- Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, et al.** A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci.* **2008**;28(1):264-78. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008.
- Cai Y, An SS, Kim S.** Mutations in presenilin 2 and its implications in Alzheimer's disease and other dementia-associated disorders. *Clin Interv Aging.* **2015**;10:1163-72. doi: 10.2147/CIA.S85808.
- Cai Z, Wan CQ, Liu Z.** Astrocyte and Alzheimer's disease. *J Neurol.* **2017**;264(10):2068-2074. doi:10.1007/s00415-017-8593-x
- Calero M, Gómez-Ramos A, Calero O, Soriano E, Avila J, Medina M.** Additional mechanisms conferring genetic susceptibility to Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci.* **2015**;9:138. doi: 10.3389/fncel.2015.00138.
- Calvo-Rodríguez M, Hou SS, Snyder AC, Kharitonova EK, Russ AN, Das S, et al.** Increased mitochondrial calcium levels associated with neuronal death in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Commun.* **2020a**;11(1):2146. doi: 10.1038/s41467-020-16074-2.
- Calvo-Rodríguez M, Bacsikai BJ.** Mitochondria and Calcium in Alzheimer's Disease: From Cell Signaling to Neuronal Cell Death. *Trends Neurosci.*



- 2020b**:S0166-2236(20)30224-1. doi: 10.1016/j.tins.2020.10.004.
- Carbone I, Lazzarotto T, Ianni M, Porcellini E, Forti P, Masliah E, et al.** Herpes virus in Alzheimer's disease: relation to progression of the disease. *Neurobiol Aging*. **2014**;35(1):122-9. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.06.024.
- Carlin LM, Stamatiades EG, Auffray C, Hanna RN, Glover L, Vizcay-Barrena G, et al.** Nr4a1-dependent Ly6C(low) monocytes monitor endothelial cells and orchestrate their disposal. *Cell*. **2013**;153(2):362-75. doi: 10.1016/j.cell.2013.03.010.
- Carrero I, Gonzalo MR, Martin B, Sanz-Anquela JM, Arévalo-Serrano J, Gonzalo-Ruiz A.** Oligomers of β -amyloid protein (A β 1-42) induce the activation of cyclooxygenase-2 in astrocytes via an interaction with interleukin-1 β , tumour necrosis factor- α , and a nuclear factor κ -B mechanism in the rat brain. *Exp Neurol*. **2012**;236(2):215-227. doi:10.1016/j.expneurol.2012.05.004
- Castro-Gomez S, Binder J, Heneka MT.** Neuroinflammation als Motor der Alzheimer-Erkrankung [Neuroinflammation as motor of Alzheimer's disease]. *Nervenarzt*. **2019**;90(9):898-906. doi:10.1007/s00115-019-0778-3
- Cattaud V, Bezzina C, Rey CC, Lejards C, Dahan L, Verret L.** Early disruption of parvalbumin expression and perineuronal nets in the hippocampus of the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease can be rescued by enriched environment. *Neurobiol Aging*. **2018**;72:147-158. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2018.08.024
- Cestari JA, Fabri GM, Kalil J, Nitrini R, Jacob-Filho W, de Siqueira JT, Siqueira SR.** Oral Infections and Cytokine Levels in Patients with Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment Compared with Controls. *J Alzheimers Dis*. **2016**;52(4):1479-85. doi: 10.3233/JAD-160212. Erratum in: *J Alzheimers Dis*. 2016 Sep 6;54(2):845.
- Chang TY, Yamauchi Y, Hasan MT, Chang C.** Cellular cholesterol homeostasis and Alzheimer's disease. *J Lipid Res*. **2017**;58(12):2239-2254. doi:10.1194/jlr.R075630
- Chen HY, Weng IC, Li CS, Wan L, Liu FT.** Examination of galectins in phagocytosis. *Methods Mol Biol*. **2015**;1207:201-213. doi:10.1007/978-1-4939-1396-1_13
- Chen GF, Xu TH, Yan Y, Zhou YR, Jiang Y, Melcher K, Xu HE.** Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin*. **2017**;38(9):1205-1235. doi: 10.1038/aps.2017.28.
- Chen YG.** Research Progress in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Chin Med J (Engl)*. **2018**;131(13):1618-1624. doi: 10.4103/0366-6999.235112.
- Chen WT, Lu A, Craessaerts K, Pavie B, Sala Frigerio C, Corthout N, et al.** Spatial Transcriptomics and In Situ Sequencing to Study Alzheimer's Disease. *Cell*. **2020a**;182(4):976-991.e19. doi: 10.1016/j.cell.2020.06.038.
- Chen Y, Qin C, Huang J, Tang X, Liu C, Huang K, et al.** The role of astrocytes in oxidative stress of central nervous system: A mixed blessing. *Cell Prolif*. **2020b**;53(3):e12781. doi: 10.1111/cpr.12781.
- Chew G, Petretto E.** Transcriptional Networks of Microglia in Alzheimer's Disease and Insights into Pathogenesis. *Genes (Basel)*. **2019**;10(10):798. doi: 10.3390/genes10100798.
- Chiu IM, Morimoto ET, Goodarzi H, Liao JT, O'Keefe S, Phatnani HP, et al.** A neurodegeneration-specific gene-expression signature of acutely isolated microglia from an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Cell Rep*.



- 2013;4(2):385-401. doi: 10.1016/j.celrep.2013.06.018.
- Choi ML, Gandhi S.** Crucial role of protein oligomerization in the pathogenesis of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *FEBS J.* 2018;285(19):3631-3644. doi: 10.1111/febs.14587.
- Chong SZ, Evrard M, Goh CC, Ng LG.** Illuminating the covert mission of mononuclear phagocytes in their regional niches. *Curr Opin Immunol.* 2018;50:94-101. doi:10.1016/j.coi.2017.12.004
- Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mullaney CE, Hell JW, Agah A, et al.** Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell.* 2005;120(3):421-33. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.020.
- Chu CS, Tseng PT, Stubbs B, Chen TY, Tang CH, Li DJ, et al.** Use of statins and the risk of dementia and mild cognitive impairment: A systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2018;8(1):5804. doi: 10.1038/s41598-018-24248-8.
- Chung WS, Allen NJ, Eroglu C.** Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(9):a020370. doi: 10.1101/cshperspect.a020370.
- Chung WS, Verghese PB, Chakraborty C, Joung J, Hyman BT, Ulrich JD, et al.** Novel allele-dependent role for APOE in controlling the rate of synapse pruning by astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(36):10186-91. doi: 10.1073/pnas.1609896113.
- Ciaramella A, Sanarico N, Bizzoni F, Moro ML, Salani F, Scapigliati G, et al.** Amyloid beta peptide promotes differentiation of pro-inflammatory human myeloid dendritic cells. *Neurobiol Aging.* 2009;30(2):210-21. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.06.007.
- Ciaramella A, Bizzoni F, Salani F, Vanni D, Spalletta G, Sanarico N, et al.** Increased pro-inflammatory response by dendritic cells from patients with Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2010;19(2):559-72. doi: 10.3233/JAD-2010-1257.
- Ciaramella A, Salani F, Bizzoni F, Orfei MD, Langella R, Angelucci F, et al.** The stimulation of dendritic cells by amyloid beta 1-42 reduces BDNF production in Alzheimer's disease patients. *Brain Behav Immun.* 2013;32:29-32. doi: 10.1016/j.bbi.2013.04.001.
- Ciaramella A, Salani F, Bizzoni F, Orfei MD, Caltagirone C, Spalletta G, Bossù P.** Myeloid dendritic cells are decreased in peripheral blood of Alzheimer's disease patients in association with disease progression and severity of depressive symptoms. *J Neuroinflammation.* 2016;13:18. doi: 10.1186/s12974-016-0483-0.
- Ciavardelli D, Piras F, Consalvo A, Rossi C, Zucchelli M, Di Ilio C, et al.** Medium-chain plasma acylcarnitines, ketone levels, cognition, and gray matter volumes in healthy elderly, mildly cognitively impaired, or Alzheimer's disease subjects. *Neurobiol Aging.* 2016;43:1-12. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.03.005.
- Clarke LE, Barres BA.** Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14(5):311-21. doi: 10.1038/nrn3484. Erratum in: *Nat Rev Neurosci.* 2013 Jun;14(6):451.
- Clarke LE, Liddel SA, Chakraborty C, Münch AE, Heiman M, Barres BA.** Normal aging induces A1-like astrocyte reactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(8):E1896-E1905. doi:10.1073/pnas.1800165115
- Cline EN, Bicca MA, Viola KL, Klein WL.** The Amyloid- β Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade. *J Alzheimers Dis.* 2018;64(s1):S567-S610. doi: 10.3233/JAD-179941.



- Cohen J, Torres C.** Astrocyte senescence: Evidence and significance. *Aging Cell*. **2019**;18(3):e12937. doi:10.1111/accel.12937
- Collin M, Bigley V.** Monocyte, Macrophage, and Dendritic Cell Development: the Human Perspective. *Microbiol Spectr*. **2016**;4(5):10.1128/microbiolspec.MCHD-0015-2015. doi:10.1128/microbiolspec.MCHD-0015-2015
- Collin M, Bigley V.** Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*. **2018**;154(1):3–20. doi:10.1111/imm.12888
- Colombo E, Farina C.** Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends Immunol*. **2016**;37(9):608–620. doi:10.1016/j.it.2016.06.006
- Colom-Cadena M, Spires-Jones T, Zetterberg H, Blennow K, Caggiano A, DeKosky ST, et al.** The clinical promise of biomarkers of synapse damage or loss in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. **2020**;12(1):21. doi: 10.1186/s13195-020-00588-4.
- Colonna M, Butovsky O.** Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol*. **2017**;35:441–468. doi:10.1146/annurev-immunol-051116-052358
- Colton CA, Mott RT, Sharpe H, Xu Q, Van Nostrand WE, Vitek MP.** Expression profiles for macrophage alternative activation genes in AD and in mouse models of AD. *J Neuroinflammation*. **2006**;3:27. doi: 10.1186/1742-2094-3-27.
- Conejero-Goldberg C, Gomar JJ, Bobes-Bascaran T, Hyde TM, Kleinman JE, Herman MM, et al.** APOE2 enhances neuroprotection against Alzheimer's disease through multiple molecular mechanisms. *Mol Psychiatry*. **2014**;19(11):1243-50. doi: 10.1038/mp.2013.194.
- Congdon EE, Sigurdsson EM.** Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. **2018**;14(7):399–415. doi:10.1038/s41582-018-0013-z
- Cordero-Llana O, Scott SA, Maslen SL, Anderson JM, Boyle J, Chowdhury RR, et al.** Clusterin secreted by astrocytes enhances neuronal differentiation from human neural precursor cells. *Cell Death Differ*. **2011**;18(5):907-13. doi: 10.1038/cdd.2010.169.
- Coupé P, Manjón JV, Lanuza E, Catheline G.** Lifespan Changes of the Human Brain In Alzheimer's Disease. *Sci Rep*. **2019**;9(1):3998. doi: 10.1038/s41598-019-39809-8.
- Covelo A, Araque A.** Lateral regulation of synaptic transmission by astrocytes. *Neuroscience*. **2016**;323:62–66. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.02.036
- Covelo A, Araque A.** Stimulating Astrocytes to Remember. *Cell*. **2018**;174(1):12–13. doi:10.1016/j.cell.2018.06.023
- Craft S, Raman R, Chow TW, Rafii MS, Sun CK, Rissman RA, et al.** Safety, Efficacy, and Feasibility of Intranasal Insulin for the Treatment of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease Dementia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol*. **2020**;77(9):1099-1109. doi: 10.1001/jamaneurol.2020.1840.
- Crimins JL, Pooler A, Polydoro M, Luebke JI, Spires-Jones TL.** The intersection of amyloid β and tau in glutamatergic synaptic dysfunction and collapse in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*. **2013**;12(3):757-763. doi:10.1016/j.arr.2013.03.002
- Crispoltoni L, Stabile AM, Pistilli A, Venturelli M, Cerulli G, Fonte C, et al.** Changes in Plasma β -NGF and Its Receptors Expression on Peripheral



- Blood Monocytes During Alzheimer's Disease Progression. *J Alzheimers Dis.* **2017**;55(3):1005-1017. doi: 10.3233/JAD-160625.
- Cronk JC, Filiano AJ, Louveau A, Marin I, Marsh R, Ji E, et al.** Peripherally derived macrophages can engraft the brain independent of irradiation and maintain an identity distinct from microglia. *J Exp Med.* **2018**;215(6):1627-1647. doi: 10.1084/jem.20180247.
- Cummings J, Lee G, Ritter A, Sabbagh M, Zhong K.** Alzheimer's disease drug development pipeline: 2019. *Alzheimers Dement (N Y).* **2019** Jul 9;5:272-293. doi: 10.1016/j.trci.2019.05.008.
- Cutler RG, Kelly J, Storie K, Pedersen WA, Tammara A, Hatanpaa K, et al.** Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2004** Feb 17;101(7):2070-5. doi: 10.1073/pnas.0305799101.
- Czirr E, Castello NA, Mosher KI, Castellano JM, Hinkson IV, Lucin KM, et al.** Microglial complement receptor 3 regulates brain A β levels through secreted proteolytic activity. *J Exp Med.* **2017**;214(4):1081-1092. doi: 10.1084/jem.20162011.
- Da Costa AS, Graham JB, Swarts JL, Lund JM.** Regulatory T cells limit unconventional memory to preserve the capacity to mount protective CD8 memory responses to pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2019**;116(20):9969-9978. doi:10.1073/pnas.1818327116
- Da Mesquita S, Louveau A, Vaccari A, Smirnov I, Cornelison RC, Kingsmore KM, et al.** Functional aspects of meningeal lymphatics in ageing and Alzheimer's disease. *Nature.* **2018**;560(7717):185-191. doi: 10.1038/s41586-018-0368-8. Erratum in: *Nature.* 2018 Nov 5.
- Dando SJ, Naranjo Golborne C, Chinnery HR, Ruitenber MJ, McMenamin PG.** A case of mistaken identity: CD11c-eYFP(+) cells in the normal mouse brain parenchyma and neural retina display the phenotype of microglia, not dendritic cells. *Glia.* **2016**;64(8):1331-1349. doi:10.1002/glia.23005
- D'Andrea MR, Howanski RJ, Saller CF.** MAP2 IHC detection: a marker of antigenicity in CNS tissues. *Biotech Histochem.* **2017**;92(5):363-373. doi:10.1080/10520295.2017.1295169
- Dansokho C, Ait Ahmed D, Aid S, Toly-Ndour C, Chaigneau T, Calle V, et al.** Regulatory T cells delay disease progression in Alzheimer-like pathology. *Brain.* **2016**;139(Pt 4):1237-51. doi: 10.1093/brain/awv408.
- Dansokho C, Heneka MT.** Neuroinflammatory responses in Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna).* **2018**;125(5):771-779. doi:10.1007/s00702-017-1831-7
- Daugherty D, Goldberg J, Fischer W, Dargusch R, Maher P, Schubert D.** A novel Alzheimer's disease drug candidate targeting inflammation and fatty acid metabolism. *Alzheimers Res Ther.* **2017**;9(1):50. doi: 10.1186/s13195-017-0277-3.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, et al.** ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci.* **2005**;8(6):752-8. doi: 10.1038/nn1472.
- Deane R, Bell RD, Sagare A, Zlokovic BV.** Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* **2009**;8(1):16-30. doi: 10.2174/187152709787601867.
- De Chaves EI, Rusiñol AE, Vance DE, Campenot RB, Vance JE.** Role of lipoproteins in the delivery of lipids to



axons during axonal regeneration. *J Biol Chem.* **1997**;272(49):30766-30773. doi:10.1074/jbc.272.49.30766

Deitmer JW, Theparambil SM, Ruminot I, Noor SI, Becker HM. Energy Dynamics in the Brain: Contributions of Astrocytes to Metabolism and pH Homeostasis. *Front Neurosci.* **2019**;13:1301. doi: 10.3389/fnins.2019.01301.

De Laere M, Berneman ZN, Cools N. To the Brain and Back: Migratory Paths of Dendritic Cells in Multiple Sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* **2018**;77(3):178-192. doi:10.1093/jnen/nlx114

De la Torre J. The Vascular Hypothesis of Alzheimer's Disease: A Key to Preclinical Prediction of Dementia Using Neuroimaging. *J Alzheimers Dis.* **2018**;63(1):35-52. doi: 10.3233/JAD-180004.

DePaula-Silva AB, Gorbea C, Doty DJ, Libbey JE, Sanchez JMS, Hanak TJ, et al. Differential transcriptional profiles identify microglial- and macrophage-specific gene markers expressed during virus-induced neuroinflammation. *J Neuroinflammation.* **2019**;16(1):152. doi: 10.1186/s12974-019-1545-x.

DeTure MA, Dickson DW. The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* **2019**;14(1):32. doi: 10.1186/s13024-019-0333-5.

De Strooper B. Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiol Rev.* **2010**;90(2):465-94. doi: 10.1152/physrev.00023.2009.

De Strooper B, Iwatsubo T, Wolfe MS. Presenilins and γ -secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2012**;2(1):a006304. doi: 10.1101/cshperspect.a006304.

De Wilde MC, Overk CR, Sijben JW, Masliah E. Meta-analysis of synaptic pathology in Alzheimer's disease reveals selective molecular vesicular machinery vulnerability. *Alzheimers Dement.* **2016**;12(6):633-44. doi: 10.1016/j.jalz.2015.12.005.

Dickson DW. The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol.* **1997**;56(4):321-39. doi: 10.1097/00005072-199704000-00001.

Dickson TC, King CE, McCormack GH, Vickers JC. Neurochemical diversity of dystrophic neurites in the early and late stages of Alzheimer's disease. *Exp Neurol.* **1999**;156(1):100-10. doi: 10.1006/exnr.1998.7010.

Dienel GA. Brain Glucose Metabolism: Integration of Energetics with Function. *Physiol Rev.* **2019**;99(1):949-1045. doi:10.1152/physrev.00062.2017

Ding SL, Van Hoesen GW, Cassell MD, Poremba A. Parcellation of human temporal polar cortex: a combined analysis of multiple cytoarchitectonic, chemoarchitectonic, and pathological markers. *J Comp Neurol.* **2009**;514(6):595-623. doi:10.1002/cne.22053

Di Paolo G, Kim TW. Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond. *Nat Rev Neurosci.* **2011**;12(5):284-96. doi: 10.1038/nrn3012. Erratum in: *Nat Rev Neurosci.* 2011 Aug;12(8):484.

DiStasi MR, Ley K. Opening the flood-gates: how neutrophil-endothelial interactions regulate permeability. *Trends Immunol.* **2009**;30(11):547-556. doi:10.1016/j.it.2009.07.012

Domingues C, da Cruz E Silva OAB, Henriques AG. Impact of Cytokines and Chemokines on Alzheimer's Disease Neuropathological Hallmarks. *Curr Alzheimer Res.* **2017**;14(8):870-882. doi:10.2174/1567205014666170317113606



- Domínguez RO, Pagano MA, Marschoff ER, González SE, Repetto MG, Serra JA.** Alzheimer disease and cognitive impairment associated with diabetes mellitus type 2: associations and a hypothesis. *Neurologia*. **2014**;29(9):567-72. English, Spanish. doi: 10.1016/j.nrl.2013.05.006.
- Dossi E, Vasile F, Rouach N.** Human astrocytes in the diseased brain. *Brain Res Bull*. **2018**;136:139–156. doi:10.1016/j.brainresbull.2017.02.001
- Drago V, Babiloni C, Bartrés-Faz D, Caroli A, Bosch B, Hensch T, et al.** Disease tracking markers for Alzheimer's disease at the prodromal (MCI) stage. *J Alzheimers Dis*. **2011**;26 Suppl 3:159-99. doi: 10.3233/JAD-2011-0043.
- Druart M, Le Magueresse C.** Emerging Roles of Complement in Psychiatric Disorders. *Front Psychiatry*. **2019**;10:573. doi: 10.3389/fpsy.2019.00573.
- Duyckaerts C, Delatour B, Potier MC.** Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol*. **2009**;118(1):5-36. doi: 10.1007/s00401-009-0532-1.
- Ebert D, Haller RG, Walton ME.** Energy contribution of octanoate to intact rat brain metabolism measured by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Neurosci*. **2003**;23(13):5928-5935. doi:10.1523/JNEUROSCI.23-13-05928.2003
- Edwards Iii GA, Gamez N, Escobedo G Jr, Calderon O, Moreno-Gonzalez I.** Modifiable Risk Factors for Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*. **2019**;11:146. doi: 10.3389/fnagi.2019.00146.
- Eikelenboom P, Hack CE, Rozemuller JM, Stam FC.** Complement activation in amyloid plaques in Alzheimer's dementia. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. **1989**;56(4):259-262. doi:10.1007/BF02890024
- El Khoury J, Toft M, Hickman SE, Means TK, Terada K, Geula C, Luster AD.** Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nat Med*. **2007**;13(4):432-8. doi: 10.1038/nm1555.
- Engelhardt B, Vajkoczy P, Weller RO.** The movers and shapers in immune privilege of the CNS. *Nat Immunol*. **2017**;18(2):123–131. doi:10.1038/ni.3666
- Eraso-Pichot A, Brasó-Vives M, Golbano A, Menacho C, Claro E, Galea E, Masgrau R.** GSEA of mouse and human mitochondriomes reveals fatty acid oxidation in astrocytes. *Glia*. **2018**;66(8):1724-1735. doi: 10.1002/glia.23330.
- Erickson MA, Banks WA.** Neuroimmune Axes of the Blood-Brain Barriers and Blood-Brain Interfaces: Bases for Physiological Regulation, Disease States, and Pharmacological Interventions. *Pharmacol Rev*. **2018**;70(2):278–314. doi:10.1124/pr.117.014647
- Esparza TJ, Zhao H, Cirrito JR, Cairns NJ, Bateman RJ, Holtzman DM, Brody DL.** Amyloid- β oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls. *Ann Neurol*. **2013**;73(1):104-19. doi: 10.1002/ana.23748.
- Etzerodt A, Maniecki MB, Møller K, Møller HJ, Moestrup SK.** Tumor necrosis factor α -converting enzyme (TACE/ADAM17) mediates ectodomain shedding of the scavenger receptor CD163. *J Leukoc Biol*. **2010**;88(6):1201-1205. doi:10.1189/jlb.0410235
- Etzerodt A, Rasmussen MR, Svendsen P, Chalaris A, Schwarz J, Galea I, et al.** Structural basis for inflammation-driven shedding of CD163 ectodomain and tumor necrosis factor- α in macrophages. *J*



- Biol Chem.* 2014;289(2):778-88. doi: 10.1074/jbc.M113.520213.
- Evin G, Weidemann A.** Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides. *Peptides.* 2002;23(7):1285-97. doi: 10.1016/s0196-9781(02)00063-3.
- Fabrick BO, Møller HJ, Vloet RP, van Winsen LM, Hanemaaijer R, Teunissen CE, et al.** Proteolytic shedding of the macrophage scavenger receptor CD163 in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2007;187(1-2):179-86. doi: 10.1016/j.jneuroim.2007.04.016.
- Fang A, Li D, Hao Z, Wang L, Pan B, Gao L, et al.** Effects of astrocyte on neuronal outgrowth in a layered 3D structure. *Biomed Eng Online.* 2019 Jun 18;18(1):74. doi: 10.1186/s12938-019-0694-6. Erratum in: *Biomed Eng Online.* 2019 Aug 8;18(1):88.
- Fani Maleki A, Rivest S.** Innate Immune Cells: Monocytes, Monocyte-Derived Macrophages and Microglia as Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease and Multiple Sclerosis. *Front Cell Neurosci.* 2019;13:355. doi: 10.3389/fncel.2019.00355.
- Fantin A, Vieira JM, Gestri G, Denti L, Schwarz Q, Prykhodzij S, et al.** Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood.* 2010;116(5):829-40. doi: 10.1182/blood-2009-12-257832.
- Faraco G, Park L, Anrather J, Iadecola C.** Brain perivascular macrophages: characterization and functional roles in health and disease. *J Mol Med (Berl).* 2017;95(11):1143-1152. doi:10.1007/s00109-017-1573-x
- Farhy-Tselnicker I, Allen NJ.** Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development. *Neural Dev.* 2018;13(1):7. doi: 10.1186/s13064-018-0104-y.
- Farmer BC, Kluemper J, Johnson LA.** Apolipoprotein E4 Alters Astrocyte Fatty Acid Metabolism and Lipid Droplet Formation. *Cells.* 2019;8(2):182. doi: 10.3390/cells8020182.
- Farrall AJ, Wardlaw JM.** Blood-brain barrier: ageing and microvascular disease-systematic review and meta-analysis. *Neurobiol Aging.* 2009;30(3):337-352. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.07.015
- Farris W, Schütz SG, Cirrito JR, Shankar GM, Sun X, George A, et al.** Loss of neprilysin function promotes amyloid plaque formation and causes cerebral amyloid angiopathy. *Am J Pathol.* 2007;171(1):241-51. doi: 10.2353/ajpath.2007.070105.
- Feng P, Yan R, Dai X, Xie X, Wen H, Yang S.** The alteration and clinical significance of Th1/Th2/Th17/Treg cells in patients with multiple myeloma. *Inflammation.* 2015;38(2):705-709. doi:10.1007/s10753-014-9980-4
- Fernandez AM, Jimenez S, Mecha M, Dávila D, Guaza C, Vitorica J, Torres-Aleman I.** Regulation of the phosphatase calcineurin by insulin-like growth factor I unveils a key role of astrocytes in Alzheimer's pathology. *Mol Psychiatry.* 2012;17(7):705-18. doi: 10.1038/mp.2011.128.
- Fernandez CG, Hamby ME, McReynolds ML, Ray WJ.** The Role of APOE4 in Disrupting the Homeostatic Functions of Astrocytes and Microglia in Aging and Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* 2019;11:14. doi: 10.3389/fnagi.2019.00014.
- Ferrer I, Soriano E, Tuñón T, Fonseca M, Guionnet N.** Parvalbumin immunoreactive neurons in normal human temporal neocortex and in patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 1991;106(2):135-141. doi:10.1016/0022-510x(91)90250-b



