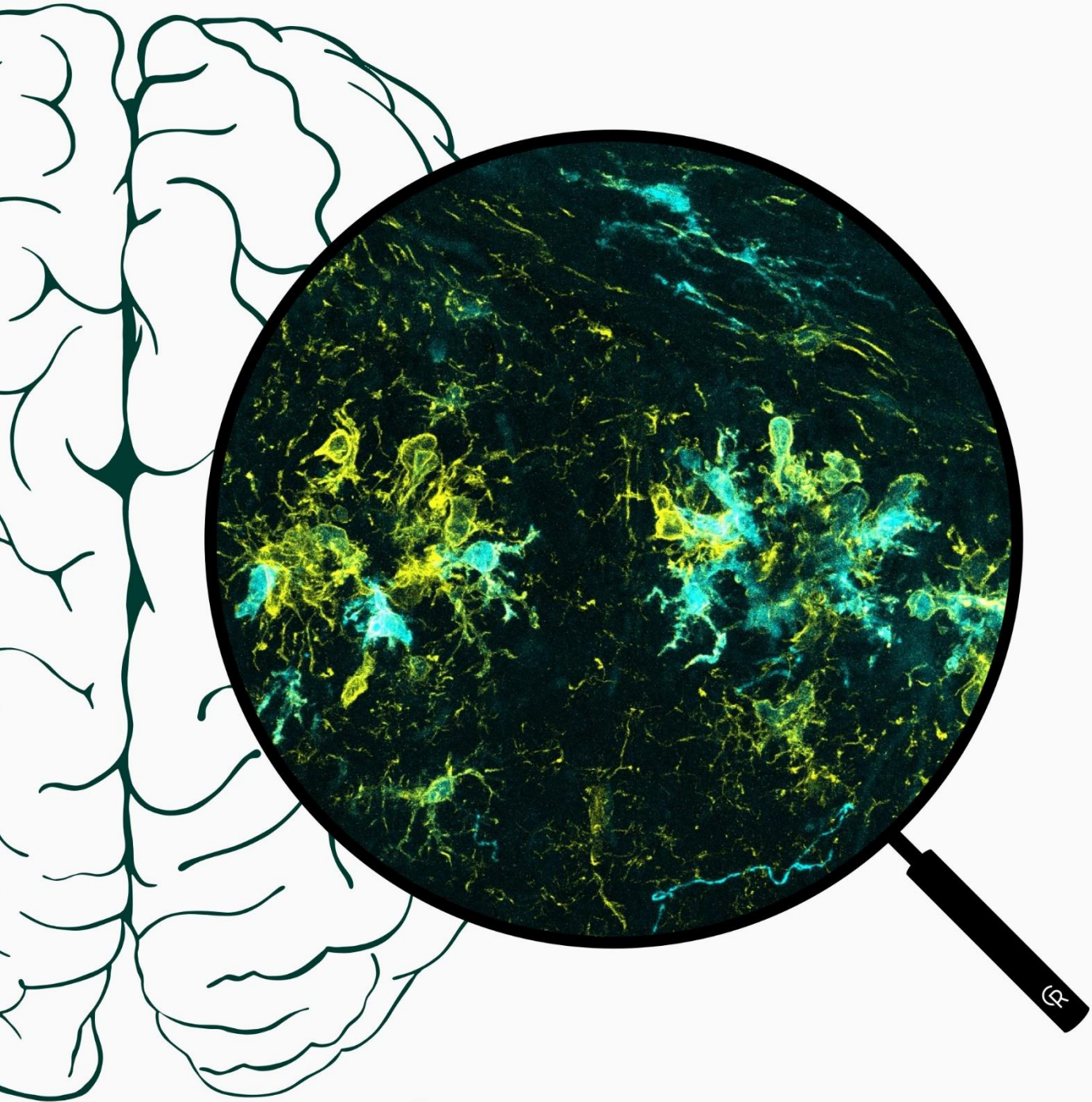


TESIS DOCTORAL

# Variaciones de la respuesta Microglial según el contexto patológico en la Enfermedad de Alzheimer

Carmen Romero Molina



SEVILLA, 2021

Dpto. Bioquímica y Biología Molecular  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Sevilla