- Ferrer I, Santpere G, Arzberger T, Bell J, Blanco R, Boluda S, et al.** Brain protein preservation largely depends on the postmortem storage temperature: implications for study of proteins in human neurologic diseases and management of brain banks: a BrainNet Europe Study. *J Neuropathol Exp Neurol.* **2007**;66(1):35-46. doi: 10.1097/nen.0b013e31802c3e7d.
- Ferrer DG, Jaldin-Fincati JR, Amigone JL, Capra RH, Collino CJ, Albertini RA, Chiabrando GA.** Standardized flow cytometry assay for identification of human monocytic heterogeneity and LRP1 expression in monocyte subpopulations: decreased expression of this receptor in nonclassical monocytes. *Cytometry A.* **2014**;85(7):601-10. doi: 10.1002/cyto.a.22455.
- Ferretti MT, Merlini M, Späni C, Gericke C, Schweizer N, Enzmann G, et al.** T-cell brain infiltration and immature antigen-presenting cells in transgenic models of Alzheimer's disease-like cerebral amyloidosis. *Brain Behav Immun.* **2016**;54:211-225. doi: 10.1016/j.bbi.2016.02.009.
- Ferris HA, Perry RJ, Moreira GV, Shulman GI, Horton JD, Kahn CR.** Loss of astrocyte cholesterol synthesis disrupts neuronal function and alters whole-body metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2017**;114(5):1189-1194. doi:10.1073/pnas.1620506114
- Fester L, Zhou L, Bütow A, Huber C, von Lossow R, Prange-Kiel J, et al.** Cholesterol-promoted synaptogenesis requires the conversion of cholesterol to estradiol in the hippocampus. *Hippocampus.* **2009**;19(8):692-705. doi: 10.1002/hipo.20548.
- Fettke F, Schumacher A, Costa SD, Zenclussen AC.** B cells: the old new players in reproductive immunology. *Front Immunol.* **2014**;5:285. doi: 10.3389/fimmu.2014.00285.
- Fiala JC.** Mechanisms of amyloid plaque pathogenesis. *Acta Neuropathol.* **2007**;114(6):551-71. doi: 10.1007/s00401-007-0284-8.
- Fiebig C, Keiner S, Ebert B, Schäffner I, Jagasia R, Lie DC, Beckervordersandforth R.** Mitochondrial Dysfunction in Astrocytes Impairs the Generation of Reactive Astrocytes and Enhances Neuronal Cell Death in the Cortex Upon Photothrombotic Lesion. *Front Mol Neurosci.* **2019**;12:40. doi: 10.3389/fnmol.2019.00040.
- Filippi M, Bar-Or A, Piehl F, Preziosa P, Solari A, Vukusic S, Rocca MA.** Multiple sclerosis. *Nat Rev Dis Primers.* **2018**;4(1):43. doi: 10.1038/s41572-018-0041-4. Erratum in: *Nat Rev Dis Primers.* 2018 Nov 22;4(1):49.
- Finsterbusch M, Hall P, Li A, Devi S, Westhorpe CL, Kitching AR, Hickey MJ.** Patrolling monocytes promote intravascular neutrophil activation and glomerular injury in the acutely inflamed glomerulus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2016**;113(35):E5172-81. doi: 10.1073/pnas.1606253113.
- Fonseca MI, Zhou J, Botto M, Tenner AJ.** Absence of C1q leads to less neuropathology in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* **2004**;24(29):6457-6465. doi:10.1523/JNEUROSCI.0901-04.2004
- Fonseca MI, Ager RR, Chu SH, Yazan O, Sanderson SD, LaFerla FM, et al.** Treatment with a C5aR antagonist decreases pathology and enhances behavioral performance in murine models of Alzheimer's disease. *J Immunol.* **2009**;183(2):1375-83. doi: 10.4049/jimmunol.0901005.
- Fonseca MI, Chu SH, Hernandez MX, Fang MJ, Modarresi L, Selvan P, et al.** Cell-specific deletion of C1qa identifies microglia as the dominant source of C1q in mouse brain. *J Neuroinflammation.*



2017;14(1):48. doi: 10.1186/s12974-017-0814-9.

Ford AL, Goodsall AL, Hickey WF, Sedgwick JD. Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4⁺ T cells compared. *J Immunol.* **1995**;154(9):4309-21.

Forner S, Baglietto-Vargas D, Martini AC, Trujillo-Estrada L, LaFerla FM. Synaptic Impairment in Alzheimer's Disease: A Dysregulated Symphony. *Trends Neurosci.* **2017**;40(6):347-357. doi:10.1016/j.tins.2017.04.002

Foster EM, Dangla-Valls A, Lovestone S, Ribe EM, Buckley NJ. Clusterin in Alzheimer's Disease: Mechanisms, Genetics, and Lessons From Other Pathologies. *Front Neurosci.* **2019**;13:164. doi: 10.3389/fnins.2019.00164.

Fracassi A, Marangoni M, Rosso P, Pallottini V, Fioramonti M, Siteni S, Segatto M. Statins and the Brain: More than Lipid Lowering Agents? *Curr Neuropharmacol.* **2019**;17(1):59-83. doi: 10.2174/1570159X15666170703101816.

Frautschy SA, Cole GM, Baird A. Phagocytosis and deposition of vascular beta-amyloid in rat brains injected with Alzheimer beta-amyloid. *Am J Pathol.* **1992**;140(6):1389-99.

Friedberg JS, Aytan N, Cherry JD, Xia W, Standring OJ, Alvarez VE, et al. Associations between brain inflammatory profiles and human neuropathology are altered based on apolipoprotein E ϵ 4 genotype. *Sci Rep.* **2020**;10(1):2924. doi: 10.1038/s41598-020-59869-5.

Friedman LG, Qureshi YH, Yu WH. Promoting autophagic clearance: viable therapeutic targets in Alzheimer's disease.

Neurotherapeutics. **2015**;12(1):94-108. doi: 10.1007/s13311-014-0320-z.

Friedman BA, Srinivasan K, Ayalon G, Meilandt WJ, Lin H, Huntley MA, et al. Diverse Brain Myeloid Expression Profiles Reveal Distinct Microglial Activation States and Aspects of Alzheimer's Disease Not Evident in Mouse Models. *Cell Rep.* **2018**;22(3):832-847. doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.066.

Frings W, Dreier J, Sorg C. Only the soluble form of the scavenger receptor CD163 acts inhibitory on phorbol ester-activated T-lymphocytes, whereas membrane-bound protein has no effect. *FEBS Lett.* **2002**;526(1-3):93-96. doi:10.1016/s0014-5793(02)03142-3

Fryer HJ, Davis GE, Manthorpe M, Varon S. Lowry protein assay using an automatic microtiter plate spectrophotometer. *Anal Biochem.* **1986**;153(2):262-266. doi:10.1016/0003-2697(86)90090-4

Fu W, Jhamandas JH. Role of astrocytic glycolytic metabolism in Alzheimer's disease pathogenesis. *Biogerontology.* **2014**;15(6):579-86. doi: 10.1007/s10522-014-9525-0.

Fuhrmann M, Bittner T, Jung CK, Burgold S, Page RM, Mitteregger G, et al. Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci.* **2010**;13(4):411-3. doi: 10.1038/nn.2511.

Furman JL, Sama DM, Gant JC, Beckett TL, Murphy MP, Bachstetter AD, et al. Targeting astrocytes ameliorates neurologic changes in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* **2012**;32(46):16129-40. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2323-12.2012.

Galatro TF, Holtman IR, Lerario AM, Vainchtein ID, Brouwer N, Sola PR, et al. Transcriptomic analysis of purified human cortical microglia reveals age-associated changes. *Nat Neurosci.*



- 2017;20(8):1162-1171. doi: 10.1038/nn.4597.
- Galea I, Palin K, Newman TA, Van Rooijen N, Perry VH, Boche D.** Mannose receptor expression specifically reveals perivascular macrophages in normal, injured, and diseased mouse brain. *Glia*. 2005;49(3):375-384. doi:10.1002/glia.20124
- Galea I, Bechmann I, Perry VH.** What is immune privilege (not)?. *Trends Immunol*. 2007;28(1):12-18. doi:10.1016/j.it.2006.11.004
- Gao YL, Wang N, Sun FR, Cao XP, Zhang W, Yu JT.** Tau in neurodegenerative disease. *Ann Transl Med*. 2018;6(10):175. doi:10.21037/atm.2018.04.23
- García-Cáceres C, Quarta C, Varela L, Gao Y, Gruber T, Legutko B, et al.** Astrocytic Insulin Signaling Couples Brain Glucose Uptake with Nutrient Availability. *Cell*. 2016;166(4):867-880. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.028. P
- García-Junco-Clemente P, Cantero G, Gómez-Sánchez L, Linares-Clemente P, Martínez-López JA, Luján R, Fernández-Chacón R.** Cysteine string protein-alpha prevents activity-dependent degeneration in GABAergic synapses. *J Neurosci*. 2010;30(21):7377-91. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0924-10.2010.
- Garwood CJ, Pooler AM, Atherton J, Hanger DP, Noble W.** Astrocytes are important mediators of A β -induced neurotoxicity and tau phosphorylation in primary culture. *Cell Death Dis*. 2011;2(6):e167. doi: 10.1038/cddis.2011.50.
- Garwood CJ, Ratcliffe LE, Simpson JE, Heath PR, Ince PG, Wharton SB.** Review: Astrocytes in Alzheimer's disease and other age-associated dementias: a supporting player with a central role. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2017;43(4):281-298. doi:10.1111/nan.12338
- Gasque P, Ischenko A, Legoedec J, Mauger C, Schouft MT, Fontaine M.** Expression of the complement classical pathway by human glioma in culture. A model for complement expression by nerve cells. *J Biol Chem*. 1993;268(33):25068-25074.
- Gasque P, Fontaine M, Morgan BP.** Complement expression in human brain. Biosynthesis of terminal pathway components and regulators in human glial cells and cell lines. *J Immunol*. 1995a;154(9):4726-4733.
- Gasque P, Chan P, Fontaine M, Ischenko A, Lamacz M, Götze O, Morgan BP.** Identification and characterization of the complement C5a anaphylatoxin receptor on human astrocytes. *J Immunol*. 1995b;155(10):4882-9.
- Gasque P, Chan P, Mauger C, Schouft MT, Singhrao S, Dierich MP, et al.** Identification and characterization of complement C3 receptors on human astrocytes. *J Immunol*. 1996;156(6):2247-55.
- Gauthier S, Aisen PS, Cummings J, Detke MJ, Longo FM, Raman R, et al.** Non-Amyloid Approaches to Disease Modification for Alzheimer's Disease: An EU/US CTAD Task Force Report. *J Prev Alzheimers Dis*. 2020;6:1-6. doi: 10.14283/jpad.2020.18.
- Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, et al.** Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol*. 2012;13(11):1118-28. doi: 10.1038/ni.2419.
- Geirsdottir L, David E, Keren-Shaul H, Weiner A, Bohlen SC, Neuber J, et al.** Cross-Species Single-Cell Analysis Reveals Divergence of the Primate



- Microglia Program. *Cell*. **2019**;179(7):1609-1622.e16. doi: 10.1016/j.cell.2019.11.010. Erratum in: *Cell*. 2020 Apr 30;181(3):746.
- Gendreau KL, Hall GF.** Tangles, Toxicity, and Tau Secretion in AD - New Approaches to a Vexing Problem. *Front Neurol*. **2013**;4:160. doi: 10.3389/fneur.2013.00160.
- Gerdes MJ, Sevinsky CJ, Sood A, Adak S, Bello MO, Bordwell A, et al.** Highly multiplexed single-cell analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded cancer tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2013**;110(29):11982-7. doi: 10.1073/pnas.1300136110.
- Giesen C, Wang HA, Schapiro D, Zivanovic N, Jacobs A, Hattendorf B, et al.** Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry. *Nat Methods*. **2014**;11(4):417-22. doi: 10.1038/nmeth.2869.
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, et al.** Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. **2010**;330(6005):841-5. doi: 10.1126/science.1194637.
- Ginhoux F, Jung S.** Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol*. **2014**;14(6):392-404. doi:10.1038/nri3671
- Ginzinger DG.** Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol*. **2002**;30(6):503-12. doi: 10.1016/s0301-472x(02)00806-8.
- Giri R, Shen Y, Stins M, Du Yan S, Schmidt AM, Stern D, et al.** beta-amyloid-induced migration of monocytes across human brain endothelial cells involves RAGE and PECAM-1. *Am J Physiol Cell Physiol*. **2000**;279(6):C1772-81. doi: 10.1152/ajpcell.2000.279.6.C1772.
- Giri M, Zhang M, Lü Y.** Genes associated with Alzheimer's disease: an overview and current status. *Clin Interv Aging*. **2016**;11:665-81. doi: 10.2147/CIA.S105769.
- Giuffrida ML, Caraci F, Pignataro B, Cataldo S, De Bona P, Bruno V, et al.** Beta-amyloid monomers are neuroprotective. *J Neurosci*. **2009**;29(34):10582-7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1736-09.2009.
- Glenner GG, Wong CW.** Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*. **1984**;120(3):885-90. doi: 10.1016/s0006-291x(84)80190-4.
- Goetzl EJ, Schwartz JB, Abner EL, Jicha GA, Kapogiannis D.** High complement levels in astrocyte-derived exosomes of Alzheimer disease. *Ann Neurol*. **2018**;83(3):544-552. doi:10.1002/ana.25172
- Goldmann T, Wieghofer P, Jordão MJ, Prutek F, Hagemeyer N, Frenzel K, et al.** Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nat Immunol*. **2016**;17(7):797-805. doi: 10.1038/ni.3423.
- Goltsev Y, Samusik N, Kennedy-Darling J, Bhate S, Hale M, Vazquez G, et al.** Deep Profiling of Mouse Splenic Architecture with CODEX Multiplexed Imaging. *Cell*. **2018**;174(4):968-981.e15. doi: 10.1016/j.cell.2018.07.010.
- Gomez-Arboledas A, Davila JC, Sanchez-Mejias E, Navarro V, Nuñez-Diaz C, Sanchez-Varo R, et al.** Phagocytic clearance of presynaptic dystrophies by reactive astrocytes in Alzheimer's disease. *Glia*. **2018**;66(3):637-653. doi: 10.1002/glia.23270.
- Gomez-Isla T, Price JL, McKeel DW Jr, Morris JC, Growdon JH, Hyman BT.** Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild



- Alzheimer's disease. *J Neurosci.* **1996a**;16(14):4491-4500. doi:10.1523/JNEUROSCI.16-14-04491.1996
- Gomez-Isla T, West HL, Rebeck GW, Harr SD, Growdon JH, Locascio JJ, et al.** Clinical and pathological correlates of apolipoprotein E epsilon 4 in Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* **1996b**;39(1):62-70. doi: 10.1002/ana.410390110.
- Gomez-Isla T, Spire T, De Calignon A, Hyman BT.** Neuropathology of Alzheimer's disease. *Handb Clin Neurol.* **2008**;89:233-243. doi:10.1016/S0072-9752(07)01222-5
- Gomez-Nicola D, Perry VH.** Microglial dynamics and role in the healthy and diseased brain: a paradigm of functional plasticity. *Neuroscientist.* **2015**;21(2):169-184. doi:10.1177/1073858414530512
- Gordon DL, Avery VM, Adrian DL, Sadlon TA.** Detection of complement protein mRNA in human astrocytes by the polymerase chain reaction. *J Neurosci Methods.* **1992**;45(3):191-197. doi:10.1016/0165-0270(92)90076-p
- Gordon BA, Blazey TM, Su Y, Hari-Raj A, Dincer A, Flores S, et al.** Spatial patterns of neuroimaging biomarker change in individuals from families with autosomal dominant Alzheimer's disease: a longitudinal study. *Lancet Neurol.* **2018**;17(3):241-250. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30028-0.
- Goritz C, Mauch DH, Pfrieder FW.** Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron. *Mol Cell Neurosci.* **2005**;29(2):190-201. doi:10.1016/j.mcn.2005.02.006
- Govindpani K, McNamara LG, Smith NR, Vinnakota C, Waldvogel HJ, Faull RL, Kwakowsky A.** Vascular Dysfunction in Alzheimer's Disease: A Prelude to the Pathological Process or a Consequence of It? *J Clin Med.* **2019**;8(5):651. doi: 10.3390/jcm8050651.
- Grabert K, Michael T, Karavolos MH, Clohisey S, Baillie JK, Stevens MP, et al.** Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nat Neurosci.* **2016**;19(3):504-16. doi: 10.1038/nn.4222.
- Gray SM, Kaech SM, Staron MM.** The interface between transcriptional and epigenetic control of effector and memory CD8⁺ T-cell differentiation. *Immunol Rev.* **2014**;261(1):157-68. doi: 10.1111/imr.12205.
- Greenberg SM, Bacskai BJ, Hernandez-Guillamon M, Pruzin J, Sperling R, van Veluw SJ.** Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease - one peptide, two pathways. *Nat Rev Neurol.* **2020**;16(1):30-42. doi: 10.1038/s41582-019-0281-2.
- Greenhalgh AD, David S, Bennett FC.** Immune cell regulation of glia during CNS injury and disease. *Nat Rev Neurosci.* **2020**;21(3):139-152. doi:10.1038/s41583-020-0263-9
- Grimm MO, Grimm HS, Pätzold AJ, Zinser EG, Halonen R, Duering M, et al.** Regulation of cholesterol and sphingomyelin metabolism by amyloid-beta and presenilin. *Nat Cell Biol.* **2005**;7(11):1118-23. doi: 10.1038/ncb1313. Erratum in: *Nat Cell Biol.* 2006 Apr;8(4):424.
- Grimm MO, Mett J, Grimm HS, Hartmann T.** APP Function and Lipids: A Bidirectional Link. *Front Mol Neurosci.* **2017**;10:63. doi: 10.3389/fnmol.2017.00063.
- Grubman A, Chew G, Ouyang JF, Sun G, Choo XY, McLean C, et al.** A single-cell atlas of entorhinal cortex from individuals with Alzheimer's disease reveals cell-type-specific gene expression regulation. *Nat Neurosci.*



- 2019;22(12):2087-2097. doi: 10.1038/s41593-019-0539-4.
- Guedes JR, Lao T, Cardoso AL, El Khoury J.** Roles of Microglial and Monocyte Chemokines and Their Receptors in Regulating Alzheimer's Disease-Associated Amyloid- β and Tau Pathologies. *Front Neurol.* 2018;9:549. doi: 10.3389/fneur.2018.00549.
- Guilliams M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, et al.** Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(8):571-8. doi: 10.1038/nri3712.
- Gupta Y, Lee KH, Choi KY, Lee JJ, Kim BC, Kwon GR, et al.** Early diagnosis of Alzheimer's disease using combined features from voxel-based morphometry and cortical, subcortical, and hippocampus regions of MRI T1 brain images. *PLoS One.* 2019;14(10):e0222446. doi: 10.1371/journal.pone.0222446.
- Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE.** NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae.* 2015;7(2):42-47.
- Gutala RV, Reddy PH.** The use of real-time PCR analysis in a gene expression study of Alzheimer's disease post-mortem brains. *J Neurosci Methods.* 2004;132(1):101-107. doi:10.1016/j.jneumeth.2003.09.005
- Gutierrez A, Vitorica J.** Toward a New Concept of Alzheimer's Disease Models: A Perspective from Neuroinflammation. *J Alzheimers Dis.* 2018;64(s1):S329-S338. doi:10.3233/JAD-179914
- Gutiérrez IL, González-Prieto M, Caso JR, García-Bueno B, Leza JC, Madrigal JLM.** Reboxetine Treatment Reduces Neuroinflammation and Neurodegeneration in the 5xFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease: Role of CCL2. *Mol Neurobiol.* 2019;56(12):8628-8642. doi:10.1007/s12035-019-01695-6
- Györfy BA, Kun J, Török G, Bulyáki É, Borhegyi Z, Gulyácssy P, et al.** Local apoptotic-like mechanisms underlie complement-mediated synaptic pruning. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(24):6303-6308. doi: 10.1073/pnas.1722613115.
- Haage V, Semtner M, Vidal RO, Hernandez DP, Pong WW, Chen Z, et al.** Comprehensive gene expression meta-analysis identifies signature genes that distinguish microglia from peripheral monocytes/macrophages in health and glioma. *Acta Neuropathol Commun.* 2019;7(1):20. doi: 10.1186/s40478-019-0665-y. Erratum in: *Acta Neuropathol Commun.* 2020 Jan 8;8(1):1.
- Haass C, Hung AY, Selkoe DJ.** Processing of beta-amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors an internal localization over constitutive secretion. *J Neurosci.* 1991;11(12):3783-93. doi: 10.1523/JNEUROSCI.11-12-03783.1991.
- Haass C, Selkoe DJ.** Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(2):101-12. doi: 10.1038/nrm2101.
- Habib N, McCabe C, Medina S, Varshavsky M, Kitsberg D, Dvir-Szternfeld R, et al.** Disease-associated astrocytes in Alzheimer's disease and aging. *Nat Neurosci.* 2020;23(6):701-706. doi: 10.1038/s41593-020-0624-8.
- Hajishengallis G, Reis ES, Mastellos DC, Ricklin D, Lambris JD.** Novel mechanisms and functions of complement. *Nat Immunol.* 2017;18(12):1288-1298. doi:10.1038/ni.3858
- Halks-Miller M, Schroeder ML, Haroutunian V, Moenning U, Rossi M, Achim C, et al.** CCR1 is an early and specific marker of Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 2003;54(5):638-46. doi: 10.1002/ana.10733.



- Hammond TR, Dufort C, Dissing-Olesen L, Giera S, Young A, Wysoker A, et al.** Single-Cell RNA Sequencing of Microglia throughout the Mouse Lifespan and in the Injured Brain Reveals Complex Cell-State Changes. *Immunity*. **2019**;50(1):253-271.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2018.11.004.
- Han X, Zhang T, Liu H, Mi Y, Gou X.** Astrocyte Senescence and Alzheimer's Disease: A Review. *Front Aging Neurosci*. **2020**;12:148. doi: 10.3389/fnagi.2020.00148.
- Hane FT, Lee BY, Leonenko Z.** Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 1: Pathology. *J Alzheimers Dis*. **2017a**;57(1):1-28. doi:10.3233/JAD-160882
- Hane FT, Robinson M, Lee BY, Bai O, Leonenko Z, Albert MS.** Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 3: Diagnosis and Treatment. *J Alzheimers Dis*. **2017b**;57(3):645-665. doi:10.3233/JAD-160907
- Hansen DV, Hanson JE, Sheng M.** Microglia in Alzheimer's disease. *J Cell Biol*. **2018**;217(2):459-472. doi:10.1083/jcb.201709069
- Hardy JA, Higgins GA.** Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. **1992**;256(5054):184-5. doi: 10.1126/science.1566067.
- Hartl D, May P, Gu W, Mayhaus M, Pichler S, Spaniol C, et al.** A rare loss-of-function variant of ADAM17 is associated with late-onset familial Alzheimer disease. *Mol Psychiatry*. **2020**;25(3):629-639. doi: 10.1038/s41380-018-0091-8.
- Haruwaka K, Ikegami A, Tachibana Y, Ohno N, Konishi H, Hashimoto A, et al.** Dual microglia effects on blood brain barrier permeability induced by systemic inflammation. *Nat Commun*. **2019**;10(1):5816. doi: 10.1038/s41467-019-13812-z.
- Hasel P, Dando O, Jiwaji Z, Baxter P, Todd AC, Heron S, et al.** Neurons and neuronal activity control gene expression in astrocytes to regulate their development and metabolism. *Nat Commun*. **2017** 2;8:15132. doi: 10.1038/ncomms15132. Erratum in: *Nat Commun*. 2018 Feb 06;9:16176.
- Hashimoto D, Chow A, Noizat C, Teo P, Beasley MB, Leboeuf M, et al.** Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*. **2013**;38(4):792-804. doi: 10.1016/j.immuni.2013.04.004.
- Hawkes CA, McLaurin J.** Selective targeting of perivascular macrophages for clearance of beta-amyloid in cerebral amyloid angiopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2009**;106(4):1261-1266. doi:10.1073/pnas.0805453106
- He H, Mack JJ, Güç E, Warren CM, Squadrito ML, Kilarski WW, et al.** Perivascular Macrophages Limit Permeability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2016**;36(11):2203-2212. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.307592.
- Hebert LE, Weuve J, Scherr PA, Evans DA.** Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology*. **2013**;80(19):1778-1783. doi:10.1212/WNL.0b013e31828726f5
- Hemonnot AL, Hua J, Ulmann L, Hirbec H.** Microglia in Alzheimer Disease: Well-Known Targets and New Opportunities. *Front Aging Neurosci*. **2019**;11:233. doi: 10.3389/fnagi.2019.00233.
- Hendrickx DAE, van Eden CG, Schuurman KG, Hamann J, Huitinga I.** Staining of HLA-DR, Iba1 and CD68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology. *J Neuroimmunol*. **2017**;309:12-22. doi:10.1016/j.jneuroim.2017.04.007



- Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, et al.** Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* **2015**;14(4):388-405. doi: 10.1016/S1474-4422(15)70016-5.
- Henrik Heiland D, Ravi VM, Behringer SP, Frenking JH, Wurm J, Joseph K, et al.** Tumor-associated reactive astrocytes aid the evolution of immunosuppressive environment in glioblastoma. *Nat Commun.* **2019**;10(1):2541. doi: 10.1038/s41467-019-10493-6.
- Heurtaux T, Michelucci A, Losciuto S, Gallotti C, Felten P, Dorban G, et al.** Microglial activation depends on beta-amyloid conformation: role of the formylpeptide receptor 2. *J Neurochem.* **2010**;114(2):576-86. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06783.x.
- Hickman SE, Kingery ND, Ohsumi TK, Borowsky ML, Wang LC, Means TK, El Khoury J.** The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nat Neurosci.* **2013**;16(12):1896-905. doi: 10.1038/nn.3554.
- Hickman SE, El Khoury J.** TREM2 and the neuroimmunology of Alzheimer's disease. *Biochem Pharmacol.* **2014**;88(4):495-498. doi:10.1016/j.bcp.2013.11.021
- Hillen AEJ, Burbach JPH, Hol EM.** Cell adhesion and matricellular support by astrocytes of the tripartite synapse. *Prog Neurobiol.* **2018**;165-167:66-86. doi:10.1016/j.pneurobio.2018.02.002
- Hillen H.** The Beta Amyloid Dysfunction (BAD) Hypothesis for Alzheimer's Disease. *Front Neurosci.* **2019**;13:1154. doi: 10.3389/fnins.2019.01154.
- Hiltunen M, van Groen T, Jolkkonen J.** Functional roles of amyloid-beta protein precursor and amyloid-beta peptides: evidence from experimental studies. *J Alzheimers Dis.* **2009**;18(2):401-12. doi: 10.3233/JAD-2009-1154.
- Hoe HS, Rebeck GW.** Functional interactions of APP with the apoE receptor family. *J Neurochem.* **2008**;106(6):2263-71. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05517.x.
- Hof PR, Cox K, Young WG, Celio MR, Rogers J, Morrison JH.** Parvalbumin-immunoreactive neurons in the neocortex are resistant to degeneration in Alzheimer's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* **1991**;50(4):451-462. doi:10.1097/00005072-199107000-00006
- Högger P, Sorg C.** Soluble CD163 inhibits phorbol ester-induced lymphocyte proliferation. *Biochem Biophys Res Commun.* **2001**;288(4):841-843. doi:10.1006/bbrc.2001.5845
- Hohsfield LA, Humpel C.** Migration of blood cells to β -amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol.* **2015**;65:8-15. doi:10.1016/j.exger.2015.03.002
- Hohsfield LA, Najafi AR, Ghorbanian Y, Soni N, Hingco EE, Kim SJ, et al.** Effects of long-term and brain-wide colonization of peripheral bone marrow-derived myeloid cells in the CNS. *J Neuroinflammation.* **2020**;17(1):279. doi: 10.1186/s12974-020-01931-0.
- Holmes C, Cunningham C, Zotova E, Woolford J, Dean C, Kerr S, et al.** Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology.* **2009**;73(10):768-74. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181b6bb95.
- Holtman IR, Skola D, Glass CK.** Transcriptional control of microglia phenotypes in health and disease. *J Clin Invest.* **2017**;127(9):3220-3229. doi:10.1172/JCI90604
- Holtzman DM, Carrillo MC, Hendrix JA, Bain LJ, Catafau AM, Gault LM, et al.** Tau: From research to clinical development. *Alzheimers Dement.*



2016;12(10):1033-1039. doi:
10.1016/j.jalz.2016.03.018.

Hong S, Beja-Glasser VF, Nfonoyim BM, Frouin A, Li S, Ramakrishnan S, et al. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science*. 2016;352(6286):712-716. doi: 10.1126/science.aad8373.

Honjo K, van Reekum R, Verhoeff NP. Alzheimer's disease and infection: do infectious agents contribute to progression of Alzheimer's disease?. *Alzheimers Dement*. 2009;5(4):348-360. doi:10.1016/j.jalz.2008.12.001

Hopp SC, Lin Y, Oakley D, Roe AD, DeVos SL, Hanlon D, Hyman BT. The role of microglia in processing and spreading of bioactive tau seeds in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2018 18;15(1):269. doi: 10.1186/s12974-018-1309-z.

Hopperton KE, Mohammad D, Trépanier MO, Giuliano V, Bazinet RP. Markers of microglia in post-mortem brain samples from patients with Alzheimer's disease: a systematic review. *Mol Psychiatry*. 2018;23(2):177-198. doi:10.1038/mp.2017.246

Hoshi A, Yamamoto T, Shimizu K, Ugawa Y, Nishizawa M, Takahashi H, Kakita A. Characteristics of aquaporin expression surrounding senile plaques and cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012;71(8):750-9. doi: 10.1097/NEN.0b013e3182632566.

Howlett DR, Richardson JC. The pathology of APP transgenic mice: a model of Alzheimer's disease or simply overexpression of APP? *Histol Histopathol*. 2009;24(1):83-100. doi: 10.14670/HH-24.83.

Hubbard JA, Szu JI, Binder DK. The role of aquaporin-4 in synaptic plasticity, memory and disease. *Brain Res Bull*.

2018;136:118-129.
doi:10.1016/j.brainresbull.2017.02.011

Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J*. 2018;285(16):2944-2971. doi:10.1111/febs.14466

Hur JY, Frost GR, Wu X, Crump C, Pan SJ, Wong E, et al. The innate immunity protein IFITM3 modulates γ -secretase in Alzheimer's disease. *Nature*. 2020. doi: 10.1038/s41586-020-2681-2.

Hyman BT, West HL, Rebeck GW, Buldyrev SV, Mantegna RN, Ukleja M, et al. Quantitative analysis of senile plaques in Alzheimer disease: observation of log-normal size distribution and molecular epidemiology of differences associated with apolipoprotein E genotype and trisomy 21 (Down syndrome). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(8):3586-90. doi: 10.1073/pnas.92.8.3586.

Hyman BT, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Carrillo MC, et al. National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2012;8(1):1-13. doi: 10.1016/j.jalz.2011.10.007.

Ignatenko O, Chilov D, Paetau I, de Miguel E, Jackson CB, Capin G, et al. Loss of mtDNA activates astrocytes and leads to spongiform encephalopathy. *Nat Commun*. 2018;9(1):70. doi: 10.1038/s41467-017-01859-9.

Iloff JJ, Nedergaard M. Is there a cerebral lymphatic system?. *Stroke*. 2013;44(6 Suppl 1):S93-S95. doi:10.1161/STROKEAHA.112.678698

Imbimbo BP, Watling M. Investigational BACE inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs*. 2019;28(11):967-975. doi:10.1080/13543784.2019.1683160



- Ingelsson M, Fukumoto H, Newell KL, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Frosch MP, et al.** Early Abeta accumulation and progressive synaptic loss, gliosis, and tangle formation in AD brain. *Neurology*. **2004**;62(6):925-31. doi: 10.1212/01.wnl.0000115115.98960.37.
- Ioannou MS, Jackson J, Sheu SH, Chang CL, Weigel AV, Liu H, et al.** Neuron-Astrocyte Metabolic Coupling Protects against Activity-Induced Fatty Acid Toxicity. *Cell*. **2019**;177(6):1522-1535.e14. doi: 10.1016/j.cell.2019.04.001.
- Iqbal K, Grundke-Iqbal I.** Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention. *J Cell Mol Med*. **2008**;12(1):38-55. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00225.x.
- Iqbal K, Liu F, Gong CX.** Tau and neurodegenerative disease: the story so far. *Nat Rev Neurol*. **2016**;12(1):15-27. doi: 10.1038/nrneurol.2015.225.
- Ishibashi M, Egawa K, Fukuda A.** Diverse Actions of Astrocytes in GABAergic Signaling. *Int J Mol Sci*. **2019**;20(12):2964. doi: 10.3390/ijms20122964.
- Ishizuka K, Kimura T, Igata-yi R, Katsuragi S, Takamatsu J, Miyakawa T.** Identification of monocyte chemoattractant protein-1 in senile plaques and reactive microglia of Alzheimer's disease. *Psychiatry Clin Neurosci*. **1997**;51(3):135-138. doi:10.1111/j.1440-1819.1997.tb02375.x
- Ismail R, Parbo P, Madsen LS, Hansen AK, Hansen KV, Schaldemose JL, et al.** The relationships between neuroinflammation, beta-amyloid and tau deposition in Alzheimer's disease: a longitudinal PET study. *J Neuroinflammation*. **2020**;17(1):151. doi: 10.1186/s12974-020-01820-6.
- Jais A, Solas M, Backes H, Chaurasia B, Kleinridders A, Theurich S, et al.** Myeloid-Cell-Derived VEGF Maintains Brain Glucose Uptake and Limits Cognitive Impairment in Obesity. *Cell*. **2016**;165(4):882-95. doi: 10.1016/j.cell.2016.03.033. Erratum in: *Cell*. 2016 Aug 25;166(5):1338-1340.
- Jay TR, Miller CM, Cheng PJ, Graham LC, Bemiller S, Broihier ML, et al.** TREM2 deficiency eliminates TREM2+ inflammatory macrophages and ameliorates pathology in Alzheimer's disease mouse models. *J Exp Med*. **2015**;212(3):287-95. doi: 10.1084/jem.20142322.
- Jeong S.** Molecular and Cellular Basis of Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *Mol Cells*. **2017**;40(9):613-620. doi:10.14348/molcells.2017.0096
- Jeong W, Lee H, Cho S, Seo J.** ApoE4-Induced Cholesterol Dysregulation and Its Brain Cell Type-Specific Implications in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Mol Cells*. **2019**;42(11):739-746. doi:10.14348/molcells.2019.0200
- Jernberg JN, Bowman CE, Wolfgang MJ, Scafidi S.** Developmental regulation and localization of carnitine palmitoyltransferases (CPTs) in rat brain. *J Neurochem*. **2017**;142(3):407-419. doi:10.1111/jnc.14072
- Jevtic S, Sengar AS, Salter MW, McLaurin J.** The role of the immune system in Alzheimer disease: Etiology and treatment. *Ageing Res Rev*. **2017**;40:84-94. doi:10.1016/j.arr.2017.08.005
- Jha MK, Jo M, Kim JH, Suk K.** Microglia-Astrocyte Crosstalk: An Intimate Molecular Conversation. *Neuroscientist*. **2019**;25(3):227-240. doi: 10.1177/1073858418783959.
- Jiang H, Burdick D, Glabe CG, Cotman CW, Tenner AJ.** beta-Amyloid activates complement by binding to a specific region of the collagen-like domain of the C1q A chain. *J Immunol*. **1994**;152(10):5050-5059.



- Jiang Q, Lee CY, Mandrekar S, Wilkinson B, Cramer P, Zelcer N, et al.** ApoE promotes the proteolytic degradation of Abeta. *Neuron*. 2008;58(5):681-93. doi: 10.1016/j.neuron.2008.04.010.
- Jiang T, Cadenas E.** Astrocytic metabolic and inflammatory changes as a function of age. *Aging Cell*. 2014;13(6):1059-67. doi: 10.1111/accel.12268.
- Jimenez S, Baglietto-Vargas D, Caballero C, Moreno-Gonzalez I, Torres M, Sanchez-Varo R, et al.** Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J Neurosci*. 2008;28(45):11650-61. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3024-08.2008.
- Jimenez S, Torres M, Vizuete M, Sanchez-Varo R, Sanchez-Mejias E, Trujillo-Estrada L, et al.** Age-dependent accumulation of soluble amyloid beta (Abeta) oligomers reverses the neuroprotective effect of soluble amyloid precursor protein-alpha (sAPP(alpha)) by modulating phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt-GSK-3beta pathway in Alzheimer mouse model. *J Biol Chem*. 2011;286(21):18414-25. doi: 10.1074/jbc.M110.209718.
- Jimenez S, Navarro V, Moyano J, Sanchez-Mico M, Torres M, Davila JC, et al.** Disruption of amyloid plaques integrity affects the soluble oligomers content from Alzheimer disease brains. *PLoS One*. 2014;9(12):e114041. doi: 10.1371/journal.pone.0114041.
- Johanson CE, Stopa EG, Daiello L, de la Monte S, Keane M, Ott BR.** Disrupted Blood-CSF Barrier to Urea and Creatinine in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis Parkinsonism*. 2018; 8: 435. DOI: 10.4172/2161-0460.1000435.
- John Lin CC, Yu K, Hatcher A, Huang TW, Lee HK, Carlson J, et al.** Identification of diverse astrocyte populations and their malignant analogs. *Nat Neurosci*. 2017;20(3):396-405. doi: 10.1038/nn.4493.
- Joly-Amado A, Hunter J, Quadri Z, Zamudio F, Rocha-Rangel PV, Chan D, et al.** CCL2 Overexpression in the Brain Promotes Glial Activation and Accelerates Tau Pathology in a Mouse Model of Tauopathy. *Front Immunol*. 2020;11:997. doi: 10.3389/fimmu.2020.00997.
- Jonsson T, Stefansson H, Steinberg S, Jonsdottir I, Jonsson PV, Snaedal J, et al.** Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med*. 2013;368(2):107-16. doi: 10.1056/NEJMoa1211103.
- Jordão MJC, Sankowski R, Brendecke SM, Sagar, Locatelli G, Tai YH, et al.** Single-cell profiling identifies myeloid cell subsets with distinct fates during neuroinflammation. *Science*. 2019;363(6425):eaat7554. doi: 10.1126/science.aat7554.
- Jucker M, Walker LC.** Pathogenic protein seeding in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Ann Neurol*. 2011;70(4):532-540. doi:10.1002/ana.22615
- Jucker M, Walker LC.** Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature*. 2013;501(7465):45-51. doi:10.1038/nature12481
- Jun G, Naj AC, Beecham GW, Wang LS, Buross J, Gallins PJ, et al.** Meta-analysis confirms CR1, CLU, and PICALM as Alzheimer disease risk loci and reveals interactions with APOE genotypes. *Arch Neurol*. 2010;67(12):1473-84. doi: 10.1001/archneurol.2010.201. Erratum in: *Arch Neurol*. 2011 Feb;68(2):159.



- Kälin AM, Park MT, Chakravarty MM, Lerch JP, Michels L, Schroeder C, et al.** Subcortical Shape Changes, Hippocampal Atrophy and Cortical Thinning in Future Alzheimer's Disease Patients. *Front Aging Neurosci.* **2017**;9:38. doi: 10.3389/fnagi.2017.00038.
- Kamphuis W, Kooijman L, Orre M, Stassen O, Pekny M, Hol EM.** GFAP and vimentin deficiency alters gene expression in astrocytes and microglia in wild-type mice and changes the transcriptional response of reactive glia in mouse model for Alzheimer's disease. *Glia.* **2015**;63(6):1036-1056. doi:10.1002/glia.22800
- Kamphuis W, Kooijman L, Schettters S, Orre M, Hol EM.** Transcriptional profiling of CD11c-positive microglia accumulating around amyloid plaques in a mouse model for Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* **2016**;1862(10):1847-1860. doi:10.1016/j.bbadis.2016.07.007
- Kantzer CG, Boutin C, Herzig ID, Wittwer C, Reiß S, Tiveron MC, et al.** Anti-ACSA-2 defines a novel monoclonal antibody for prospective isolation of living neonatal and adult astrocytes. *Glia.* **2017**;65(6):990-1004. doi: 10.1002/glia.23140.
- Karch CM, Cruchaga C, Goate AM.** Alzheimer's disease genetics: from the bench to the clinic. *Neuron.* **2014**;83(1):11-26. doi:10.1016/j.neuron.2014.05.041
- Karran E, De Strooper B.** The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *J Neurochem.* **2016**;139 Suppl 2:237-252. doi: 10.1111/jnc.13632.
- Katayama H.** Anti-interleukin-17A and anti-interleukin-23 antibodies may be effective against Alzheimer's disease: Role of neutrophils in the pathogenesis. *Brain Behav.* **2020**;10(1):e01504. doi:10.1002/brb3.1504
- Katsouri L, Birch AM, Renziehausen AWJ, Zach C, Aman Y, Steeds H, et al.** Ablation of reactive astrocytes exacerbates disease pathology in a model of Alzheimer's disease. *Glia.* **2020**;68(5):1017-1030. doi: 10.1002/glia.23759.
- Katzman R, Terry R, DeTeresa R, Brown T, Davies P, Fuld P, et al.** Clinical, pathological, and neurochemical changes in dementia: a subgroup with preserved mental status and numerous neocortical plaques. *Ann Neurol.* **1988**;23(2):138-44. doi: 10.1002/ana.410230206.
- Kaur D, Sharma V, Deshmukh R.** Activation of microglia and astrocytes: a roadway to neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology.* **2019**;27(4):663-677. doi:10.1007/s10787-019-00580-x
- Kawano H, Katsurabayashi S, Kakazu Y, Yamashita Y, Kubo N, Kubo M, et al.** Long-term culture of astrocytes attenuates the readily releasable pool of synaptic vesicles. *PLoS One.* **2012**;7(10):e48034. doi: 10.1371/journal.pone.0048034. Erratum in: *PLoS One.* **2012**;7(11). doi:10.1371/annotation/9dd1f25a-55e9-4968-9f70-929d1b8d5064.
- Kenney PM, Bennett JP Jr.** Alzheimer's Disease Frontal Cortex Mitochondria Show a Loss of Individual Respiratory Proteins but Preservation of Respiratory Supercomplexes. *Int J Alzheimers Dis.* **2019**;2019:4814783. doi: 10.1155/2019/4814783.
- Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Szternfeld R, Ulland TK, et al.** A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell.* **2017**;169(7):1276-1290.e17. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.018.



- Kester MI, van der Flier WM, Visser A, Blankenstein MA, Scheltens P, Oudejans CB.** Decreased mRNA expression of CCL5 [RANTES] in Alzheimer's disease blood samples. *Clin Chem Lab Med.* **2011**;50(1):61-5. doi: 10.1515/CCLM.2011.731.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, hratsky A.** Physiology of microglia. *Physiol Rev.* **2011**;91(2):461-553. doi:10.1152/physrev.00011.2010
- Kielian T.** Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. *J Neurosci Res.* **2006**;83(5):711-730. doi:10.1002/jnr.20767
- Kierdorf K, Prinz M.** Microglia in steady state. *J Clin Invest.* **2017**;127(9):3201-3209. doi:10.1172/JCI90602
- Kierdorf K, Masuda T, Jordão MJC, Prinz M.** Macrophages at CNS interfaces: ontogeny and function in health and disease. *Nat Rev Neurosci.* **2019**;20(9):547-562. doi:10.1038/s41583-019-0201-x
- Kim RY, Hoffman AS, Itoh N, Ao Y, Spence R, Sofroniew MV, Voskuhl RR.** Astrocyte CCL2 sustains immune cell infiltration in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* **2014**;274(1-2):53-61. doi: 10.1016/j.jneuroim.2014.06.009.
- Kim E, Cho S.** Microglia and Monocyte-Derived Macrophages in Stroke. *Neurotherapeutics.* **2016**;13(4):702-718. doi:10.1007/s13311-016-0463-1
- Kimura T, Ishiguro K, Hisanaga S.** Physiological and pathological phosphorylation of tau by Cdk5. *Front Mol Neurosci.* **2014**;7:65. doi: 10.3389/fnmol.2014.00065.
- Kimura A, Yoshikura N, Hayashi Y, Inuzuka T.** Cerebrospinal Fluid C-C Motif Chemokine Ligand 2 Correlates with Brain Atrophy and Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* **2018**;61(2):581-588. doi:10.3233/JAD-170519
- King E, O'Brien JT, Donaghy P, Morris C, Barnett N, Olsen K, et al.** Peripheral inflammation in prodromal Alzheimer's and Lewy body dementias. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* **2018**;89(4):339-345. doi: 10.1136/jnnp-2017-317134.
- Kivipelto M, Mangialasche F, Ngandu T.** Lifestyle interventions to prevent cognitive impairment, dementia and Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* **2018**;14(11):653-666. doi: 10.1038/s41582-018-0070-3.
- Kiyota T, Yamamoto M, Xiong H, Lambert MP, Klein WL, Gendelman HE, et al.** CCL2 accelerates microglia-mediated Abeta oligomer formation and progression of neurocognitive dysfunction. *PLoS One.* **2009**;4(7):e6197. doi: 10.1371/journal.pone.0006197.
- Kiyota T, Gendelman HE, Weir RA, Higgins EE, Zhang G, Jain M.** CCL2 affects β -amyloidosis and progressive neurocognitive dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* **2013**;34(4):1060-1068. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2012.08.009
- Klein SL, Flanagan KL.** Sex differences in immune responses. *Nat Rev Immunol.* **2016**;16(10):626-638. doi:10.1038/nri.2016.90
- Knight EM, Martins IV, Gümüşgöz S, Allan SM, Lawrence CB.** High-fat diet-induced memory impairment in triple-transgenic Alzheimer's disease (3xTgAD) mice is independent of changes in amyloid and tau pathology. *Neurobiol Aging.* **2014**;35(8):1821-1832. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.02.010
- Knowles RB, Wyart C, Buldyrev SV, Cruz L, Urbanc B, Hasselmo ME, et al.** Plaque-induced neurite abnormalities: implications for disruption of neural



- networks in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1999**;96(9):5274-9. doi: 10.1073/pnas.96.9.5274.
- Koffie RM, Meyer-Luehmann M, Hashimoto T, Adams KW, Mielke ML, Garcia-Alloza M, et al.** Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2009**;106(10):4012-7. doi: 10.1073/pnas.0811698106.
- Kolarova M, García-Sierra F, Bartos A, Ricny J, Ripova D.** Structure and pathology of tau protein in Alzheimer disease. *Int J Alzheimers Dis.* **2012**;2012:731526. doi: 10.1155/2012/731526.
- Konttinen H, Gureviciene I, Oksanen M, Grubman A, Loppi S, Huuskonen MT, et al.** PPAR β / δ -agonist GW0742 ameliorates dysfunction in fatty acid oxidation in PSEN1 Δ E9 astrocytes. *Glia.* **2019**;67(1):146-159. doi: 10.1002/glia.23534.
- Korin B, Ben-Shaanan TL, Schiller M, Dubovik T, Azulay-Debby H, Boshnak NT, et al.** High-dimensional, single-cell characterization of the brain's immune compartment. *Nat Neurosci.* **2017**;20(9):1300-1309. doi: 10.1038/nn.4610.
- Koronyo Y, Salumbides BC, Sheyn J, Pelissier L, Li S, Ljubimov V, et al.** Therapeutic effects of glatiramer acetate and grafted CD115⁺ monocytes in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain.* **2015**;138(Pt 8):2399-422. doi: 10.1093/brain/awv150.
- Korvatska O, Leverenz JB, Jayadev S, McMillan P, Kurtz I, Guo X, et al.** R47H Variant of TREM2 Associated With Alzheimer Disease in a Large Late-Onset Family: Clinical, Genetic, and Neuropathological Study. *JAMA Neurol.* **2015**;72(8):920-7. doi: 10.1001/jamaneurol.2015.0979.
- Kovacs GG.** Astroglia and Tau: New Perspectives. *Front Aging Neurosci.* **2020** Apr 9;12:96. doi: 10.3389/fnagi.2020.00096.
- Kraft AW, Hu X, Yoon H, Yan P, Xiao Q, Wang Y, et al.** Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP/PS1 mice. *FASEB J.* **2013**;27(1):187-98. doi: 10.1096/fj.12-208660.
- Krasemann S, Madore C, Cialic R, Baufeld C, Calcagno N, El Fatimy R, et al.** The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity.* **2017**;47(3):566-581.e9. doi: 10.1016/j.immuni.2017.08.008.
- Kristensen B.** Regulatory B and T cell responses in patients with autoimmune thyroid disease and healthy controls. *Dan Med J.* **2016**;63(2):B5177.
- Krstic D, Knuesel I.** The airbag problem—a potential culprit for bench-to-bedside translational efforts: relevance for Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* **2013**;1:62. doi: 10.1186/2051-5960-1-62.
- Kryuchkova-Mostacci N, Robinson-Rechavi M.** A benchmark of gene expression tissue-specificity metrics. *Brief Bioinform.* **2017**;18(2):205-214. doi:10.1093/bib/bbw008
- Kumar A, Tsao JW.** Alzheimer Disease. [Updated 2019 Sep 1]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499922/>
- Kunis G, Baruch K, Rosenzweig N, Kertser A, Miller O, Berkutzki T, Schwartz M.** IFN- γ -dependent activation of the brain's choroid plexus for CNS immune surveillance and repair. *Brain.*



2013;136(Pt 11):3427-40. doi: 10.1093/brain/awt259.