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



**Variaciones de la respuesta Microglial  
según el contexto patológico  
en la Enfermedad de Alzheimer**

**Memoria presentada por la Graduada Carmen Romero Molina,  
para optar al Grado de Doctora por la Universidad de Sevilla**

Sevilla, 5 de Febrero de 2021





**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**  
**Facultad de Farmacia**  
C / Profesor García González, 2.  
41012 Sevilla (España)  
Teléfono: 954 55 67 70



**Dr. Javier Vitorica Ferrández** y **Dra. M<sup>a</sup> Luisa Vizuete Chacón**, ambos Catedráticos de Universidad asociados al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla,

**INFORMAN:**

Que Dña. Carmen Romero Molina ha realizado, bajo nuestra dirección, el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral, titulada “**Variaciones de la respuesta microglial según el contexto patológico en la Enfermedad de Alzheimer**”. Considerando que constituye trabajo de tesis doctoral, autorizamos su presentación para optar al grado de Doctor.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, firmamos el presente informe en Sevilla, a 5 de Febrero de 2021.

**Fdo. Javier Vitorica Ferrández**

**Fdo. María Luisa Vizuete Chacón**

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

---

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**  
**Facultad de Farmacia**  
C / Profesor García González, 2.  
41012 Sevilla (España)  
Teléfono: 954 55 67 70



**Dr. José Luis Venero Recio**, Catedrático de Universidad y Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla,

**INFORMA:**

Que Dña. Carmen Romero Molina ha realizado el trabajo experimental que ha llevado a la redacción de la presente memoria de Tesis Doctoral bajo la dirección del Dr. Javier Vitorica Ferrández y la Dra. María Luisa Vizueté Chacón.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente informe en Sevilla, a 5 de Febrero de 2021.



**Fdo. Dr. José Luis Venero Recio**



Durante la realización de la presente Tesis Doctoral, Dña. Carmen Romero Molina ha disfrutado de un contrato – beca predoctoral de la Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno y, posteriormente, de un contrato – beca predoctoral de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación y Formación Profesional de España. Además, ha realizado una estancia internacional predoctoral en el Imperial College of London, financiada por la Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno, y una estancia internacional predoctoral en el Massachusetts General Hospital – Harvard University, financiada por una Beca de Excelencia IMFAHE – Universidad de Sevilla.

Durante la realización de la presente Tesis Doctoral, se han publicado los siguientes artículos científicos en revistas internacionales, una revisión bibliográfica en una revista nacional y dos contribuciones divulgativas:

**1. Romero-Molina, C.**, Navarro V., Sanchez-Varo, R., Jimenez, S., Fernandez-Valenzuela, J.J., Sanchez-Mico, M.V., Muñoz-Castro, C., Gutierrez, A.#, Vitorica, J.#, Vizuet M.# (2018). Distinct Microglial Responses in Two Transgenic Murine Models of TAU Pathology. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 421. Doi: 10.3389/fncel.2018.00421.

**2.** March-Diaz, R.\*, Lara-Ureña, N.\*, **Romero-Molina, C.\***, Heras-Garvin, A.\*, Ortega-de San Luis, C.\*, Alvarez-Vergara, M.I., Sanchez-Garcia, M.A., Sanchez-Mejias, E., Davila, J.C., Rosales-Nieves, A.E., Forja, C., Navarro, V., Gomez-Arboledas, A., Sanchez-Mico, M.V., Viehweger, A., Gerpe, A., Hodson, E.J., Vizuet, M., Ratcliffe, P.J., Bishop, T., Serrano-Pozo, A., Lopez-Barneo, J., Berra, E., Gutierrez, A., Vitorica, J.#, Pascual A.#. Hypoxia compromises the mitochondrial metabolism of Alzheimer's disease microglia via HIF1. *Nature Aging* (aceptado).