Kunkle BW, Grenier-Boley B, Sims R, Bis JC, Damotte V, Naj AC, et al. Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A β , tau, immunity and lipid processing. *Nat Genet.* 2019;51(3):414-430. doi: 10.1038/s41588-019-0358-2. Erratum in: *Nat Genet.* 2019 Sep;51(9):1423-1424.

Kuruva CS, Reddy PH. Amyloid beta modulators and neuroprotection in Alzheimer's disease: a critical appraisal. *Drug Discov Today.* 2017;22(2):223-233. doi: 10.1016/j.drudis.2016.10.010. Erratum in: *Drug Discov Today.* 2018 Jan 4.

Ladiwala AR, Litt J, Kane RS, Aucoin DS, Smith SO, Ranjan S, et al. Conformational differences between two amyloid β oligomers of similar size and dissimilar toxicity. *J Biol Chem.* 2012;287(29):24765-73. doi: 10.1074/jbc.M111.329763.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-685. doi:10.1038/227680a0

LaFerla FM, Green KN, Oddo S. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(7):499-509. doi: 10.1038/nrn2168.

Lambert JC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, et al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet.* 2013;45(12):1452-8. doi: 10.1038/ng.2802.

Langfelder P, Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics.* 2008;9:559. doi: 10.1186/1471-2105-9-559.

Lasagna-Reeves CA, Sengupta U, Castillo-Carranza D, Gerson JE, Guerrero-Munoz M, Troncoso JC, et al. The formation of tau pore-like structures is prevalent and cell specific: possible implications for the disease phenotypes. *Acta Neuropathol Commun.* 2014;2:56. doi: 10.1186/2051-5960-2-56.

Laurent C, Dorothée G, Hunot S, Martin E, Monnet Y, Duchamp M, et al. Hippocampal T cell infiltration promotes neuroinflammation and cognitive decline in a mouse model of tauopathy. *Brain.* 2017;140(1):184-200. doi: 10.1093/brain/aww270.

Laurent C, Buée L, Blum D. Tau and neuroinflammation: What impact for Alzheimer's Disease and Tauopathies?. *Biomed J.* 2018;41(1):21-33. doi:10.1016/j.bj.2018.01.003

Le Douce J, Maugard M, Veran J, Matos M, Jégo P, Vigneron PA, et al. Impairment of Glycolysis-Derived l-Serine Production in Astrocytes Contributes to Cognitive Deficits in Alzheimer's Disease. *Cell Metab.* 2020;31(3):503-517.e8. doi: 10.1016/j.cmet.2020.02.004.

Lee CY, Landreth GE. The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J Neural Transm (Vienna).* 2010;117(8):949-60. doi: 10.1007/s00702-010-0433-4.

Lee JH, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, et al. Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell.* 2010;141(7):1146-58. doi: 10.1016/j.cell.2010.05.008.

Lee JH, Daugherty ER, Scheiman J, Kalhor R, Yang JL, Ferrante TC, et al. Highly multiplexed subcellular RNA sequencing in situ. *Science.* 2014;343(6177):1360-3. doi: 10.1126/science.1250212.



- Lee WJ, Liao YC, Wang YF, Lin IF, Wang SJ, Fuh JL.** Plasma MCP-1 and Cognitive Decline in Patients with Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment: A Two-year Follow-up Study. *Sci Rep.* **2018**;8(1):1280. doi: 10.1038/s41598-018-19807-y.
- Lee HE, Lim D, Lee JY, Lim SM, Pae AN.** Recent tau-targeted clinical strategies for the treatment of Alzheimer's disease. *Future Med Chem.* **2019**;11(15):1845–1848. doi:10.4155/fmc-2019-0151
- Lendahl U, Nilsson P, Betsholtz C.** Emerging links between cerebrovascular and neurodegenerative diseases—a special role for pericytes. *EMBO Rep.* **2019**;20(11):e48070. doi:10.15252/embr.201948070
- Leuba G, Kraftsik R, Saini K.** Quantitative distribution of parvalbumin, calretinin, and calbindin D-28k immunoreactive neurons in the visual cortex of normal and Alzheimer cases. *Exp Neurol.* **1998**;152(2):278-291. doi:10.1006/exnr.1998.6838
- Levenga J, Krishnamurthy P, Rajamohamedsait H, Wong H, Franke TF, Cain P, et al.** Tau pathology induces loss of GABAergic interneurons leading to altered synaptic plasticity and behavioral impairments. *Acta Neuropathol Commun.* **2013**;1:34. doi: 10.1186/2051-5960-1-34.
- Leyns CEG, Holtzman DM.** Glial contributions to neurodegeneration in tauopathies. *Mol Neurodegener.* **2017**;12(1):50. doi: 10.1186/s13024-017-0192-x.
- Leyns CEG, Ulrich JD, Finn MB, Stewart FR, Koscal LJ, Remolina Serrano J, et al.** TREM2 deficiency attenuates neuroinflammation and protects against neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2017**;114(43):11524-11529. doi: 10.1073/pnas.1710311114.
- Li C, Götz J.** Tau-based therapies in neurodegeneration: opportunities and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* **2017**;16(12):863–883. doi:10.1038/nrd.2017.155
- Li Q, Barres BA.** Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol.* **2018**;18(4):225–242. doi:10.1038/nri.2017.125
- Li Q, Cheng Z, Zhou L, Darmanis S, Neff NF, Okamoto J, et al.** Developmental Heterogeneity of Microglia and Brain Myeloid Cells Revealed by Deep Single-Cell RNA Sequencing. *Neuron.* **2019a**;101(2):207-223.e10. doi: 10.1016/j.neuron.2018.12.006.
- Li K, Li J, Zheng J, Qin S.** Reactive Astrocytes in Neurodegenerative Diseases. *Aging Dis.* **2019b**;10(3):664-675. doi: 10.14336/AD.2018.0720.
- Lian H, Yang L, Cole A, Sun L, Chiang AC, Fowler SW, et al.** NFκB-activated astroglial release of complement C3 compromises neuronal morphology and function associated with Alzheimer's disease. *Neuron.* **2015**;85(1):101-115. doi: 10.1016/j.neuron.2014.11.018.
- Lian H, Litvinchuk A, Chiang AC, Aithmitti N, Jankowsky JL, Zheng H.** Astrocyte-Microglia Cross Talk through Complement Activation Modulates Amyloid Pathology in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *J Neurosci.* **2016**;36(2):577-89. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2117-15.2016.
- Liang WS, Reiman EM, Valla J, Dunckley T, Beach TG, Grover A, et al.** Alzheimer's disease is associated with reduced expression of energy metabolism genes in posterior cingulate neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2008**;105(11):4441-6. doi: 10.1073/pnas.0709259105.
- Liao Y, Goraya MU, Yuan X, Zhang B, Chiu SH, Chen JL.** Functional Involvement of Interferon-Inducible



- Transmembrane Proteins in Antiviral Immunity. *Front Microbiol.* **2019**;10:1097. doi: 10.3389/fmicb.2019.01097.
- Liddel SA, Barres BA.** Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity.* **2017**;46(6):957–967. doi:10.1016/j.immuni.2017.06.006
- Liddel SA, Guttenplan KA, Clarke LE, Bennett FC, Bohlen CJ, Schirmer L, et al.** Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature.* **2017**;541(7638):481-487. doi: 10.1038/nature21029.
- Lin JR, Fallahi-Sichani M, Sorger PK.** Highly multiplexed imaging of single cells using a high-throughput cyclic immunofluorescence method. *Nat Commun.* **2015**;6:8390. doi: 10.1038/ncomms9390.
- Lin JR, Fallahi-Sichani M, Chen JY, Sorger PK.** Cyclic Immunofluorescence (CycIF), A Highly Multiplexed Method for Single-cell Imaging. *Curr Protoc Chem Biol.* **2016**;8(4):251-264. doi: 10.1002/cpch.14.
- Lin JR, Izar B, Wang S, Yapp C, Mei S, Shah PM, et al.** Highly multiplexed immunofluorescence imaging of human tissues and tumors using t-CyCIF and conventional optical microscopes. *Elife.* **2018**;7:e31657. doi: 10.7554/eLife.31657.
- Linetti A, Fratangeli A, Taverna E, Valnegri P, Francolini M, Cappello V, et al.** Cholesterol reduction impairs exocytosis of synaptic vesicles. *J Cell Sci.* **2010**;123(Pt 4):595-605. doi: 10.1242/jcs.060681.
- Litvinchuk A, Wan YW, Swartzlander DB, Chen F, Cole A, Propson NE, et al.** Complement C3aR Inactivation Attenuates Tau Pathology and Reverses an Immune Network Deregulated in Tauopathy Models and Alzheimer's Disease. *Neuron.* **2018**;100(6):1337-1353.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2018.10.031.
- Liu Q, Trotter J, Zhang J, Peters MM, Cheng H, Bao J, et al.** Neuronal LRP1 knockout in adult mice leads to impaired brain lipid metabolism and progressive, age-dependent synapse loss and neurodegeneration. *J Neurosci.* **2010**;30(50):17068-78. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4067-10.2010.
- Liu C, Götz J.** How it all started: tau and protein phosphatase 2A. *J Alzheimers Dis.* **2013**;37(3):483-94. doi: 10.3233/JAD-130503.
- Liu C, Cui G, Zhu M, Kang X, Guo H.** Neuroinflammation in Alzheimer's disease: chemokines produced by astrocytes and chemokine receptors. *Int J Clin Exp Pathol.* **2014**;7(12):8342-55.
- Liu B, Teschemacher AG, Kasparov S.** Neuroprotective potential of astroglia. *J Neurosci Res.* **2017a**;95(11):2126-2139. doi:10.1002/jnr.24140
- Liu CC, Zhao N, Fu Y, Wang N, Linares C, Tsai CW, Bu G.** ApoE4 Accelerates Early Seeding of Amyloid Pathology. *Neuron.* **2017b**;96(5):1024-1032.e3. doi: 10.1016/j.neuron.2017.11.013.
- Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* **2001**;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Llufrio EM, Wang L, Naser FJ, Patti GJ.** Sorting cells alters their redox state and cellular metabolome. *Redox Biol.* **2018**;16:381-387. doi:10.1016/j.redox.2018.03.004
- Long JM, Holtzman DM.** Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell.* **2019**;179(2):312-339. doi: 10.1016/j.cell.2019.09.001.



- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **1951**;193(1):265–275.
- Ludewig P, Gallizioli M, Urrea X, Behr S, Brait VH, Gelderblom M, et al.** Dendritic cells in brain diseases. *Biochim Biophys Acta.* **2016**;1862(3):352-67. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.11.003.
- Lueg G, Gross CC, Lohmann H, Johnen A, Kemmling A, Deppe M, et al.** Clinical relevance of specific T-cell activation in the blood and cerebrospinal fluid of patients with mild Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* **2015**;36(1):81-9. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.08.008.
- Lund H, Pieber M, Parsa R, Han J, Grommisch D, Ewing E, et al.** Competitive repopulation of an empty microglial niche yields functionally distinct subsets of microglia-like cells. *Nat Commun.* **2018**;9(1):4845. doi: 10.1038/s41467-018-07295-7.
- Luo W, Liu W, Hu X, Hanna M, Caravaca A, Paul SM.** Microglial internalization and degradation of pathological tau is enhanced by an anti-tau monoclonal antibody. *Sci Rep.* **2015**;5:11161. doi: 10.1038/srep11161.
- MacLeod R, Hillert EK, Cameron RT, Baillie GS.** The role and therapeutic targeting of α -, β - and γ -secretase in Alzheimer's disease. *Future Sci OA.* **2015**;1(3):FSO11. doi: 10.4155/fso.15.9.
- Maier M, Peng Y, Jiang L, Seabrook TJ, Carroll MC, Lemere CA.** Complement C3 deficiency leads to accelerated amyloid beta plaque deposition and neurodegeneration and modulation of the microglia/macrophage phenotype in amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci.* **2008**;28(25):6333-6341. doi:10.1523/JNEUROSCI.0829-08.2008
- Makin S.** The amyloid hypothesis on trial. *Nature.* **2018**;559(7715):S4-S7. doi: 10.1038/d41586-018-05719-4.
- Male D, Brostoff J, Roth D, Roitt I.** Celulas, tejidos y órganos del sistema inmunitario. 8ª ed. Barcelona: Elsevier; **2014.**
- Malm TM, Koistinaho M, Pärepallo M, Vatanen T, Ooka A, Karlsson S, Koistinaho J.** Bone-marrow-derived cells contribute to the recruitment of microglial cells in response to beta-amyloid deposition in APP/PS1 double transgenic Alzheimer mice. *Neurobiol Dis.* **2005**;18(1):134-42. doi: 10.1016/j.nbd.2004.09.009.
- Mandrekar S, Jiang Q, Lee CY, Koenigsknecht-Talboo J, Holtzman DM, Landreth GE.** Microglia mediate the clearance of soluble A β through fluid phase macropinocytosis. *J Neurosci.* **2009**;29(13):4252-62. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5572-08.2009.
- Manocha GD, Floden AM, Rausch K, Kulas JA, McGregor BA, Rojanathammanee L, et al.** APP Regulates Microglial Phenotype in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *J Neurosci.* **2016**;36(32):8471-86. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4654-15.2016.
- Maphis N, Xu G, Kokiko-Cochran ON, Jiang S, Cardona A, Ransohoff RM, et al.** Reactive microglia drive tau pathology and contribute to the spreading of pathological tau in the brain. *Brain.* **2015**;138(Pt 6):1738-55. doi: 10.1093/brain/awv081.
- March-Diaz R, Lara-Ureña N, Romero-Molina C, Heras-Garvin A, Ortega-de San Luis C, Alvarez-Vergara M.I. et al.** Hypoxia compromises the mitochondrial metabolism of Alzheimer's disease microglia via HIF1. Remitido a publicación.



- Marcus C, Mena E, Subramaniam RM.** Brain PET in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Clin Nucl Med.* **2014**;39(10):e413-e426. doi:10.1097/RLU.0000000000000547
- Marsh SE, Abud EM, Lakatos A, Karimzadeh A, Yeung ST, Davtayan H, et al.** The adaptive immune system restrains Alzheimer's disease pathogenesis by modulating microglial function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2016**;113(9):E1316-25. doi:10.1073/pnas.1525466113.
- Marshak DR, Pesce SA, Stanley LC, Griffin WS.** Increased S100 beta neurotrophic activity in Alzheimer's disease temporal lobe. *Neurobiol Aging.* **1992**;13(1):1-7. doi:10.1016/0197-4580(92)90002-f
- Martin E, Delarasse C.** Complex role of chemokine mediators in animal models of Alzheimer's Disease. *Biomed J.* **2018**;41(1):34-40. doi:10.1016/j.bj.2018.01.002
- Martins IC, Kuperstein I, Wilkinson H, Maes E, Vanbrabant M, Jonckheere W, et al.** Lipids revert inert Abeta amyloid fibrils to neurotoxic protofibrils that affect learning in mice. *EMBO J.* **2008**;27(1):224-33. doi:10.1038/sj.emboj.7601953.
- Masgrau R, Guaza C, Ransohoff RM, Galea E.** Should We Stop Saying 'Glia' and 'Neuroinflammation'? *Trends Mol Med.* **2017**;23(6):486-500. doi:10.1016/j.molmed.2017.04.005
- Masliah E, Mallory M, Hansen L, Alford M, Albright T, Terry R, et al.** Immunoreactivity of CD45, a protein phosphotyrosine phosphatase, in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **1991a**;83(1):12-20. doi:10.1007/BF00294425.
- Masliah E, Mallory M, Hansen L, Alford M, Albright T, DeTeresa R, et al.** Patterns of aberrant sprouting in Alzheimer's disease. *Neuron.* **1991b**;6(5):729-39. doi: 10.1016/0896-6273(91)90170-5.
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K.** Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1985**;82(12):4245-9. doi:10.1073/pnas.82.12.4245.
- Masuda T, Sankowski R, Staszewski O, Prinz M.** Microglia Heterogeneity in the Single-Cell Era. *Cell Rep.* **2020**;30(5):1271-1281. doi:10.1016/j.celrep.2020.01.010
- Mathur R, Ince PG, Minett T, Garwood CJ, Shaw PJ, Matthews FE, et al.** A reduced astrocyte response to β -amyloid plaques in the ageing brain associates with cognitive impairment. *PLoS One.* **2015**;10(2):e0118463. doi:10.1371/journal.pone.0118463.
- Mathys H, Adaikkan C, Gao F, Young JZ, Manet E, Hemberg M, et al.** Temporal Tracking of Microglia Activation in Neurodegeneration at Single-Cell Resolution. *Cell Rep.* **2017**;21(2):366-380. doi:10.1016/j.celrep.2017.09.039.
- Mathys H, Davila-Velderrain J, Peng Z, Gao F, Mohammadi S, Young JZ, et al.** Single-cell transcriptomic analysis of Alzheimer's disease. *Nature.* **2019**;570(7761):332-337. doi:10.1038/s41586-019-1195-2. Erratum in: *Nature.* 2019 Jun 17.
- Matias I, Morgado J, Gomes FCA.** Astrocyte Heterogeneity: Impact to Brain Aging and Disease. *Front Aging Neurosci.* **2019**;11:59. doi:10.3389/fnagi.2019.00059.
- Matsuoka Y, Picciano M, Malester B, LaFrancois J, Zehr C, Daeschner JM, et al.** Inflammatory responses to amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* **2001**;158(4):1345-54. doi:10.1016/S0002-9440(10)64085-0. P



- Matsuzaki T, Sasaki K, Hata J, Hirakawa Y, Fujimi K, Ninomiya T, et al.** Association of Alzheimer disease pathology with abnormal lipid metabolism: the Hisayama Study. *Neurology*. **2011**;77(11):1068-75. doi: 10.1212/WNL.0b013e31822e145d.
- McAvoy K, Kawamata H.** Glial mitochondrial function and dysfunction in health and neurodegeneration. *Mol Cell Neurosci*. **2019**;101:103417. doi:10.1016/j.mcn.2019.103417
- McGeer PL, Akiyama H, Itagaki S, McGeer EG.** Activation of the classical complement pathway in brain tissue of Alzheimer patients. *Neurosci Lett*. **1989**;107(1-3):341-346. doi:10.1016/0304-3940(89)90843-4
- McGuinness B, Craig D, Bullock R, Passmore P.** Statins for the prevention of dementia. *Cochrane Database Syst Rev*. **2016**;(1):CD003160. doi: 10.1002/14651858.CD003160.pub3.
- McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR Jr, Kawas CH, et al.** The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. **2011**;7(3):263-9. doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.005.
- McManus RM, Higgins SC, Mills KH, Lynch MA.** Respiratory infection promotes T cell infiltration and amyloid- β deposition in APP/PS1 mice. *Neurobiol Aging*. **2014**;35(1):109-121. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.07.025
- McManus RM, Mills KH, Lynch MA.** T Cells-Protective or Pathogenic in Alzheimer's Disease?. *J Neuroimmune Pharmacol*. **2015**;10(4):547-560. doi:10.1007/s11481-015-9612-2
- McManus RM, Heneka MT.** Role of neuroinflammation in neurodegeneration: new insights. *Alzheimers Res Ther*. **2017**;9(1):14. doi: 10.1186/s13195-017-0241-2.
- McNamara MJ, Gomez-Isla T, Hyman BT.** Apolipoprotein E genotype and deposits of Abeta40 and Abeta42 in Alzheimer disease. *Arch Neurol*. **1998**;55(7):1001-1004. doi:10.1001/archneur.55.7.1001
- McShea A, Harris PL, Webster KR, Wahl AF, Smith MA.** Abnormal expression of the cell cycle regulators P16 and CDK4 in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. **1997**;150(6):1933-1939.
- Medeiros R, LaFerla FM.** Astrocytes: conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Exp Neurol*. **2013**;239:133-138. doi:10.1016/j.expneurol.2012.10.007
- Medina M.** An Overview on the Clinical Development of Tau-Based Therapeutics. *Int J Mol Sci*. **2018**;19(4):1160. doi: 10.3390/ijms19041160.
- Melo HM, Seixas da Silva GDS, Sant'Ana MR, Teixeira CVL, Clarke JR, Miya Coreixas VS, et al.** Palmitate Is Increased in the Cerebrospinal Fluid of Humans with Obesity and Induces Memory Impairment in Mice via Pro-inflammatory TNF- α . *Cell Rep*. **2020**;30(7):2180-2194.e8. doi: 10.1016/j.celrep.2020.01.072.
- Mendis LH, Grey AC, Faull RL, Curtis MA.** Hippocampal lipid differences in Alzheimer's disease: a human brain study using matrix-assisted laser desorption/ionization-imaging mass spectrometry. *Brain Behav*. **2016**;6(10):e00517. doi: 10.1002/brb3.517.
- Merlini M, Meyer EP, Ulmann-Schuler A, Nitsch RM.** Vascular β -amyloid and early astrocyte alterations impair cerebrovascular function and cerebral metabolism in transgenic arcA β mice. *Acta Neuropathol*. **2011**;122(3):293-311. doi:10.1007/s00401-011-0834-y



- Merlini M, Kirabali T, Kulic L, Nitsch RM, Ferretti MT.** Extravascular CD3+ T Cells in Brains of Alzheimer Disease Patients Correlate with Tau but Not with Amyloid Pathology: An Immunohistochemical Study. *Neurodegener Dis.* **2018**;18(1):49–56. doi:10.1159/000486200
- Meyer-Luehmann M, Spire-Jones TL, Prada C, Garcia-Alloza M, de Calignon A, Rozkalne A, et al.** Rapid appearance and local toxicity of amyloid-beta plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature.* **2008**;451(7179):720–4. doi:10.1038/nature06616.
- Michaud JP, Bellavance MA, Préfontaine P, Rivest S.** Real-time in vivo imaging reveals the ability of monocytes to clear vascular amyloid beta. *Cell Rep.* **2013**;5(3):646–653. doi:10.1016/j.celrep.2013.10.010
- Mikkonen M, Alafuzoff I, Tapiola T, Soininen H, Miettinen R.** Subfield- and layer-specific changes in parvalbumin, calretinin and calbindin-D28K immunoreactivity in the entorhinal cortex in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* **1999**;92(2):515–532. doi:10.1016/s0306-4522(99)00047-0
- Mildner A, Schlevogt B, Kierdorf K, Böttcher C, Erny D, Kummer MP, et al.** Distinct and non-redundant roles of microglia and myeloid subsets in mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* **2011**;31(31):11159–71. doi:10.1523/JNEUROSCI.6209-10.2011.
- Miners JS, Palmer JC, Tayler H, Palmer LE, Ashby E, Kehoe PG, Love S.** A β degradation or cerebral perfusion? Divergent effects of multifunctional enzymes. *Front Aging Neurosci.* **2014**;6:238. doi:10.3389/fnagi.2014.00238.
- Miners JS, Schulz I, Love S.** Differing associations between A β accumulation, hypoperfusion, blood-brain barrier dysfunction and loss of PDGFRB pericyte marker in the precuneus and parietal white matter in Alzheimer's disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* **2018**;38(1):103–115. doi:10.1177/0271678X17690761
- Minter MR, Taylor JM, Crack PJ.** The contribution of neuroinflammation to amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* **2016**;136(3):457–474. doi:10.1111/jnc.13411
- Mishra A, Reynolds JP, Chen Y, Gourine AV, Rusakov DA, Attwell D.** Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles. *Nat Neurosci.* **2016**;19(12):1619–1627. doi:10.1038/nn.4428. Erratum in: *Nat Neurosci.* 2017 Jul 26;20(8):1189. Erratum in: *Nat Neurosci.* 2020 Sep;23(9):1176.
- Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R.** Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol.* **2001**;101(3):249–255. doi:10.1007/s004010000284
- Mizutani M, Pino PA, Saederup N, Charo IF, Ransohoff RM, Cardona AE.** The fractalkine receptor but not CCR2 is present on microglia from embryonic development throughout adulthood. *J Immunol.* **2012**;188(1):29–36. doi:10.4049/jimmunol.1100421
- Mohamed A, Viveiros A, Williams K, Posse de Chaves E.** A β inhibits SREBP-2 activation through Akt inhibition. *J Lipid Res.* **2018**;59(1):1–13. doi:10.1194/jlr.M076703
- Montserrat-Sanz J, Gómez-Lahoz AM, Sosa-Reina MD, Prieto-Martin A.** Introducción al sistema inmune. Componentes celulares del sistema inmune innato. *Medicine.* **2017a**;12(24):1369–1378.



- Montserrat-Sanz J, Gómez-Lahoz AM, Paule-Peral L, Prieto-Martín A.** Componentes celulares y organización tisular del sistema inmune adaptativo. *Medicine*. **2017b**;12(24):1379-87.
- Montine TJ, Phelps CH, Beach TG, Bigio EH, Cairns NJ, Dickson DW, et al.** National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: a practical approach. *Acta Neuropathol*. **2012**;123(1):1-11. doi: 10.1007/s00401-011-0910-3.
- Moore S, Evans LD, Andersson T, Portelius E, Smith J, Dias TB, et al.** APP metabolism regulates tau proteostasis in human cerebral cortex neurons. *Cell Rep*. **2015**;11(5):689-96. doi: 10.1016/j.celrep.2015.03.068.
- Morales I, Guzmán-Martínez L, Cerda-Troncoso C, Farias GA, Maccioni RB.** Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Front Cell Neurosci*. **2014**;8:112. doi: 10.3389/fncel.2014.00112.
- Moreno-Gonzalez I, Baglietto-Vargas D, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, et al.** Extracellular amyloid-beta and cytotoxic glial activation induce significant entorhinal neuron loss in young PS1(M146L)/APP(751SL) mice. *J Alzheimers Dis*. **2009**;18(4):755-76. doi: 10.3233/JAD-2009-1192.
- Morley JE, Farr SA, Banks WA, Johnson SN, Yamada KA, Xu L.** A physiological role for amyloid-beta protein: enhancement of learning and memory. *J Alzheimers Dis*. **2010**;19(2):441-9. doi: 10.3233/JAD-2009-1230.
- Mosconi L, Tsui WH, Herholz K, Pupi A, Drzezga A, Lucignani G, et al.** Multicenter standardized 18F-FDG PET diagnosis of mild cognitive impairment, Alzheimer's disease, and other dementias. *J Nucl Med*. **2008**;49(3):390-8. doi: 10.2967/jnumed.107.045385.
- Mosconi L.** Glucose metabolism in normal aging and Alzheimer's disease: Methodological and physiological considerations for PET studies. *Clin Transl Imaging*. **2013**;1(4):10.1007/s40336-013-0026-y. doi:10.1007/s40336-013-0026-y
- Mrdjen D, Pavlovic A, Hartmann FJ, Schreiner B, Utz SG, Leung BP, et al.** High-Dimensional Single-Cell Mapping of Central Nervous System Immune Cells Reveals Distinct Myeloid Subsets in Health, Aging, and Disease. *Immunity*. **2018**;48(2):380-395.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2018.01.011. Erratum in: *Immunity*. 2018 Mar 20;48(3):599.
- Mueller-Steiner S, Zhou Y, Arai H, Roberson ED, Sun B, Chen J, et al.** Anti-amyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease. *Neuron*. **2006**;51(6):703-14. doi: 10.1016/j.neuron.2006.07.027.
- Mullard A.** Anti-amyloid failures stack up as Alzheimer antibody flops. *Nat Rev Drug Discov*. **2019**. doi: 10.1038/d41573-019-00064-1.
- Müller S, Kohanbash G, Liu SJ, Alvarado B, Carrera D, Bhaduri A, et al.** Single-cell profiling of human gliomas reveals macrophage ontogeny as a basis for regional differences in macrophage activation in the tumor microenvironment. *Genome Biol*. **2017a**;18(1):234. doi: 10.1186/s13059-017-1362-4.
- Müller UC, Deller T, Korte M.** Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nat Rev Neurosci*. **2017b**;18(5):281-298. doi: 10.1038/nrn.2017.29.
- Muñoz-Castro C, Romero-Molina C, Vitorica J.** Redirigiendo las estrategias terapéuticas en la Enfermedad de



Alzheimer. *Rev Esp Cien Farm.* **2020**;1(1):18-33.

Muraleedharan R, Gawali MV, Tiwari D, Sukumaran A, Oatman N, Anderson J, et al. AMPK-Regulated Astrocytic Lactate Shuttle Plays a Non-Cell-Autonomous Role in Neuronal Survival. *Cell Rep.* **2020**;32(9):108092. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108092.

Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* **2011**;11(11):723-737. doi:10.1038/nri3073

Musiek ES, Holtzman DM. Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and 'wingmen'. *Nat Neurosci.* **2015**;18(6):800-6. doi: 10.1038/nn.4018.

Mutations. Alzforum. Disponible en: <https://www.alzforum.org/mutations> [Noviembre 5, 2020]

Naert G, Rivest S. CC chemokine receptor 2 deficiency aggravates cognitive impairments and amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* **2011**;31(16):6208-6220. doi:10.1523/JNEUROSCI.0299-11.2011

Nagele RG, D'Andrea MR, Lee H, Venkataraman V, Wang HY. Astrocytes accumulate A beta 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain Res.* **2003**;971(2):197-209. doi:10.1016/s0006-8993(03)02361-8

Najafi AR, Crapser J, Jiang S, Ng W, Mortazavi A, West BL, Green KN. A limited capacity for microglial repopulation in the adult brain. *Glia.* **2018**;66(11):2385-2396. doi: 10.1002/glia.23477.

Navarro V. Caracterización de la respuesta inflamatoria en tejido cerebral postmortem de pacientes de Alzheimer [Tesis Doctoral]. Sevilla: Universidad de Sevilla; **2015**.

Navarro V, Sanchez-Mejias E, Jimenez S, Muñoz-Castro C, Sanchez-Varo R, Davila JC, et al. Microglia in Alzheimer's Disease: Activated, Dysfunctional or Degenerative. *Front Aging Neurosci.* **2018**;10:140. doi: 10.3389/fnagi.2018.00140.

Nayak D, Zinselmeyer BH, Corps KN, McGavern DB. In vivo dynamics of innate immune sentinels in the CNS. *Intravital.* **2012**;1(2):95-106. doi:10.4161/intv.22823

Nebel RA, Aggarwal NT, Barnes LL, Gallagher A, Goldstein JM, Kantarci K, et al. Understanding the impact of sex and gender in Alzheimer's disease: A call to action. *Alzheimers Dement.* **2018**;14(9):1171-1183. doi: 10.1016/j.jalz.2018.04.008.

Nedergaard M. Neuroscience. Garbage truck of the brain. *Science.* **2013**;340(6140):1529-30. doi: 10.1126/science.1240514.

Nehlig A, Wittendorp-Rechenmann E, Lam CD. Selective uptake of [¹⁴C]2-deoxyglucose by neurons and astrocytes: high-resolution microautoradiographic imaging by cellular ¹⁴C-trajectory combined with immunohistochemistry. *J Cereb Blood Flow Metab.* **2004**;24(9):1004-1014. doi:10.1097/01.WCB.0000128533.84196.D8

Nguyen KV. The human β -amyloid precursor protein: biomolecular and epigenetic aspects. *Biomol Concepts.* **2015**;6(1):11-32. doi: 10.1515/bmc-2014-0041.

Nguyen AT, Wang K, Hu G, Wang X, Miao Z, Azevedo JA, et al. APOE and TREM2 regulate amyloid-responsive microglia in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **2020**;140(4):477-493. doi: 10.1007/s00401-020-02200-3.

Ní Chasaide C, Lynch MA. The role of the immune system in driving



- neuroinflammation. *Brain Neurosci Adv.* **2020**;4:2398212819901082. doi:10.1177/2398212819901082
- Niederhorn JY.** See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege. *Nat Immunol.* **2006**;7(4):354–359. doi:10.1038/ni1328
- Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary DD, Tessier-Lavigne M.** APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature.* **2009**;457(7232):981-9. doi: 10.1038/nature07767.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F.** Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science.* **2005**;308(5726):1314–1318. doi:10.1126/science.1110647
- Nissen SK, Ferreira SA, Nielsen MC, Schulte C, Shrivastava K, Hennig D, et al.** Changes in soluble CD163 indicate monocyte involvement in cognitive deficits in Parkinson's disease. *medRxiv.* **2020**.05.02.20088500; doi: https://doi.org/10.1101/2020.05.02.20088500
- Nixon RA, Yang DS.** Autophagy failure in Alzheimer's disease-locating the primary defect. *Neurobiol Dis.* **2011**;43(1):38-45. doi: 10.1016/j.nbd.2011.01.021.
- Noble JE, Bailey MJ.** Quantitation of protein. *Methods Enzymol.* **2009**;463:73–95. doi:10.1016/S0076-6879(09)63008-1
- O'Connell GC, Tennant CS, Lucke-Wold N, Kabbani Y, Tarabishy AR, Chantler PD, Barr TL.** Monocyte-lymphocyte cross-communication via soluble CD163 directly links innate immune system activation and adaptive immune system suppression following ischemic stroke. *Sci Rep.* **2017**;7(1):12940. doi: 10.1038/s41598-017-13291-6.
- Oertelt-Prigione S.** The influence of sex and gender on the immune response. *Autoimmun Rev.* **2012**;11(6-7):A479-A485. doi:10.1016/j.autrev.2011.11.022
- Oksanen M, Petersen AJ, Naumenko N, Puttonen K, Lehtonen Š, Gubert Olivé M, et al.** A transcriptomic atlas of aged human microglia. *Nat Commun.* **2018**;9(1):539. doi: 10.1038/s41467-018-02926-5.
- Olsson B, Lautner R, Andreasson U, Öhrfelt A, Portelius E, Bjerke M, et al.** CSF and blood biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* **2016**;15(7):673-684. doi: 10.1016/S1474-4422(16)00070-3.
- OMS, 2016.** Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- OMS, 2020.** Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- Opperman KS, Vandyke K, Clark KC, Coulter EA, Hewett DR, Mrozik KM, et al.** Clodronate-Liposome Mediated Macrophage Depletion Abrogates Multiple Myeloma Tumor Establishment In Vivo. *Neoplasia.* **2019**;21(8):777-787. doi: 10.1016/j.neo.2019.05.006.
- Osborn LM, Kamphuis W, Wadman WJ, Hol EM.** Astroglia: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.* **2016**;144:121-141. doi:10.1016/j.pneurobio.2016.01.001
- Ota Y, Zanetti AT, Hallock RM.** The role of astrocytes in the regulation of synaptic plasticity and memory formation. *Neural Plast.* **2013**;2013:185463. doi:10.1155/2013/185463
- Ott BR, Jones RN, Daiello LA, de la Monte SM, Stopa EG, Johanson CE, et al.** Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Gradients in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: Relationship to Inflammatory Cytokines and Chemokines.



Front Aging Neurosci. **2018**;10:245. doi: 10.3389/fnagi.2018.00245.

Overgaard NH, Jung JW, Steptoe RJ, Wells JW. CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage?. *J Leukoc Biol.* **2015**;97(1):31–38. doi:10.1189/jlb.1RU0814-382

Overk CR, Masliah E. Pathogenesis of synaptic degeneration in Alzheimer's disease and Lewy body disease. *Biochem Pharmacol.* **2014**;88(4):508-16. doi: 10.1016/j.bcp.2014.01.015.

Pacheco-Quinto J, Eckman EA. Endothelin-converting enzymes degrade intracellular β -amyloid produced within the endosomal/lysosomal pathway and autophagosomes. *J Biol Chem.* **2013**;288(8):5606-15. doi: 10.1074/jbc.M112.422964.

Palop JJ, Mucke L. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci.* **2010**;13(7):812-8. doi: 10.1038/nn.2583.

Palop JJ, Mucke L. Network abnormalities and interneuron dysfunction in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci.* **2016**;17(12):777-792. doi:10.1038/nrn.2016.141

Pappolla MA, Bryant-Thomas TK, Herbert D, Pacheco J, Fabra Garcia M, Manjon M, et al. Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. *Neurology.* **2003**;61(2):199-205. doi: 10.1212/01.wnl.0000070182.02537.84.

Park L, Uekawa K, Garcia-Bonilla L, Koizumi K, Murphy M, Pistik R, et al. Brain Perivascular Macrophages Initiate the Neurovascular Dysfunction of Alzheimer A β Peptides. *Circ Res.* **2017**;121(3):258-269. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311054.

Parpura-Gill A, Beitz D, Uemura E. The inhibitory effects of beta-amyloid on

glutamate and glucose uptakes by cultured astrocytes. *Brain Res.* **1997**;754(1-2):65-71. doi:10.1016/s0006-8993(97)00043-7

Patir A, Shih B, McColl BW, Freeman TC. A core transcriptional signature of human microglia: Derivation and utility in describing region-dependent alterations associated with Alzheimer's disease. *Glia.* **2019**;67(7):1240–1253. doi:10.1002/glia.23572

Pérez E, Barrachina M, Rodríguez A, Torrejón-Escribano B, Boada M, et al. Aquaporin expression in the cerebral cortex is increased at early stages of Alzheimer disease. *Brain Res.* **2007**;1128(1):164-74. doi: 10.1016/j.brainres.2006.09.109

Perez-Nievas BG, Stein TD, Tai HC, Dols-Icardo O, Scotton TC, Barroeta-Espar I, et al. Dissecting phenotypic traits linked to human resilience to Alzheimer's pathology. *Brain.* **2013**;136(Pt 8):2510-26. doi: 10.1093/brain/awt171.

Perez-Nievas BG, Serrano-Pozo A. Deciphering the Astrocyte Reaction in Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci.* **2018**;10:114. doi: 10.3389/fnagi.2018.00114.

Perez Pimiento, Antonio. Fundamentos de alergia e inmunología clínica. 1. Madrid, España, McGraw-Hill, **2019**. INGEBOOK. 2020-03-25 13:47:53.0

Perl DP. Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med.* **2010**;77(1):32–42. doi:10.1002/msj.20157

Pertusa M, García-Matas S, Rodríguez-Farré E, Sanfeliu C, Cristòfol R. Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity. *J Neurochem.* **2007**;101(3):794-805. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.04369.x

Peskind ER, Griffin WS, Akama KT, Raskind MA, Van Eldik LJ. Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's



- disease. *Neurochem Int.* **2001**;39(5-6):409-413. doi:10.1016/s0197-0186(01)00048-1
- Peterson SL, Nguyen HX, Mendez OA, Anderson AJ.** Complement Protein C3 Suppresses Axon Growth and Promotes Neuron Loss. *Sci Rep.* **2017**;7(1):12904. doi: 10.1038/s41598-017-11410-x.
- Petzold A, Jenkins R, Watt HC, Green AJ, Thompson EJ, Keir G, et al.** Cerebrospinal fluid S100B correlates with brain atrophy in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* **2003**;336(3):167-70. doi: 10.1016/s0304-3940(02)01257-0.
- Pey P, Pearce RK, Kalaitzakis ME, Griffin WS, Gentleman SM.** Phenotypic profile of alternative activation marker CD163 is different in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun.* **2014**;2:21. doi: 10.1186/2051-5960-2-21.
- Pfriegeer FW, Barres BA.** Synaptic efficacy enhanced by glial cells in vitro. *Science.* **1997**;277(5332):1684-1687. doi:10.1126/science.277.5332.1684
- Pietronigro E, Zenaro E, Bianca VD, Dusi S, Terrabuio E, Iannoto G, et al.** Blockade of $\alpha 4$ integrins reduces leukocyte-endothelial interactions in cerebral vessels and improves memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *Sci Rep.* **2019**;9(1):12055. doi: 10.1038/s41598-019-48538-x.
- Pimenova AA, Raj T, Goate AM.** Untangling Genetic Risk for Alzheimer's Disease. *Biol Psychiatry.* **2018**;83(4):300-310. doi:10.1016/j.biopsych.2017.05.014
- Plemel JR, Stratton JA, Michaels NJ, Rawji KS, Zhang E, Sinha S, et al.** Microglia response following acute demyelination is heterogeneous and limits infiltrating macrophage dispersion. *Sci Adv.* **2020**;6(3):eaay6324. doi: 10.1126/sciadv.aay6324.
- Polvikoski T, Sulkava R, Haltia M, Kainulainen K, Vuorio A, Verkkoniemi A, et al.** Apolipoprotein E, dementia, and cortical deposition of beta-amyloid protein. *N Engl J Med.* **1995**;333(19):1242-7. doi: 10.1056/NEJM199511093331902.
- Polyzos AA, Lee DY, Datta R, Hauser M, Budworth H, Holt A, et al.** Metabolic Reprogramming in Astrocytes Distinguishes Region-Specific Neuronal Susceptibility in Huntington Mice. *Cell Metab.* **2019**;29(6):1258-1273.e11. doi: 10.1016/j.cmet.2019.03.004.
- Preece P, Cairns NJ.** Quantifying mRNA in postmortem human brain: influence of gender, age at death, postmortem interval, brain pH, agonal state and inter-lobe mRNA variance. *Brain Res Mol Brain Res.* **2003**;118(1-2):60-71. doi:10.1016/s0169-328x(03)00337-1
- Presumey J, Bialas AR, Carroll MC.** Complement System in Neural Synapse Elimination in Development and Disease. *Adv Immunol.* **2017**;135:53-79. doi:10.1016/bs.ai.2017.06.004
- Price JL, Ko AI, Wade MJ, Tsou SK, McKeel DW, Morris JC.** Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease. *Arch Neurol.* **2001**;58(9):1395-402. doi: 10.1001/archneur.58.9.1395.
- Prince M, Bryce R, Albanese E, Wimo A, Ribeiro W, Ferri CP.** The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement.* **2013**;9(1):63-75.e2. doi: 10.1016/j.jalz.2012.11.007.
- Prinz M, Priller J.** Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat Rev Neurosci.* **2014**;15(5):300-312. doi:10.1038/nrn3722
- Prinz M, Erny D, Hagemeyer N.** Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells. *Nat Immunol.* **2017**;18(4):385-392. doi: 10.1038/ni.3703.



Erratum in: *Nat Immunol.* 2017 Jul 19;18(8):951.

Prinz M, Priller J. The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease. *Nat Neurosci.* **2017**;20(2):136–144. doi:10.1038/nn.4475

Prokop S, Miller KR, Drost N, Handrick S, Mathur V, Luo J, et al. Impact of peripheral myeloid cells on amyloid- β pathology in Alzheimer's disease-like mice. *J Exp Med.* **2015**;212(11):1811–8. doi:10.1084/jem.20150479.

Prokop S, Miller KR, Labra SR, Pitkin RM, Hoxha K, Narasimhan S, et al. Impact of TREM2 risk variants on brain region-specific immune activation and plaque microenvironment in Alzheimer's disease patient brain samples. *Acta Neuropathol.* **2019**;138(4):613–630. doi:10.1007/s00401-019-02048-2.

Puighermanal E, Biever A, Valjent E. Synaptoneurosome Preparation from C57BL/6 Striata. *BIO-PROTOCOL.* **2016**;6(4):e1735. doi:10.21769/BioProtoc.1735

Puzzo D, Privitera L, Leznik E, Fà M, Staniszewski A, Palmeri A, Arancio O. Picomolar amyloid-beta positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J Neurosci.* **2008**;28(53):14537–45. doi:10.1523/JNEUROSCI.2692-08.2008.

Qian M, Shen X, Wang H. The Distinct Role of ADAM17 in APP Proteolysis and Microglial Activation Related to Alzheimer's Disease. *Cell Mol Neurobiol.* **2016**;36(4):471–482. doi:10.1007/s10571-015-0232-4

Radde R, Bolmont T, Kaeser SA, Coomaraswamy J, Lindau D, Stoltze L, et al. Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep.* **2006**;7(9):940–6. doi:10.1038/sj.embor.7400784.

Rajendran L, Annaert W. Membrane trafficking pathways in Alzheimer's disease. *Traffic.* **2012**;13(6):759–70. doi:10.1111/j.1600-0854.2012.01332.x.

Rajendran L, Paolicelli RC. Microglia-Mediated Synapse Loss in Alzheimer's Disease. *J Neurosci.* **2018**;38(12):2911–2919. doi:10.1523/JNEUROSCI.1136-17.2017

Ramos B, Baglietto-Vargas D, del Rio JC, Moreno-Gonzalez I, Santa-Maria C, Jimenez S, et al. Early neuropathology of somatostatin/NPY GABAergic cells in the hippocampus of a PS1xAPP transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* **2006**;27(11):1658–72. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.022.

Rana AK, Li Y, Dang Q, Yang F. Monocytes in rheumatoid arthritis: Circulating precursors of macrophages and osteoclasts and, their heterogeneity and plasticity role in RA pathogenesis. *Int Immunopharmacol.* **2018**;65:348–359. doi:10.1016/j.intimp.2018.10.016

Ranjbar S, Haridas V, Jasenosky LD, Falvo JV, Goldfeld AE. A Role for IFITM Proteins in Restriction of Mycobacterium tuberculosis Infection. *Cell Rep.* **2015**;13(5):874–883. doi:10.1016/j.celrep.2015.09.048

Ransohoff RM, Engelhardt B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat Rev Immunol.* **2012**;12(9):623–635. doi:10.1038/nri3265

Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science.* **2016**;353(6301):777–83. doi:10.1126/science.aag2590.

Ravi VM, Joseph K, Wurm J, Behringer S, Garrelfs N, d'Errico P, et al. Human organotypic brain slice culture: a novel framework for environmental research in neuro-oncology. *Life Sci*



Alliance. 2019;2(4):e201900305. doi: 10.26508/lsa.201900305.

Reed-Geaghan EG, Croxford AL, Becher B, Landreth GE. Plaque-associated myeloid cells derive from resident microglia in an Alzheimer's disease model. *J Exp Med*. 2020;217(4):e20191374. doi:10.1084/jem.20191374

Reiman EM, Arboleda-Velasquez JF, Quiroz YT, Huentelman MJ, Beach TG, Caselli RJ, et al. Exceptionally low likelihood of Alzheimer's dementia in APOE2 homozygotes from a 5,000-person neuropathological study. *Nat Commun*. 2020;11(1):667. doi: 10.1038/s41467-019-14279-8.

Reizis B. Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. *Immunity*. 2019;50(1):37–50. doi:10.1016/j.immuni.2018.12.027

Ricciarelli R, Fedele E. The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. *Curr Neuropharmacol*. 2017;15(6):926-935. doi: 10.2174/1570159X15666170116143743.

Ries M, Sastre M. Mechanisms of A β Clearance and Degradation by Glial Cells. *Front Aging Neurosci*. 2016;8:160. doi:10.3389/fnagi.2016.00160

Ringman JM, Schulman H, Becker C, Jones T, Bai Y, Immermann F, et al. Proteomic changes in cerebrospinal fluid of presymptomatic and affected persons carrying familial Alzheimer disease mutations. *Arch Neurol*. 2012;69(1):96-104. doi: 10.1001/archneurol.2011.642.

Ringman JM, Liang LJ, Zhou Y, Vangala S, Teng E, Kremen S, et al. Early behavioural changes in familial Alzheimer's disease in the Dominantly Inherited Alzheimer Network. *Brain*. 2015;138(Pt 4):1036-45. doi: 10.1093/brain/awv004. Erratum in: *Brain*. 2015 Dec;138(Pt 12):e401.

Río-Hortega, P. El "tercer elemento de los centros nerviosos". IV. Poder fagocitario y movilidad de la microglía. *Bol. Soc. Esp. Biol*. 1919a; VIII, 155–166.

Río-Hortega, P. El "tercer elemento" de los centros nerviosos. III. Naturaleza probable de la microglía. *Bol. Soc. Esp. Biol*. 1919b; VIII, 108–115.

Río-Hortega, P. El "tercer elemento" de los centros nerviosos. I. La microglía en estado normal. II. Intervención de la microglía en los procesos patológicos (células en bastoncito y cuerpos gránulo-adiposos). *Bol. Soc. Esp. Biol*. 1919c; VIII, 69–109.

Robichon K, Patel V, Connor B, La Flamme AC. Clozapine reduces infiltration into the CNS by targeting migration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroinflammation*. 2020;17(1):53. doi: 10.1186/s12974-020-01733-4.

Robinson M, Lee BY, Hane FT. Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 2: Genetics and Epidemiology. *J Alzheimers Dis*. 2017;57(2):317-330. doi: 10.3233/JAD-161149. Erratum in: *J Alzheimers Dis*. 2018;61(1):459.

Rodrigue KM, Kennedy KM, Devous MD Sr, Rieck JR, Hebrank AC, Diaz-Arrastia R, et al. β -Amyloid burden in healthy aging: regional distribution and cognitive consequences. *Neurology*. 2012;78(6):387-95. doi: 10.1212/WNL.0b013e318245d295.

Rodríguez A, Pérez-Gracia E, Espinosa JC, Pumarola M, Torres JM, Ferrer I. Increased expression of water channel aquaporin 1 and aquaporin 4 in Creutzfeldt-Jakob disease and in bovine spongiform encephalopathy-infected bovine-PrP transgenic mice. *Acta Neuropathol*. 2006;112(5):573-585. doi:10.1007/s00401-006-0117-1



- Rodríguez-Arellano JJ, Parpura V, Zorec R, Verkhratsky A.** Astrocytes in physiological aging and Alzheimer's disease. *Neuroscience*. **2016**;323:170-82. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.01.007.
- Romero-Molina C, Navarro V, Sanchez-Varo R, Jimenez S, Fernandez-Valenzuela JJ, Sanchez-Mico MV, et al.** Distinct Microglial Responses in Two Transgenic Murine Models of TAU Pathology. *Front Cell Neurosci*. **2018**;12:421. doi: 10.3389/fncel.2018.00421.
- Rosenberg RN, Lambracht-Washington D, Yu G, Xia W.** Genomics of Alzheimer Disease: A Review. *JAMA Neurol*. **2016**;73(7):867-74. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.0301.
- Rosenzweig N, Dvir-Szternfeld R, Tsitsou-Kampeli A, Keren-Shaul H, Ben-Yehuda H, Weill-Raynal P, et al.** PD-1/PD-L1 checkpoint blockade harnesses monocyte-derived macrophages to combat cognitive impairment in a tauopathy mouse model. *Nat Commun*. **2019**;10(1):465. doi: 10.1038/s41467-019-08352-5.
- Rudziak P, Ellis CG, Kowalewska PM.** Role and Molecular Mechanisms of Pericytes in Regulation of Leukocyte Diapedesis in Inflamed Tissues. *Mediators Inflamm*. **2019**;2019:4123605. doi: 10.1155/2019/4123605.
- Rustenhoven J, Smith AM, Smyth LC, Jansson D, Scotter EL, Swanson MEV, et al.** PU.1 regulates Alzheimer's disease-associated genes in primary human microglia. *Mol Neurodegener*. **2018**;13(1):44. doi: 10.1186/s13024-018-0277-1.
- Rydbirk R, Folke J, Winge K, Aznar S, Pakkenberg B, Brudek T.** Assessment of brain reference genes for RT-qPCR studies in neurodegenerative diseases. *Sci Rep*. **2016**;6:37116. doi: 10.1038/srep37116. Erratum in: *Sci Rep*. 2020 Jul 23;10(1):12559.
- Saederup N, Cardona AE, Croft K, Mizutani M, Cotleur AC, Tsou CL, et al.** Selective chemokine receptor usage by central nervous system myeloid cells in CCR2-red fluorescent protein knock-in mice. *PLoS One*. **2010**;5(10):e13693. doi: 10.1371/journal.pone.0013693. Erratum in: *PLoS One*. 2017 Apr 27;12(4):e0176931.
- Sakono M, Zako T.** Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers. *FEBS J*. **2010**;277(6):1348-58. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07568.x.
- Sala Frigerio C, Wolfs L, Fattorelli N, Thrupp N, Voytyuk I, Schmidt I, et al.** The Major Risk Factors for Alzheimer's Disease: Age, Sex, and Genes Modulate the Microglia Response to A β Plaques. *Cell Rep*. **2019**;27(4):1293-1306.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2019.03.099.
- Salani F, Sterbini V, Sacchinelli E, Garramone M, Bossù P.** Is Innate Memory a Double-Edge Sword in Alzheimer's Disease? A Reappraisal of New Concepts and Old Data. *Front Immunol*. **2019**;10:1768. doi: 10.3389/fimmu.2019.01768.
- Salas IH, De Strooper B.** Diabetes and Alzheimer's Disease: A Link not as Simple as it Seems. *Neurochem Res*. **2019**;44(6):1271-1278. doi:10.1007/s11064-018-2690-9
- Salter MW, Stevens B.** Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med*. **2017**;23(9):1018-1027. doi:10.1038/nm.4397
- Sancesario GM, Bernardini S.** Alzheimer's disease in the omics era. *Clin Biochem*. **2018**;59:9-16. doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.06.011
- Sanchez Mejias, E.** Estudio neuropatológico del hipocampo y giro parahipocampal en la enfermedad de Alzheimer: de modelos transgénicos a humanos. [Tesis Doctoral]. Málaga: Universidad de Málaga; **2015**.



- Sanchez-Mejias E, Navarro V, Jimenez S, Sanchez-Mico M, Sanchez-Varo R, Nuñez-Diaz C, et al.** Soluble phospho-tau from Alzheimer's disease hippocampus drives microglial degeneration. *Acta Neuropathol.* **2016**;132(6):897-916. doi: 10.1007/s00401-016-1630-5.
- Sanchez-Mejias E, Nuñez-Diaz C, Sanchez-Varo R, Gomez-Arboledas A, Garcia-Leon JA, Fernandez-Valenzuela JJ, et al.** Distinct disease-sensitive GABAergic neurons in the perirhinal cortex of Alzheimer's mice and patients. *Brain Pathol.* **2020**;30(2):345-363. doi: 10.1111/bpa.12785.
- Sanchez-Mico MV.** Caracterización de la respuesta y función astrogliar en modelos y pacientes de la enfermedad de Alzheimer [Tesis Doctoral]. Sevilla: Universidad de Sevilla; **2019**.
- Sanchez-Mico MV, Jimenez S, Gomez-Arboledas A, Muñoz-Castro C, Romero-Molina C, Navarro V et al.** Amyloid- β impairs the phagocytosis of dystrophic synapses by astrocytes in Alzheimer's disease. *Glia.* **2020**. Aceptado para publicación.
- Sanchez-Varo R, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, Torres M, Baglietto-Vargas D, Moreno-Gonzalez I, et al.** Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus. *Acta Neuropathol.* **2012**;123(1):53-70. doi: 10.1007/s00401-011-0896-x.
- Sankowski R, Böttcher C, Masuda T, Geirsdottir L, Sagar, Sindram E, et al.** Mapping microglia states in the human brain through the integration of high-dimensional techniques. *Nat Neurosci.* **2019**;22(12):2098-2110. doi: 10.1038/s41593-019-0532-y.
- Saresella M, La Rosa F, Piancone F, Zoppis M, Marventano I, Calabrese E, et al.** The NLRP3 and NLRP1 inflammasomes are activated in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* **2016**;11:23. doi: 10.1186/s13024-016-0088-1.
- Sarlus H, Heneka MT.** Microglia in Alzheimer's disease. *J Clin Invest.* **2017**;127(9):3240-3249. doi:10.1172/JCI90606
- Sastre M, Klockgether T, Heneka MT.** Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *Int J Dev Neurosci.* **2006**;24(2-3):167-76. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2005.11.014.
- Sato N, Morishita R.** Brain alterations and clinical symptoms of dementia in diabetes: α /tau-dependent and independent mechanisms. *Front Endocrinol (Lausanne).* **2014**;5:143. doi: 10.3389/fendo.2014.00143.
- Satoh J, Tabira T, Sano M, Nakayama H, Tateishi J.** Parvalbumin-immunoreactive neurons in the human central nervous system are decreased in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **1991**;81(4):388-395. doi:10.1007/BF00293459
- Savage MJ, Iqbal M, Loh T, Trusko SP, Scott R, Siman R.** Cathepsin G: localization in human cerebral cortex and generation of amyloidogenic fragments from the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience.* **1994**;60(3):607-619. doi:10.1016/0306-4522(94)90490-1
- Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, et al.** Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron.* **2012**;74(4):691-705. doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.026.
- Scheltens P, Blennow K, Breteler MM, de Strooper B, Frisoni GB, Salloway S, Van der Flier WM.** Alzheimer's disease. *Lancet.* **2016**;388(10043):505-17. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01124-1.



- Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, et al.** Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1993**;90(20):9649-53. doi: 10.1073/pnas.90.20.9649.
- Scholz T, Mandelkow E.** Transport and diffusion of Tau protein in neurons. *Cell Mol Life Sci.* **2014**;71(16):3139-50. doi: 10.1007/s00018-014-1610-7.
- Schwartz M, Deczkowska A.** Neurological Disease as a Failure of Brain-Immune Crosstalk: The Multiple Faces of Neuroinflammation. *Trends Immunol.* **2016**;37(10):668-679. doi: 10.1016/j.it.2016.08.001.
- Selkoe DJ.** Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev.* **2001**;81(2):741-66. doi: 10.1152/physrev.2001.81.2.741.
- Selkoe DJ.** Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Cell Biol.* **2004**;6(11):1054-61. doi: 10.1038/ncb1104-1054.
- Selkoe DJ, Hardy J.** The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med.* **2016**;8(6):595-608. doi: 10.15252/emmm.201606210.
- Sengillo JD, Winkler EA, Walker CT, Sullivan JS, Johnson M, Zlokovic BV.** Deficiency in mural vascular cells coincides with blood-brain barrier disruption in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* **2013**;23(3):303-310. doi:10.1111/bpa.12004
- Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT.** Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2011a**;1(1):a006189. doi:10.1101/cshperspect.a006189
- Serrano-Pozo A, Mielke ML, Gómez-Isla T, Betensky RA, Growdon JH, Frosch MP, Hyman BT.** Reactive glia not only associates with plaques but also parallels tangles in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* **2011b**;179(3):1373-84. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.05.047.
- Serrano-Pozo A, Gómez-Isla T, Growdon JH, Frosch MP, Hyman BT.** A phenotypic change but not proliferation underlies glial responses in Alzheimer disease. *Am J Pathol.* **2013a**;182(6):2332-2344. doi:10.1016/j.ajpath.2013.02.031
- Serrano-Pozo A, Muzikansky A, Gómez-Isla T, Growdon JH, Betensky RA, Frosch MP, Hyman BT.** Differential relationships of reactive astrocytes and microglia to fibrillar amyloid deposits in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* **2013b**;72(6):462-71. doi: 10.1097/NEN.0b013e3182933788.
- Serrano-Pozo A, Betensky RA, Frosch MP, Hyman BT.** Plaque-Associated Local Toxicity Increases over the Clinical Course of Alzheimer Disease. *Am J Pathol.* **2016**;186(2):375-384. doi:10.1016/j.ajpath.2015.10.010
- Serrano-Pozo A, Growdon JH.** Is Alzheimer's Disease Risk Modifiable?. *J Alzheimers Dis.* **2019**;67(3):795-819. doi:10.3233/JAD181028
- Serrats J, Schiltz JC, García-Bueno B, van Rooijen N, Reyes TM, Sawchenko PE.** Dual roles for perivascular macrophages in immune-to-brain signaling. *Neuron.* **2010**;65(1):94-106. doi:10.1016/j.neuron.2009.11.032
- Sevenich L.** Brain-Resident Microglia and Blood-Borne Macrophages Orchestrate Central Nervous System Inflammation in Neurodegenerative Disorders and Brain Cancer. *Front Immunol.* **2018**;9:697. doi: 10.3389/fimmu.2018.00697.
- Shad KF, Aghazadeh Y, Ahmad S, Kress B.** Peripheral markers of



Alzheimer's disease: surveillance of white blood cells. *Synapse*. **2013**;67(8):541-543. doi:10.1002/syn.21651

Shankar GM, Bloodgood BL, Townsend M, Walsh DM, Selkoe DJ, Sabatini BL. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway. *J Neurosci*. **2007**;27(11):2866-2875. doi:10.1523/JNEUROSCI.4970-06.2007

Shankar GM, Li S, Mehta TH, Garcia-Munoz A, Shepardson NE, Smith I, et al. Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nat Med*. **2008**;14(8):837-42. doi: 10.1038/nm1782.

Shechter R, Miller O, Yovel G, Rosenzweig N, London A, Ruckh J, et al. Recruitment of beneficial M2 macrophages to injured spinal cord is orchestrated by remote brain choroid plexus. *Immunity*. **2013**;38(3):555-69. doi: 10.1016/j.immuni.2013.02.012.

Shemer A, Grozovski J, Tay TL, Tao J, Volaski A, Süß P, et al. Engrafted parenchymal brain macrophages differ from microglia in transcriptome, chromatin landscape and response to challenge. *Nat Commun*. **2018**;9(1):5206. doi: 10.1038/s41467-018-07548-5.

Shi Q, Chowdhury S, Ma R, Le KX, Hong S, Caldarone BJ, et al. Complement C3 deficiency protects against neurodegeneration in aged plaque-rich APP/PS1 mice. *Sci Transl Med*. **2017a**;9(392):eaaf6295. doi: 10.1126/scitranslmed.aaf6295.

Shi Y, Yamada K, Liddelow SA, Smith ST, Zhao L, Luo W, et al. ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. *Nature*. **2017b**;549(7673):523-527. doi: 10.1038/nature24016.

Shi Y, Holtzman DM. Interplay between innate immunity and Alzheimer disease: APOE and TREM2 in the spotlight. *Nat Rev Immunol*. **2018**;18(12):759-772. doi: 10.1038/s41577-018-0051-1.

Shukla AK, McIntyre LL, Marsh SE, Schneider CA, Hoover EM, Walsh CM, et al. CD11a expression distinguishes infiltrating myeloid cells from plaque-associated microglia in Alzheimer's disease. *Glia*. **2019**;67(5):844-856. doi: 10.1002/glia.23575.

Sidoryk-Węgrzynowicz M, Gerber YN, Ries M, Sastre M, Tolkovsky AM, Spillantini MG. Astrocytes in mouse models of tauopathies acquire early deficits and lose neurosupportive functions. *Acta Neuropathol Commun*. **2017**;5(1):89. doi: 10.1186/s40478-017-0478-9.

Sidoryk-Węgrzynowicz M, Strużyńska L. Astroglial contribution to tau-dependent neurodegeneration. *Biochem J*. **2019**;476(22):3493-3504. doi:10.1042/BCJ20190506

Sierksma A, Lu A, Mancuso R, Fattorelli N, Thrupp N, Salta E, et al. Novel Alzheimer risk genes determine the microglia response to amyloid- β but not to TAU pathology. *EMBO Mol Med*. **2020**;12(3):e10606. doi: 10.15252/emmm.201910606.

Sikanyika NL, Parkington HC, Smith AI, Kuruppu S. Powering Amyloid Beta Degrading Enzymes: A Possible Therapy for Alzheimer's Disease. *Neurochem Res*. **2019**;44(6):1289-1296. doi:10.1007/s11064-019-02756-x

Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien JP, Rivest S. Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron*. **2006**;49(4):489-502. doi:10.1016/j.neuron.2006.01.022



- Simpson IA, Chundu KR, Davies-Hill T, Honer WG, Davies P.** Decreased concentrations of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* **1994**;35(5):546-551. doi:10.1002/ana.410350507
- Simpson JE, Ince PG, Lacey G, Forster G, Shaw PJ, Matthews F, et al.** Astrocyte phenotype in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neurobiol Aging.* **2010**;31(4):578-90. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.05.015.
- Skaper SD.** The brain as a target for inflammatory processes and neuroprotective strategies. *Ann N Y Acad Sci.* **2007**;1122:23-34. doi:10.1196/annals.1403.002
- Slyper M, Porter CBM, Ashenberg O, Waldman J, Drokhlyansky E, Wakiro I, et al.** A single-cell and single-nucleus RNA-Seq toolbox for fresh and frozen human tumors. *Nat Med.* **2020**;26(5):792-802. doi: 10.1038/s41591-020-0844-1. Erratum in: *Nat Med.* 2020 Jun 25.
- Smith AM, Dragunow M.** The human side of microglia. *Trends Neurosci.* **2014**;37(3):125-135. doi:10.1016/j.tins.2013.12.001
- Snowden SG, Ebshiana AA, Hye A, An Y, Pletnikova O, O'Brien R, et al.** Association between fatty acid metabolism in the brain and Alzheimer disease neuropathology and cognitive performance: A nontargeted metabolomic study. *PLoS Med.* **2017**;14(3):e1002266. doi: 10.1371/journal.pmed.1002266.
- Sochocka M, Diniz BS, Leszek J.** Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? *Mol Neurobiol.* **2017**;54(10):8071-8089. doi:10.1007/s12035-016-0297-1.
- Sofroniew MV, Vinters HV.** Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* **2010**;119(1):7-35. doi:10.1007/s00401-009-0619-8
- Sokolova A, Hill MD, Rahimi F, Warden LA, Halliday GM, Shepherd CE.** Monocyte chemoattractant protein-1 plays a dominant role in the chronic inflammation observed in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* **2009**;19(3):392-398. doi:10.1111/j.1750-3639.2008.00188.x
- Solomon A, Kivipelto M, Wolozin B, Zhou J, Whitmer RA.** Midlife serum cholesterol and increased risk of Alzheimer's and vascular dementia three decades later. *Dement Geriatr Cogn Disord.* **2009**;28(1):75-80. doi:10.1159/000231980
- Soucek T, Cumming R, Dargusch R, Maher P, Schubert D.** The regulation of glucose metabolism by HIF-1 mediates a neuroprotective response to amyloid beta peptide. *Neuron.* **2003**;39(1):43-56. doi:10.1016/s0896-6273(03)00367-2
- Spampinato SF, Merlo S, Fagone E, Fruciano M, Barbagallo C, Kanda T, et al.** Astrocytes Modify Migration of PBMCs Induced by β -Amyloid in a Blood-Brain Barrier *in vitro* Model. *Front Cell Neurosci.* **2019**;13:337. doi:10.3389/fncel.2019.00337.
- Späni C, Suter T, Derungs R, Ferretti MT, Welt T, Wirth F, et al.** Reduced β -amyloid pathology in an APP transgenic mouse model of Alzheimer's disease lacking functional B and T cells. *Acta Neuropathol Commun.* **2015**;3:71. doi:10.1186/s40478-015-0251-x.
- Spillantini MG, Goedert M.** Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol.* **2013**;12(6):609-22. doi:10.1016/S1474-4422(13)70090-5.
- Spiller KJ, Restrepo CR, Khan T, Dominique MA, Fang TC, Canter RG, et al.** Microglia-mediated recovery from ALS-relevant motor neuron degeneration in a mouse model of TDP-43 proteinopathy. *Nat Neurosci.*



- 2018;21(3):329-340. doi: 10.1038/s41593-018-0083-7. Ep
- Spires-Jones TL, Hyman BT.** The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron*. 2014;82(4):756-71. doi: 10.1016/j.neuron.2014.05.004.
- Sprangers S, de Vries TJ, Everts V.** Monocyte Heterogeneity: Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells. *J Immunol Res*. 2016;2016:1475435. doi:10.1155/2016/1475435
- Srinivasan K, Friedman BA, Larson JL, Lauffer BE, Goldstein LD, Appling LL, et al.** Untangling the brain's neuroinflammatory and neurodegenerative transcriptional responses. *Nat Commun*. 2016;7:11295. doi: 10.1038/ncomms11295.
- Srinivasan K, Friedman BA, Etxeberria A, Huntley MA, van der Brug MP, Foreman O, et al.** Alzheimer's Patient Microglia Exhibit Enhanced Aging and Unique Transcriptional Activation. *Cell Rep*. 2020;31(13):107843. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107843.
- Steiner J, Bernstein HG, Bielau H, Berndt A, Brisch R, Mawrin C, et al.** Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain. *BMC Neurosci*. 2007;8:2. doi: 10.1186/1471-2202-8-2.
- Stephan AH, Barres BA, Stevens B.** The complement system: an unexpected role in synaptic pruning during development and disease. *Annu Rev Neurosci*. 2012;35:369-389. doi:10.1146/annurev-neuro-061010-113810
- Stephan AH, Madison DV, Mateos JM, Fraser DA, Lovelett EA, Coutellier L, et al.** A dramatic increase of C1q protein in the CNS during normal aging. *J Neurosci*. 2013;33(33):13460-74. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1333-13.2013.
- Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, et al.** The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell*. 2007;131(6):1164-78. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.036.
- Stevens B.** Neuron-astrocyte signaling in the development and plasticity of neural circuits. *Neurosignals*. 2008;16(4):278-288. doi:10.1159/000123038
- Stilund M, Reuschlein AK, Christensen T, Møller HJ, Rasmussen PV, Petersen T.** Soluble CD163 as a marker of macrophage activity in newly diagnosed patients with multiple sclerosis. *PLoS One*. 2014;9(6):e98588. doi: 10.1371/journal.pone.0098588.
- Storck SE, Meister S, Nahrath J, Meißner JN, Schubert N, Di Spiezio A, et al.** Endothelial LRP1 transports amyloid-β(1-42) across the blood-brain barrier. *J Clin Invest*. 2016;126(1):123-36. doi: 10.1172/JCI81108.
- Stratoulis V, Venero JL, Tremblay ME, Joseph B.** Microglial subtypes: diversity within the microglial community. *EMBO J*. 2019;38(17):e101997. doi:10.15252/embj.2019101997
- Streit WJ, Braak H, Xue QS, Bechmann I.** Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2009;118(4):475-485. doi:10.1007/s00401-009-0556-6
- Streit WJ, Xue QS.** Life and death of microglia. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2009;4(4):371-379. doi:10.1007/s11481-009-9163-5
- Streit WJ, Khoshbouei H, Bechmann I.** Dystrophic microglia in late-onset Alzheimer's disease. *Glia*. 2020;68(4):845-854. doi:10.1002/glia.23782



- Sun JH, Yu JT, Tan L.** The role of cholesterol metabolism in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* **2015a**;51(3):947-965. doi:10.1007/s12035-014-8749-y
- Sun X, Chen WD, Wang YD.** β -Amyloid: the key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Front Pharmacol.* **2015b**;6:221. doi:10.3389/fphar.2015.00221.
- Swanson MEV, Murray HC, Ryan B, Faul RLM, Dragunow M, Curtis MA.** Quantitative immunohistochemical analysis of myeloid cell marker expression in human cortex captures microglia heterogeneity with anatomical context. *Sci Rep.* **2020**;10(1):11693. doi:10.1038/s41598-020-68086-z.
- Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV.** Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol.* **2018**;14(3):133-150. doi:10.1038/nrneurol.2017.188
- Swiecki M, Colonna M.** The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* **2015**;15(8):471-485. doi:10.1038/nri3865
- Takahashi H, Brasnjevic I, Rutten BP, Van Der Kolk N, Perl DP, Bouras C, et al.** Hippocampal interneuron loss in an APP/PS1 double mutant mouse and in Alzheimer's disease. *Brain Struct Funct.* **2010**;214(2-3):145-60. doi:10.1007/s00429-010-0242-4.
- Takahashi RH, Nagao T, Gouras GK.** Plaque formation and the intraneuronal accumulation of β -amyloid in Alzheimer's disease. *Pathol Int.* **2017**;67(4):185-193. doi:10.1111/pin.12520.
- Takeda S, Sato N, Uchio-Yamada K, Sawada K, Kunieda T, Takeuchi D, et al.** Diabetes-accelerated memory dysfunction via cerebrovascular inflammation and Abeta deposition in an Alzheimer mouse model with diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2010**;107(15):7036-41. doi:10.1073/pnas.1000645107.
- Takeuchi O, Akira S.** Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* **2010**;140(6):805-820. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022
- Tan J, Town T, Crawford F, Mori T, DelleDonne A, Crescentini R, et al.** Role of CD40 ligand in amyloidosis in transgenic Alzheimer's mice. *Nat Neurosci.* **2002**;5(12):1288-93. doi:10.1038/nn968.
- Tarasoff-Conway JM, Carare RO, Osorio RS, Glodzik L, Butler T, Fiermans E, et al.** Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol.* **2015**;11(8):457-70. doi:10.1038/nrneurol.2015.119. Erratum in: *Nat Rev Neurol.* 2016 Apr;12(4):248.
- Tatarnikova OG, Orlov MA, Bobkova NV.** Beta-Amyloid and Tau-Protein: Structure, Interaction, and Prion-Like Properties. *Biochemistry (Mosc).* **2015**;80(13):1800-19. doi:10.1134/S000629791513012X.
- Teh YC, Ding JL, Ng LG, Chong SZ.** Capturing the Fantastic Voyage of Monocytes Through Time and Space. *Front Immunol.* **2019**;10:834. doi:10.3389/fimmu.2019.00834.
- Tentillier N, Etzerodt A, Olesen MN, Rizalar FS, Jacobsen J, Bender D, et al.** Anti-Inflammatory Modulation of Microglia via CD163-Targeted Glucocorticoids Protects Dopaminergic Neurons in the 6-OHDA Parkinson's Disease Model. *J Neurosci.* **2016**;36(36):9375-90. doi:10.1523/JNEUROSCI.1636-16.2016.
- Ter Laak HJ, Renkawek K, van Workum FP.** The olfactory bulb in Alzheimer disease: a morphologic study of neuron loss, tangles, and senile plaques in relation to olfaction. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* **1994**;8(1):38-48.



- Thal DR, Capetillo-Zarate E, Del Tredici K, Braak H.** The development of amyloid beta protein deposits in the aged brain. *Sci Aging Knowledge Environ.* **2006**;2006(6):re1. doi: 10.1126/sageke.2006.6.re1.
- Theofilas P, Ehrenberg AJ, Dunlop S, Di Lorenzo Alho AT, Nguy A, Leite REP, et al.** Locus coeruleus volume and cell population changes during Alzheimer's disease progression: A stereological study in human postmortem brains with potential implication for early-stage biomarker discovery. *Alzheimers Dement.* **2017**;13(3):236-246. doi: 10.1016/j.jalz.2016.06.2362.
- Thériault P, ElAli A, Rivest S.** The dynamics of monocytes and microglia in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther.* **2015**;7(1):41. doi: 10.1186/s13195-015-0125-2.
- Thion MS, Low D, Silvin A, Chen J, Grisel P, Schulte-Schrepping J, et al.** Microbiome Influences Prenatal and Adult Microglia in a Sex-Specific Manner. *Cell.* **2018**;172(3):500-516.e16. doi: 10.1016/j.cell.2017.11.042.
- Thion MS, Garel S.** Microglia Under the Spotlight: Activity and Complement-Dependent Engulfment of Synapses. *Trends Neurosci.* **2018**;41(6):332-334. doi:10.1016/j.tins.2018.03.017
- Thomas GD, Hamers AAJ, Nakao C, Marcovecchio P, Taylor AM, McSkimming C, et al.** Human Blood Monocyte Subsets: A New Gating Strategy Defined Using Cell Surface Markers Identified by Mass Cytometry. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2017**;37(8):1548-1558. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309145.
- Thome AD, Faridar A, Beers DR, Thonhoff JR, Zhao W, Wen S, et al.** Functional alterations of myeloid cells during the course of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* **2018**;13(1):61. doi: 10.1186/s13024-018-0293-1.
- Thompson PM, Hayashi KM, de Zubicaray G, Janke AL, Rose SE, Semple J, et al.** Dynamics of gray matter loss in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* **2003**;23(3):994-1005. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-03-00994.2003.
- Thrupp N, Sala Frigerio C, Wolfs L, Skene NG, Fattorelli N, Poovathingal S, et al.** Single-Nucleus RNA-Seq Is Not Suitable for Detection of Microglial Activation Genes in Humans. *Cell Rep.* **2020**;32(13):108189. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108189.
- Timmermann M, Buck F, Sorg C, Högger P.** Interaction of soluble CD163 with activated T lymphocytes involves its association with non-muscle myosin heavy chain type A. *Immunol Cell Biol.* **2004**;82(5):479-487. doi:10.1111/j.0818-9641.2004.01277.x
- Torres M, Jimenez S, Sanchez-Varo R, Navarro V, Trujillo-Estrada L, Sanchez-Mejias E, et al.** Defective lysosomal proteolysis and axonal transport are early pathogenic events that worsen with age leading to increased APP metabolism and synaptic Abeta in transgenic APP/PS1 hippocampus. *Mol Neurodegener.* **2012**;7:59. doi: 10.1186/1750-1326-7-59.
- Tremblay MÈ, Lecours C, Samson L, Sánchez-Zafra V, Sierra A.** From the Cajal alumni Achúcarro and Río-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia. *Front Neuroanat.* **2015**;9:45. doi:10.3389/fnana.2015.00045
- Tremblay R, Lee S, Rudy B.** GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron.* **2016**;91(2):260-292. doi:10.1016/j.neuron.2016.06.033
- Tripathy D, Thirumangalakudi L, Grammas P.** RANTES upregulation in the Alzheimer's disease brain: a possible neuroprotective role. *Neurobiol Aging.* **2010**;31(1):8-16. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.03.009



- Trujillo-Estrada L, Dávila JC, Sánchez-Mejías E, Sánchez-Varo R, Gomez-Arboledas A, Vizúete M, et al.** Early neuronal loss and axonal/presynaptic damage is associated with accelerated amyloid- β accumulation in A β PP/PS1 Alzheimer's disease mice subiculum. *J Alzheimers Dis.* **2014**;42(2):521-41. doi: 10.3233/JAD-140495.
- Turnquist C, Horikawa I, Foran E, Major EO, Vojtesek B, Lane DP, et al.** p53 isoforms regulate astrocyte-mediated neuroprotection and neurodegeneration. *Cell Death Differ.* **2016**;23(9):1515-28. doi: 10.1038/cdd.2016.37.
- Ubogu EE, Cossoy MB, Ransohoff RM.** The expression and function of chemokines involved in CNS inflammation. *Trends Pharmacol Sci.* **2006**;27(1):48-55. doi:10.1016/j.tips.2005.11.002
- Ulland TK, Song WM, Huang SC, Ulrich JD, Sergushichev A, Beatty WL, et al.** TREM2 Maintains Microglial Metabolic Fitness in Alzheimer's Disease. *Cell.* **2017**;170(4):649-663.e13. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.023.
- Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA.** Control of synapse number by glia. *Science.* **2001**;291(5504):657-661. doi:10.1126/science.291.5504.657
- Unger MS, Marschallinger J, Kaindl J, Klein B, Johnson M, Khundakar AA, et al.** Doublecortin expression in CD8+ T-cells and microglia at sites of amyloid- β plaques: A potential role in shaping plaque pathology? *Alzheimers Dement.* **2018**;14(8):1022-1037. doi: 10.1016/j.jalz.2018.02.017.
- Vainchtein ID, Molofsky AV.** Astrocytes and Microglia: In Sickness and in Health. *Trends Neurosci.* **2020**;43(3):144-154. doi: 10.1016/j.tins.2020.01.003.
- Valori CF, Guidotti G, Brambilla L, Rossi D.** Astrocytes: Emerging Therapeutic Targets in Neurological Disorders. *Trends Mol Med.* **2019**;25(9):750-759. doi:10.1016/j.molmed.2019.04.010
- Van Eldik LJ, Griffin WS.** S100 beta expression in Alzheimer's disease: relation to neuropathology in brain regions. *Biochim Biophys Acta.* **1994**;1223(3):398-403. doi:10.1016/0167-4889(94)90101-5
- Van Hove H, Martens L, Scheyltjens I, De Vlaminc K, Pombo Antunes AR, De Prijck S, et al.** A single-cell atlas of mouse brain macrophages reveals unique transcriptional identities shaped by ontogeny and tissue environment. *Nat Neurosci.* **2019**;22(6):1021-1035. doi: 10.1038/s41593-019-0393-4. E
- Van Lenhossék M.** "Die Stützzellen des Rückenmarkes," in *Der Feinere Bau Des Nervensystems Im Lichte Neuester Forschungen*, ed. Kornfeld B. H. (Berlin: Fischer's Medicine). **1895**; 176-247.
- Van Uden D, Boomars K, Kool M.** Dendritic Cell Subsets and Effector Function in Idiopathic and Connective Tissue Disease-Associated Pulmonary Arterial Hypertension. *Front Immunol.* **2019**;10:11. doi:10.3389/fimmu.2019.00011
- Varvel NH, Grathwohl SA, Degenhardt K, Resch C, Bosch A, Jucker M, Neher JJ.** Replacement of brain-resident myeloid cells does not alter cerebral amyloid- β deposition in mouse models of Alzheimer's disease. *J Exp Med.* **2015**;212(11):1803-9. doi: 10.1084/jem.20150478.
- Varvel NH, Neher JJ, Bosch A, Wang W, Ransohoff RM, Miller RJ, Dingleline R.** Infiltrating monocytes promote brain inflammation and exacerbate neuronal damage after status epilepticus. *Proc Natl Acad Sci U S A.*



- 2016;113(38):E5665-74. doi: 10.1073/pnas.1604263113.
- Vasile F, Dossi E, Rouach N.** Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Struct Funct.* 2017;222(5):2017-2029. doi:10.1007/s00429-017-1383-5
- Vassar R, Kovacs DM, Yan R, Wong PC.** The beta-secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. *J Neurosci.* 2009;29(41):12787-94. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3657-09.2009.
- Veerhuis R, Janssen I, Hack CE, Eikelenboom P.** Early complement components in Alzheimer's disease brains. *Acta Neuropathol.* 1996;91(1):53-60. doi:10.1007/s004019570001
- Veerhuis R, Janssen I, De Groot CJ, Van Muiswinkel FL, Hack CE, Eikelenboom P.** Cytokines associated with amyloid plaques in Alzheimer's disease brain stimulate human glial and neuronal cell cultures to secrete early complement proteins, but not C1-inhibitor. *Exp Neurol.* 1999;160(1):289-299. doi:10.1006/exnr.1999.7199
- Venteicher AS, Tirosh I, Hebert C, Yizhak K, Neftel C, Filbin MG, et al.** Decoupling genetics, lineages, and microenvironment in IDH-mutant gliomas by single-cell RNA-seq. *Science.* 2017;355(6332):eaai8478. doi: 10.1126/science.aai8478.
- Vereecken TH, Vogels OJ, Nieuwenhuys R.** Neuron loss and shrinkage in the amygdala in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 1994;15(1):45-54. doi: 10.1016/0197-4580(94)90143-0.
- Verkhatsky A, Olabarria M, Noristani HN, Yeh CY, Rodriguez JJ.** Astrocytes in Alzheimer's disease. *Neurotherapeutics.* 2010;7(4):399-412. doi: 10.1016/j.nurt.2010.05.017.
- Verkhatsky A, Zorec R, Rodriguez JJ, Parpura V.** Pathobiology of neurodegeneration: the role for astroglia. *Opera Med Physiol.* 2016;1:13-22.
- Vestweber D.** How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(11):692-704. doi:10.1038/nri3908
- Villa A, Gelosa P, Castiglioni L, Cimino M, Rizzi N, Pepe G, et al.** Sex-Specific Features of Microglia from Adult Mice. *Cell Rep.* 2018;23(12):3501-3511. doi: 10.1016/j.celrep.2018.05.048.
- Villani AC, Satija R, Reynolds G, Sarkizova S, Shekhar K, Fletcher J, et al.** Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science.* 2017;356(6335):eaah4573. doi: 10.1126/science.aah4573.
- Viola KL, Klein WL.** Amyloid β oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol.* 2015;129(2):183-206. doi: 10.1007/s00401-015-1386-3.
- Virmani A, Pinto L, Bauermann O, Zerelli S, Diedenhofen A, Binienda ZK, et al.** The Carnitine Palmitoyl Transferase (CPT) System and Possible Relevance for Neuropsychiatric and Neurological Conditions. *Mol Neurobiol.* 2015;52(2):826-36. doi: 10.1007/s12035-015-9238-7.
- Vogels OJ, Broere CA, ter Laak HJ, ten Donkelaar HJ, Nieuwenhuys R, Schulte BP.** Cell loss and shrinkage in the nucleus basalis Meynert complex in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 1990;11(1):3-13. doi: 10.1016/0197-4580(90)90056-6.
- Von Bartheld CS, Bahney J, Herculano-Houzel S.** The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J Comp Neurol.*



2016;524(18):3865–3895.
doi:10.1002/cne.24040

von Gunten A, Kövari E, Bussièrè T, Rivara CB, Gold G, Bouras C, et al. Cognitive impact of neuronal pathology in the entorhinal cortex and CA1 field in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2006;27(2):270-7. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.02.008.

Walker DG, Kim SU, McGeer PL. Expression of complement C4 and C9 genes by human astrocytes. *Brain Res*. 1998;809(1):31-38. doi:10.1016/s0006-8993(98)00811-7

Wang JZ, Xia YY, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Abnormal hyperphosphorylation of tau: sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration. *J Alzheimers Dis*. 2013;33 Suppl 1:S123-39. doi: 10.3233/JAD-2012-129031.

Wang Y, Cella M, Mallinson K, Ulrich JD, Young KL, Robinette ML, et al. TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model. *Cell*. 2015;160(6):1061-71. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.049.

Wang Y, Ulland TK, Ulrich JD, Song W, Tzaferis JA, Hole JT, et al. TREM2-mediated early microglial response limits diffusion and toxicity of amyloid plaques. *J Exp Med*. 2016;213(5):667-75. doi: 10.1084/jem.20151948.

Wang Y, Woehrstein JB, Donoghue N, Dai M, Avendaño MS, Schackmann RCJ, et al. Rapid Sequential in Situ Multiplexing with DNA Exchange Imaging in Neuronal Cells and Tissues. *Nano Lett*. 2017;17(10):6131-6139. doi: 10.1021/acs.nanolett.7b02716.

Wang C, Zhao F, Shen K, Wang W, Siedlak SL, Lee HG, et al. The sterol regulatory element-binding protein 2 is dysregulated by tau alterations in Alzheimer disease. *Brain Pathol*.

2019;29(4):530-543. doi: 10.1111/bpa.12691.

Webster S, Lue LF, Brachova L, Tenner AJ, McGeer PL, Terai K, et al. Molecular and cellular characterization of the membrane attack complex, C5b-9, in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 1997;18(4):415-21. doi: 10.1016/s0197-4580(97)00042-0.

Weller RO, Subash M, Preston SD, Mazanti I, Carare RO. Perivascular drainage of amyloid-beta peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *Brain Pathol*. 2008;18(2):253-66. doi: 10.1111/j.1750-3639.2008.00133.x.

West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet*. 1994;344(8925):769-772. doi:10.1016/s0140-6736(94)92338-8

Westin K, Buchhave P, Nielsen H, Minthon L, Janciauskiene S, Hansson O. CCL2 is associated with a faster rate of cognitive decline during early stages of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2012;7(1):e30525. doi:10.1371/journal.pone.0030525

Wilcock DM, Vitek MP, Colton CA. Vascular amyloid alters astrocytic water and potassium channels in mouse models and humans with Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2009;159(3):1055-1069. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.01.023

Wilhelmsson U, Li L, Pekna M, Berthold CH, Blom S, Eliasson C, et al. Absence of glial fibrillary acidic protein and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post-traumatic regeneration. *J Neurosci*. 2004;24(21):5016-21. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0820-04.2004.

Wilkins HM, Swerdlow RH. Amyloid precursor protein processing and



- bioenergetics. *Brain Res Bull.* 2017 Jul;133:71-79. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.08.009.
- Winblad B, Amouyel P, Andrieu S, Ballard C, Brayne C, Brodaty H, et al.** Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society. *Lancet Neurol.* 2016;15(5):455-532. doi: 10.1016/S1474-4422(16)00062-4.
- Winkler EA, Sagare AP, Zlokovic BV.** The pericyte: a forgotten cell type with important implications for Alzheimer's disease?. *Brain Pathol.* 2014;24(4):371-386. doi:10.1111/bpa.12152
- Wolfe MS, Guénette SY.** APP at a glance. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 18):3157-61. doi: 10.1242/jcs.03481.
- Wolfe MS.** Structure and Function of the γ -Secretase Complex. *Biochemistry.* 2019;58(27):2953-2966. doi: 10.1021/acs.biochem.9b00401.
- Wong KL, Tai JJ, Wong WC, Han H, Sem X, Yeap WH, et al.** Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood.* 2011;118(5):e16-31. doi: 10.1182/blood-2010-12-326355.
- Wong KL, Yeap WH, Tai JJ, Ong SM, Dang TM, Wong SC.** The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res.* 2012;53(1-3):41-57. doi:10.1007/s12026-012-8297-3
- Wu T, Dejanovic B, Gandham VD, Gogineni A, Edmonds R, Schauer S, et al.** Complement C3 Is Activated in Human AD Brain and Is Required for Neurodegeneration in Mouse Models of Amyloidosis and Tauopathy. *Cell Rep.* 2019;28(8):2111-2123.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2019.07.060.
- Wyss-Coray T, Yan F, Lin AH, Lambris JD, Alexander JJ, Quigg RJ, Masliah E.** Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement-inhibited Alzheimer's mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(16):10837-42. doi: 10.1073/pnas.162350199.
- Wyss-Coray T.** Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response?. *Nat Med.* 2006;12(9):1005-1015. doi:10.1038/nm1484
- Xiong H, Callaghan D, Jones A, Walker DG, Lue LF, Beach TG, et al.** Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and A β production. *Neurobiol Dis.* 2008;29(3):422-37. doi: 10.1016/j.nbd.2007.10.005.
- Xu W, Tan L, Wang HF, Jiang T, Tan MS, Tan L, et al.** Meta-analysis of modifiable risk factors for Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2015;86(12):1299-306. doi: 10.1136/jnnp-2015-310548.
- Yamamoto M, Horiba M, Buescher JL, Huang D, Gendelman HE, Ransohoff RM, Ikezu T.** Overexpression of monocyte chemotactic protein-1/CCL2 in beta-amyloid precursor protein transgenic mice show accelerated diffuse beta-amyloid deposition. *Am J Pathol.* 2005;166(5):1475-85. doi: 10.1016/s0002-9440(10)62364-4.
- Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, Ohno N, Rietsch AM, Cialic R, et al.** Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J Exp Med.* 2014;211(8):1533-49. doi: 10.1084/jem.20132477.
- Yamazaki Y, Zhao N, Caulfield TR, Liu CC, Bu G.** Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies. *Nat Rev Neurol.* 2019;15(9):501-518. doi:10.1038/s41582-019-0228-7
- Yang CN, Shiao YJ, Shie FS, Guo BS, Chen PH, Cho CY, et al.** Mechanism mediating oligomeric A β clearance by



- naïve primary microglia. *Neurobiol Dis.* **2011**;42(3):221-30. doi: 10.1016/j.nbd.2011.01.005.
- Yang YM, Shang DS, Zhao WD, Fang WG, Chen YH.** Microglial TNF- α -dependent elevation of MHC class I expression on brain endothelium induced by amyloid-beta promotes T cell transendothelial migration. *Neurochem Res.* **2013**;38(11):2295-2304. doi:10.1007/s11064-013-1138-5
- Yellen G.** Fueling thought: Management of glycolysis and oxidative phosphorylation in neuronal metabolism. *J Cell Biol.* **2018**;217(7):2235-2246. doi:10.1083/jcb.201803152
- Yoon H, Walters G, Paulsen AR, Scarisbrick IA.** Astrocyte heterogeneity across the brain and spinal cord occurs developmentally, in adulthood and in response to demyelination. *PLoS One.* **2017**;12(7):e0180697. doi:10.1371/journal.pone.0180697
- Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, Huang SM, Iwata N, Saido TC, et al.** Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron.* **2007**;53(3):337-51. doi: 10.1016/j.neuron.2007.01.010. Erratum in: *Neuron.* 2007 Apr 19;54(2):343-4.
- Yu JT, Tan L, Hardy J.** Apolipoprotein E in Alzheimer's disease: an update. *Annu Rev Neurosci.* **2014**;37:79-100. doi: 10.1146/annurev-neuro-071013-014300.
- Yuan P, Condello C, Keene CD, Wang Y, Bird TD, Paul SM, et al.** TREM2 Haplodeficiency in Mice and Humans Impairs the Microglia Barrier Function Leading to Decreased Amyloid Compaction and Severe Axonal Dystrophy. *Neuron.* **2016**;90(4):724-39. doi: 10.1016/j.neuron.2016.05.003.
- Zamanian JL, Xu L, Foo LC, Nouri N, Zhou L, Giffard RG, Barres BA.** Genomic analysis of reactive astroglia. *J Neurosci.* **2012**;32(18):6391-410. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012.
- Zarbock A, Ley K.** Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *Am J Pathol.* **2008**;172(1):1-7. doi:10.2353/ajpath.2008.070502
- Zegarra-Valdivia JA, Santi A, Fernández de Sevilla ME, Nuñez A, Torres Aleman I.** Serum Insulin-Like Growth Factor I Deficiency Associates to Alzheimer's Disease Co-Morbidities. *J Alzheimers Dis.* **2019**;69(4):979-987. doi: 10.3233/JAD-190241.
- Zenaro E, Pietronigro E, Della Bianca V, Piacentino G, Marongiu L, Budui S, et al.** Neutrophils promote Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin. *Nat Med.* **2015**;21(8):880-6. doi: 10.1038/nm.3913.
- Zenaro E, Piacentino G, Constantin G.** The blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* **2017**;107:41-56. doi:10.1016/j.nbd.2016.07.007
- Zeisel A, Muñoz-Manchado AB, Codeluppi S, Lönnerberg P, La Manno G, Juréus A, et al.** Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science.* **2015**;347(6226):1138-42. doi: 10.1126/science.aaa1934.
- Zeppenfeld DM, Simon M, Haswell JD, D'Abreo D, Murchison C, Quinn JF, et al.** Association of Perivascular Localization of Aquaporin-4 With Cognition and Alzheimer Disease in Aging Brains. *JAMA Neurol.* **2017**;74(1):91-99. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.4370.
- Zerbinatti CV, Wahrle SE, Kim H, Cam JA, Bales K, Paul SM, et al.** Apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor-related protein facilitate intraneuronal Abeta42 accumulation in amyloid model mice. *J Biol Chem.* **2006**;281(47):36180-6. doi: 10.1074/jbc.M604436200.



- Zhang D, Hu X, Qian L, O'Callaghan JP, Hong JS. Astrogliosis in CNS pathologies: is there a role for microglia?. *Mol Neurobiol.* **2010**;41(2-3):232-241. doi:10.1007/s12035-010-8098-4
- Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain.* **2011a**;4:3. doi: 10.1186/1756-6606-4-3.
- Zhang Z, Zhang ZY, Schittenhelm J, Wu Y, Meyermann R, Schluesener HJ. Parenchymal accumulation of CD163+ macrophages/microglia in multiple sclerosis brains. *J Neuroimmunol.* **2011b**;237(1-2):73-79. doi:10.1016/j.jneuroim.2011.06.006
- Zhang K, Tian L, Liu L, Feng Y, Dong YB, Li B, et al. CXCL1 contributes to β -amyloid-induced transendothelial migration of monocytes in Alzheimer's disease. *PLoS One.* **2013**;8(8):e72744. doi: 10.1371/journal.pone.0072744.
- Zhang F, Jiang L. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat.* **2015**;11:243-256. doi:10.2147/NDT.S75546
- Zhang J, Liu Q. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein Cell.* **2015**;6(4):254-264. doi:10.1007/s13238-014-0131-3
- Zhang Y, Sloan SA, Clarke LE, Caneda C, Plaza CA, Blumenthal PD, et al. Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. *Neuron.* **2016**;89(1):37-53. doi: 10.1016/j.neuron.2015.11.013.
- Zhang C, Wang C, Li Y, Miwa T, Liu C, Cui W, et al. Complement C3a signaling facilitates skeletal muscle regeneration by regulating monocyte function and trafficking. *Nat Commun.* **2017**;8(1):2078. doi: 10.1038/s41467-017-01526-z.
- Zhou Y, Sun Y, Ma QH, Liu Y. Alzheimer's disease: amyloid-based pathogenesis and potential therapies. *Cell Stress.* **2018**;2(7):150-161. doi:10.15698
- Zhou Y, Song WM, Andhey PS, Swain A, Levy T, Miller KR, et al. Human and mouse single-nucleus transcriptomics reveal TREM2-dependent and TREM2-independent cellular responses in Alzheimer's disease. *Nat Med.* **2020**;26(1):131-142. doi: 10.1038/s41591-019-0695-9. Erratum in: *Nat Med.* 2020 Jun;26(6):981.
- Zhu Y, Nwabuisi-Heath E, Dumanis SB, Tai LM, Yu C, Rebeck GW, LaDu MJ. APOE genotype alters glial activation and loss of synaptic markers in mice. *Glia.* **2012**;60(4):559-69. doi: 10.1002/glia.22289.
- Zhu Y, Deng J, Nan ML, Zhang J, Okekunle A, Li JY, et al. The Interplay Between Pattern Recognition Receptors and Autophagy in Inflammation. *Adv Exp Med Biol.* **2019**;1209:79-108. doi: 10.1007/978-981-15-0606-2_6.
- Zhu K, Pieber M, Han J, Blomgren K, Zhang XM, Harris RA, Lund H. Absence of microglia or presence of peripherally-derived macrophages does not affect tau pathology in young or old hTau mice. *Glia.* **2020**;68(7):1466-1478. doi: 10.1002/glia.23794.
- Zimmer ER, Parent MJ, Souza DG, Leuzy A, Lecrux C, Kim HI, et al. [18 F]FDG PET signal is driven by astroglial glutamate transport. *Nat Neurosci.* **2017**;20(3):393-395. doi: 10.1038/nn.4492.
- Zolezzi JM, Bastias-Candia S, Santos MJ, Inestrosa NC. Alzheimer's disease: relevant molecular and physiopathological events affecting amyloid- β brain balance and the putative role of PPARs. *Front Aging Neurosci.* **2014**;6:176. doi:10.3389/fnagi.2014.00176



Zondler L, Müller K, Khalaji S, Bliedehäuser C, Ruf WP, Grozdanov V, et al. Peripheral monocytes are functionally altered and invade the CNS in ALS patients. *Acta Neuropathol.* **2016**;132(3):391-411. doi: 10.1007/s00401-016-1548-y.

Zuena AR, Casolini P, Lattanzi R, Maftai D. Chemokines in Alzheimer's Disease: New Insights Into Prokineticins, Chemokine-Like Proteins. *Front Pharmacol.* **2019**;10:622. doi:10.3389/fphar.2019.00622

Zulfiqar S, Garg P, Nieweg K. Contribution of astrocytes to metabolic dysfunction in the Alzheimer's disease brain. *Biol Chem.* **2019**;400(9):1113–1127. doi:10.1515/hsz-2019-0140

Zuroff L, Daley D, Black KL, Koronyo-Hamaoui M. Clearance of cerebral A β in Alzheimer's disease: reassessing the role of microglia and monocytes. *Cell Mol Life Sci.* **2017**;74(12):2167-2201. doi:10.1007/s00018-017-2463-7



J. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

A. INTRODUCCIÓN

Figura A.1. <i>Alois Alzheimer y Auguste Deter</i>	3
Figura A.2. Rasgos neuropatológicos de la EA	7
Figura A.3. Corte coronal de un hemiserebro humano sano (izquierda) y de un paciente de Alzheimer (derecha).....	8
Figura A.4. La acumulación de A β y Tau sigue patrones característicos y predecibles en la progresión de la patología de Alzheimer.....	9
Figura A.5. Clasificación de las placas amiloides	13
Figura A.6. Procesamiento de la Proteína Precursora Amiloide (APP)	15
Figura A.7. Esquema del gen MAPT y de las diferentes isoformas de la proteína Tau.....	19
Figura A.8. Alteraciones neurofibrilares en la enfermedad de Alzheimer	21
Figura A.9. Microglía dibujada por Pío del Río-Hortega.	23
Figura A.10. Microglía en la enfermedad de Alzheimer	25
Figura A.11. Papel de los astrocitos en la EA	31
Figura A.12. Macrófagos asociados al SNC en condiciones homeostáticas y en la EA	36
Figura A.13. Monocitos y CDM en la EA	38

C. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura C.1. Esquema de los complejos de la cadena de transporte de electrones..	57
Figura C.2. Parámetros claves de la respiración mitocondrial obtenidos en el analizador Seahorse XFp a partir de la OCR en condiciones basales, y tras el tratamiento con oligomicina, FCCP y rotenona/antimicina A	58
Figura C.3. Esquema del funcionamiento del FACS	65
Figura C.4. Representación esquemática del funcionamiento de una sonda Taqman	74
Figura C.5. Esquema de una TaqMan® Array Card (Formato 24)	78



Tabla C.1. Datos referentes a las muestras humanas de hipocampo y corteza frontal empleadas en el presente estudio 53

Tabla C.2. Relación de anticuerpos empleados en los estudios de inmunocitoquímica e inmunohistoquímica 63

Tabla C.3. Composición de los mix 1 y 2 empleados en la digestión del tejido de corteza e hipocampo, empleando los reactivos suministrados por Miltenyi Biotec 65

Tabla C.4. Relación de anticuerpos empleados para el aislamiento de astrocitos *ex vivo* a partir del cerebro de ratones APP mediante FACS 67

Tabla C.5. Relación de anticuerpos empleados para el aislamiento de microglía, CDM y linfocitos *ex vivo* del cerebro de modelos de la EA mediante FACS 68

Tabla C.6. Relación de los reactivos suministrados por Applied Biosystems 73

Tabla C.7. Relación de sondas Taqman utilizadas para humanos y ratón en el análisis de expresión de ARNm mediante RT-PCR 76

Tabla C.8. Condiciones de tiempo y temperatura de la RT-PCR en tiempo real para la cuantificación de expresión génica según el protocolo proporcionado por Applied Biosystems 76

Tabla C.9. Relación de las 24 sondas Taqman para muestras humanas incluidas en las Taqman® Array Cards prediseñadas 77

Tabla C.10. Polimorfismos del gen APOE detectados en este trabajo..... 79

Tabla C.11. Condiciones de tiempo y temperatura de la PCR en tiempo real para la identificación de los polimorfismos del gen APOE rs429358 y rs7412 79

Tabla C.12. Relación de anticuerpos utilizados en las técnicas de Western blot y Dot blot 82

D. RESULTADOS

1. Caracterización de la patología y la respuesta microglial en la corteza frontal de pacientes de Alzheimer

Figura D.1. En la corteza frontal de pacientes de Alzheimer se produce una acumulación mayor y más temprana de Aβ que en el hipocampo..... 88

Figura D.2. Aumento de la patología Tau con la progresión de la EA en hipocampo y corteza frontal 89

Figura D.3. Degeneración de neuronas GABAérgicas PV+ en el hipocampo y corteza frontal de pacientes de Alzheimer 90



Figura D.4. Degeneración selectiva de neuronas GABAérgicas PV+ en cultivos de neuronas primarias tratadas con neurosinaptosomas (NS) procedentes de ratones TAU 91

Figura D.5. Activación microglial en la corteza frontal de pacientes de Alzheimer 93

Figura D.6. Microglía en función del genotipo APOE en individuos Braak II y Braak V-VI 93

Figura D.7. Análisis de correlación de los diferentes *gene set score* microgliales con el nivel de Aβ monomérico 94

2. Respuesta astrogliar en la patología de Alzheimer

Figura D.8. Reactividad astrogliar en muestras *post mortem* de hipocampo de pacientes de Alzheimer 96

Figura D.9. Diferentes subpoblaciones de astrocitos en muestras *post mortem* de corteza temporal de pacientes de Alzheimer 97

Figura D.10. Reactividad astrogliar en función del genotipo APOE en individuos Braak II y Braak V-VI 98

Figura D.11. Análisis de correlación de la reactividad astrogliar con la neurodegeneración GABAérgica 99

Figura D.12. Análisis de correlación de la reactividad astrogliar con las patologías Aβ y Tau 100

Figura D.13. Reactividad astrogliar en muestras *post mortem* de corteza frontal de pacientes de Alzheimer 101

Figura D.14. Expresión de genes relacionados con la cascada del complemento en astrocitos aislados de diferentes modelos murinos de la EA 102

Figura D.15. Respuesta del complemento en muestras *post mortem* de hipocampo de pacientes de Alzheimer 103

Figura D.16. Análisis de correlación de los astrocitos reactivos y la respuesta del complemento 104

Figura D.17. Respuesta del complemento en función del genotipo APOE en individuos Braak II y Braak V-VI 105

Figura D.18. Análisis de correlación de la respuesta del complemento con la neurodegeneración GABAérgica 105

Figura D.19. Análisis de correlación de la repuesta del complemento con las patologías Aβ y Tau 106



Figura D.20. Respuesta del complemento en muestras *post mortem* de corteza frontal de pacientes de Alzheimer 107

Figura D.21. Disminución del metabolismo de astrocitos aislados de diferentes modelos murinos de la EA 108

Figura D.22. Estudio de la respiración mitocondrial y la glucólisis en astrocitos primarios tratados con S1 de modelos APP de 12 meses durante 24 horas 110

Figura D.23. Estudio de la respiración mitocondrial y la glucólisis en astrocitos primarios tratados con S1 de modelos APP de 12 meses durante 48 horas 111

Figura D.24. Disminución dependiente del tiempo de la respiración máxima en astrocitos primarios tratados con S1 de modelos APP de 12 meses 112

Figura D.25. Efecto del medio condicionado por astrocitos en la supervivencia neuronal 113

Figura D.26. Efecto de los componentes del medio condicionado por astrocitos, en función de su tamaño molecular, en la supervivencia neuronal 114

Figura D.27. Efectos sobre la supervivencia neuronal del medio condicionado por astrocitos en presencia de S1 de modelos WT, APP y TAU 115

Figura D.28. Efecto del medio condicionado por astrocitos en la supervivencia neuronal en ausencia de S1..... 117

Figura D.29. Efecto del medio condicionado por astrocitos en presencia de B27 y S1 de modelos WT, APP y TAU en la supervivencia neuronal 118

Figura D.30. Expresión de ARNm de las enzimas reguladoras de la glucólisis PFKM y PKM en el hipocampo de pacientes de EA 120

Figura D.31. Expresión relativa de las enzimas IDH3a, que cataliza la tercera etapa del ciclo de Krebs, e IDH2 en el hipocampo de pacientes de EA..... 122

Figura D.32. Expresión relativa de las enzimas implicadas en el metabolismo del glucógeno PYGB y PGM1 en el hipocampo de pacientes de EA..... 123

Figura D.33. Expresión relativa de la enzima CPT1A implicada en el transporte de ácidos grasos de cadena larga a la matriz mitocondrial, para una posterior β -oxidación, en el hipocampo de pacientes de EA..... 124

Figura D.34. Expresión relativa de la enzima HMGCR, principal punto de regulación de la síntesis de colesterol, en el hipocampo de pacientes de EA..... 125

Figura D.35. Análisis de correlación entre enzimas reguladoras de procesos metabólicos afectados en el hipocampo de pacientes de Alzheimer 125



3. Infiltración de células inmunes en el parénquima cerebral de pacientes de Alzheimer

Figura D.36. Aislamiento y caracterización fenotípica de microglía, CDM y linfocitos en corteza cerebral e hipocampo de modelos de EA, jóvenes y adultos 127

Figura D.37. Aislamiento mediante CD11b, CD45 y Ly6c de microglía, CDM y linfocitos en corteza cerebral e hipocampo de WT y modelos de EA 128

Figura D.38. Cuantificación del porcentaje de células infiltradas en corteza cerebral e hipocampo de modelos de EA, jóvenes y adultos 129

Figura D.39. Matriz de correlaciones de los niveles de expresión de múltiples genes asociados a la microglía y/o CDM en muestras de hipocampo humanos *post mortem* 130

Figura D.40. Análisis de componentes principales y *clustering* de múltiples genes asociados a la microglía y/o CDM en muestras de hipocampo *post mortem* 131

Figura D.41. Expresión relativa de los genes microgliales y de CDM analizados, clasificados mediante análisis de clúster, con la progresión de la patología de Alzheimer en muestras de hipocampo *post mortem* 132

Figura D.42. Expresión de ARNm de diferentes citoquinas quimiotácticas y de receptores de dichas quimioquinas en muestras hipocampales humanas 134

Figura D.43. Expresión de ARNm de genes de CDM en muestras *post mortem* de hipocampo mediante Taqman® Array Cards 135

Figura D.44. Inmunohistoquímica con los anticuerpos CD163 y OC en muestras *post mortem* de hipocampo de individuos sin patología de Alzheimer 137

Figura D.45. Inmunohistoquímica para CD163, OC e IBA1 en muestras *post mortem* de hipocampo de pacientes de Alzheimer 138

Figura D.46. Cuantificación de la carga de CD163, IBA1 y Aβ extracelular mediante inmunohistoquímica en muestras *post mortem* de hipocampo de individuos Braak II y Braak V-VI 139

Figura D.47. Estudio del perfil de expresión de MRC1 y de su distribución en el hipocampo de individuos Braak II y Braak VI 140

Figura D.48. Clasificación mediante análisis de clúster de los individuos en función de la expresión del *gene set score* de CDM 142

Figura D.49. Ausencia de relación entre la infiltración de CDM y aspectos clínicos 143

Figura D.50. Aumento de Aβ, Tau total y formas fosforiladas de Tau en el hipocampo de pacientes de Alzheimer 144



Figura D.51. Aumento de las patologías A β y Tau en los individuos con infiltración de CDM 145

Figura D.52. La infiltración de CDM va acompañada de un cambio en el fenotipo microglial 145

Figura D.53. La infiltración de CDM va acompañada de un aumento en la reactividad astrogliar y la respuesta del sistema del complemento..... 146

Figura D.54. Disminución de la glucólisis, ciclo de Krebs, metabolismo del glucógeno y síntesis de colesterol en los individuos con infiltración de CDM 147

Figura D.55. Asociación entre la infiltración de CDM y la unidad neurovascular 148

Figura D.56. Infiltración paralela de CDM y linfocitos CD3+..... 148

Figura D.57. Posible papel proinflamatorio y citotóxico de las CDM en el parénquima hipocampal 149

Figura D.58. Importante neurodegeneración GABAérgica en los individuos con infiltración de CDM 149

Figura D.59. Matriz de correlaciones entre el *gene set score* de CDM y otros aspectos importantes de la patología de Alzheimer en muestras humanas de hipocampo 150

Figura D.60. Infiltración de CDM en muestras *post mortem* de corteza frontal de pacientes de EA 152

Figura D.61. Aumento de la expresión de genes de CDM en múltiples regiones cerebrales en pacientes Braak V-VI respecto a controles 153

4. Caracterización de subpoblaciones o estados de astrocitos y microglía en pacientes de Alzheimer mediante inmunohistoquímica fluorescente múltiple

Figura D.62. Esquema del procedimiento de inmunohistoquímica fluorescente múltiple 156

Figura D.63. El daño en el tejido después de los ocho ciclos de inmunohistoquímica fluorescente múltiple es muy limitado 160

Figura D.64. El marcaje de las proteínas neuronales HuC/HuD permite definir las seis capas corticales 161

Figura D.65. Imágenes representativas de los 17 marcadores analizados en una misma zona de la capa V de la corteza temporal de un individuo control 163

Figura D.66. Imágenes representativas de los 17 marcadores analizados en una misma zona de la capa V de la corteza temporal de un paciente de EA 164



Figura D.67. Imágenes obtenidas tras el alineamiento de marcadores en la capa V de la corteza temporal de un individuo control y un paciente de Alzheimer 165

Tabla D.1. Relación de anticuerpos utilizados en la inmunohistoquímica fluorescente múltiple, ordenados en función del ciclo en que se han empleado 159

E. DISCUSIÓN

Figura E.1. Disminución en la vía de señalización de la insulina en astrocitos aislados de modelos murinos de la EA..... 189

Código seguro de Verificación : GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a | Puede verificar la integridad de este documento en la siguiente dirección : <https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



K. ABREVIATURAS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000059958

CSV

GEISER-8598-9009-566a-4890-b4af-d14e-6f25-b44a

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

23/11/2020 10:13:34 Horario peninsular



Aβ: péptido β-amiloide	BCR: <i>B cell receptors</i>
ACAA2: <i>3-ketoacyl-CoA thiolase</i>	BHE: barrera hematoencefálica
ACSA2: <i>astrocyte cell surface antigen 2</i>	BSA: albúmina de suero bovina (<i>bovine serum albumin</i>)
ACSL6: <i>long-chain-fatty-acid--CoA ligase 6</i>	CAA: angiopatía amiloide cerebral (<i>cerebral amyloid angiopathy</i>).
ACSS1: <i>acetyl-coenzyme A synthetase 2-like</i>	Cbr2: <i>carbonyl reductase 2</i>
ACT: α1-antichimiotripsina	CCL: <i>C-C motif chemokine ligand</i>
AD: Alzheimer's disease	CCR: <i>C-C motif chemokine receptor</i>
ADAM: <i>A desintegrin and metalloprotease</i>	CD: células dendríticas
ADN: ácido desoxirribonucleico	CDc: CD convencionales
ADNc: ADN complementario	CDc1: CDc tipo 1
ADNg: ADN genómico	CDc2: CDc tipo 2
AF: Alexa Fluor	Cdk5: <i>Cyclin dependent kinase 5</i>
ALDH1L1: <i>Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member L1</i>	CDM: células derivadas de monocitos
ALDOC: <i>Fructose-bisphosphate aldolase C</i>	CDp: CD plasmacitoides
ANOVA: <i>analysis of variance</i>	CDR: clasificación en la escala de demencia clínica (<i>Clinical Dementia Rating</i>)
APC: <i>allophycocyanin</i>	CD36: receptor CD36
APOE: apolipoproteína E	CD11b: <i>integrin subunit alpha M</i> (o ITGAM)
APOJ: apolipoproteína J o Clusterina	CD11c: <i>integrin subunit alpha X</i> (o ITGAX)
APP: ratón transgénico APP _{751SL}	CD45: <i>protein tyrosine phosphatase receptor type C</i> (o PTPRC)
APP: proteína precursora de amiloide	CD68: molécula CD68
AQP: acuaporina	CD74: molécula CD74
AQP-4: acuaporina-4	CD163: receptor tipo <i>scavenger</i> CD163
ARN: ácido ribonucleico	CLEC7A: <i>C-type lectin domain containing 7A</i>
ARNm: ARN mensajero	CNS: <i>central nervous system</i>
BACE-1: <i>β-site APP cleaving enzyme 1</i>	
BBB: <i>blood-brain barrier</i>	



CPT1A: carnitina palmitoiltransferasa 1 A	FRET: Transmisión de Energía de Resonancia (<i>Fluorescent Resonance Energy Transfer</i>)
CSF1: <i>colony stimulating factor 1</i>	F13A1: <i>coagulation factor XIII A chain</i>
CSF1R: <i>colony stimulating factor 1 receptor</i>	GFAP: proteína ácida fibrilar glial (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)
Cy: cianina (<i>Cyanine</i>)	GSK-3β: <i>glycogen synthase kinase 3</i>
CXCL16: <i>C-X-C motif chemokine ligand 16</i>	GWAS: estudios de asociación de genoma completo (<i>Genome wide association studies</i>)
CX3CR1: <i>C-X3-C motif chemokine receptor 1</i>	HADHB: <i>Trifunctional enzyme subunit beta</i>
DAM: <i>disease-associated microglia</i>	HAM: <i>human Alzheimer's microglía</i>
DAMPs: <i>damage associated molecular patterns</i>	HBSS: <i>Hanks' Balanced Salt solution</i>
DEPC: dietilpirocarbonato	HEPES: <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
DMT2: diabetes mellitus tipo 2	HLA-DR: <i>major histocompatibility complex, class II, DR</i>
DNA: <i>deoxyribonucleic acid</i>	HMGCR: 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa
EA: enfermedad de Alzheimer	IBA1: <i>ionized calcium binding adapater molecule (o AIF1; allograft inflammatory factor 1)</i>
ECAR: velocidad de acidificación extracelular (<i>extracellular acidification rate</i>)	IDE: enzima degradadora de insulina
ECE: enzima convertidora de endotelina	IDH2: isocitrato deshidrogenasa isoforma 2
FACS: clasificación de células activada por fluorescencia (<i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i>)	IDH3a: subunidad alfa de la isocitrato deshidrogenasa isoforma 3
FCCP: carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (<i>carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone</i>)	IFITM2: <i>interferon induced transmembrane protein 2</i>
FcRs: receptores Fc	IFITM3: <i>interferon induced transmembrane protein 3</i>
FDG: fluorodesoxiglucosa F-18	IFN-γ: Interferón- γ
FITC: <i>Fluorescein isothiocyanate</i>	
FN1: <i>fibronectin 1</i>	



IGF-I: factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (<i>insulin-like growth factor I</i>)	MMSE: examen del estado mental (<i>Mini-Mental State Examination</i>)
Ig: inmunoglobulina	MoCA: <i>Montreal Cognitive Assessment</i>
IL: interleuquina	MRC1: <i>mannose receptor C-type 1</i>
LCR: líquido cefalorraquídeo	MSR1: <i>macrophage scavenger receptor 1</i>
LGALS3: <i>galectin 3</i>	Ms4a7: <i>membrane spanning 4-domains A7</i>
LILRB2: <i>leukocyte immunoglobulin like receptor B2</i>	NDS: suero normal de burro (<i>normal donkey serum</i>)
LRP: receptores de lipoproteínas	NEP: neprelisina
LRP1: <i>low-density lipoprotein receptor related protein-1</i>	NET: <i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
LTD: depresión a largo plazo	NFT: ovillos neurofibrilares intraneuronales de la proteína Tau hiperfosforilada (<i>Neurofibrillary tangles</i>)
LTP: potenciación a largo plazo	NPC2: <i>NPC intracellular cholesterol transporter 2</i>
Lyve1: <i>lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1</i>	NPY: neuropéptido Y
MAPs: proteínas asociadas a microtúbulos (<i>Microtubule associated proteins</i>)	NR4A1: <i>nuclear receptor subfamily 4 group A member 1</i>
MC < 5.000 Da: medio condicionado con moléculas de masa inferior a 5.000 Da	NS: neurosinaptosomas (<i>neurosynaptosomes</i>)
MC > 5.000 Da: medio condicionado con moléculas de masa superior a 5.000 Da	NT: filamentos de neuropilo (<i>neuropil threads</i>)
MCI: deterioro cognitivo leve (<i>mild cognitive impairment</i>)	OCR: velocidad de consumo de oxígeno (<i>oxygen consumption rate</i>)
MDC: <i>monocyte-derived cells</i>	PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida
MDH1B: <i>Putative malate dehydrogenase 1B</i>	PAMPs: <i>pathogen-associated molecular patterns</i>
MHC I y II: Complejo Mayor de Histocompatibilidad clases I y II (<i>major histocompatibility complex</i>)	PBS: tampón fosfato salino
MKI67: <i>marker of proliferation Ki-67</i>	PCR: reacción en cadena de la polimerasa
MMPs: <i>SR</i>	PE: <i>R-phycoerythrin</i>



PET: tomografía por emisión de positrones	Sj: <i>Gene Set Score</i>
PFA: paraformaldehído	SNC: sistema nervioso central
PFKM: isoforma muscular de la fosfofructoquinasa-6	SNP: polimorfismo de nucleótido único (<i>single-nucleotide polymorphism</i>)
Pf4: <i>platelet factor 4</i>	SST: somatoestatina
PGM1: fosfoglucomutasa-1	Stab1: <i>stabilin 1</i>
PILRA: <i>paired immunoglobulin like type 2 receptor alpha</i>	S1: fracción proteica soluble
PKM: isoformas M1 y M2 de piruvato quinasa	TAGLN2: <i>transgelin 2</i>
PRRs: <i>Pattern recognition receptors</i>	TAU: ratón transgénico TAU P301S (Línea PS19)
PSEN: presenilina	TBS: Tris <i>buffer</i> salino
PU.1: factor de transcripción SPI1	Tc: T citotóxicos
PV: parvalbúmina	TCR: <i>T cell receptor</i>
PYGB: isoforma cerebral de la glucógeno fosforilasa	t-cyIF: inmunofluorescencia cíclica basada en tejido (<i>tissue-based cyclic immunofluorescence</i>)
P2RX4: <i>purinergic receptor P2X 4</i>	TGF-β: <i>Transforming growth factor-β</i>
P2RY12: <i>purinergic receptor P2Y12</i>	Th: T helpers o colaboradores
qPCR: PCR cuantitativa	TLR: toll-like receptors
RAGE: <i>receptor for advanced glycation end products</i>	TMEM119: <i>transmembrane protein 119</i>
RIN: Número de Integridad del ARN (<i>RNA Integrity Number</i>)	TNF-α: Factor de Necrosis Tumoral-α
RNA: <i>ribonucleic acid</i>	Treg: T reguladores
RNA-seq: <i>RNA sequencing</i>	TREM2: <i>triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>
RT-qPCR: PCR cuantitativa realizada a partir de ADNc	VAT: <i>Visual Assessment of cluster Tendency</i>
SASP: fenotipo secretor asociado a senescencia (<i>Senescence-Associated Secretory Phenotype</i>)	VIM: Vimentina
sAPPα: APP soluble α	WCNA: <i>Weighted Co-Expression Network Analysis</i>
sAPPβ: APP soluble β	WT: ratones no transgénicos (<i>wild type</i>)
SDS: dodecilsulfato sódico	