**3.** Sanchez-Mico, M., Jimenez, S., Gomez-Arboledas, A., Muñoz-Castro, C., **Romero-Molina, C.**, Navarro, V., Sanchez-Mejias, E., Nuñez-Diaz, C., Sanchez-Varo, R., Galea, E., Davila, J., Vizuet, M., Gutierrez, A., Vitorica, J. Amyloid- $\beta$  impairs the phagocytosis of dystrophic synapses by astrocytes in Alzheimer's Disease. *Glia*, 69(4), 997-1011. Doi: 10.1002/glia.23943. Epub 2020 Dec 7.

**4.** Mirzaei, N., Mota, B. C., Birch, A. M., Davis, N., **Romero-Molina, C.**, Katsouri, L., Palmer, E., Golbano, A., Riggall, L. J., Nagy, I., Tyacke, R., Nutt, D. J., Sastre, M. (2021). Imidazoline ligand BU224 reverses cognitive deficits, reduces microgliosis and enhances synaptic connectivity in a mouse model of Alzheimer's disease. *British journal of pharmacology*, 178(3), 654–671. Doi: 10.1111/bph.15312.

5. Ries, M., Yanez-Lopez, M., Watts, H., Chau, TW., Iqbal, S.J., Baxan, N., **Romero-Molina, C.**, Donat, C., Hernandez-Mir, G., d'Amati, A., Gentleman, S., Solito, E., Sastre, M. ANXA1 restores cerebrovascular integrity, increases amyloid degradation and improves memory loss at early stages of Alzheimer's disease. *Brain* (aceptado).

6. Muñoz-Castro, C.\*, **Romero-Molina C.\***, Vitorica J. Redirigiendo las estrategias terapéuticas en la Enfermedad de Alzheimer. *Revista Española de Ciencias Farmacéuticas*. 2020;1(1):18-33.

7. Wasalathanthri, N.D., Zaidi, S.S., Mahrt, E., Srivastava, S., Yu, K.H., Johansson, K., Li, F., Jimenez, M., Lo, C., Allareddy, V., **Romero-Molina, C.**, Mosegaard, S., Heaton, S. M., Park, J. J., Bacon, C. D., Yu, S., Polat, E. O., Wasalathanthri, D., Wang, W., & Agarwal, D. (2019). Challenging transitions. *Science* (New York, N.Y.), 363(6422), 24–26. Doi: 10.1126/science.aaw2641. *Todos los autores contribuyeron igualmente.*

8. Segal, L., Agarwal, D., Isaacson, K. J., Oehmke, T. B., Kumar, B., Chen, J. S., Cusimano, J. M., Negi, S., Tiper, I., Bakermans, A. J., Jensen, M. M., Sanganyado, E., Zaidi, S. S., **Romero-Molina, C.**, Martínez, S. E., Anderson, S. M., Santos, G. M., De Lella Ezcurra, A. L., Farragher, J., Sharma, V., ... Kerman, B. E. (2018). NextGen Voices: Quality mentoring. *Science* (New York, N.Y.), 362(6410), 22–24. Doi: 10.1126/science.aav5914. *Todos los autores contribuyeron igualmente.*

# Índice



<b>1. Enfermedad de Alzheimer</b> .....	<b>1</b>
1.1. Tipos de Alzheimer .....	3
1.2. Rasgos neuropatológicos .....	6
<b>2. Abeta y patología amiloide</b> .....	<b>7</b>
2.1. Síntesis de Abeta .....	7
2.1.1. Proteína precursora amiloide (APP) y su procesamiento .....	7
2.1.2. Complejo $\gamma$ -secretasa .....	9
2.2. Degradación/eliminación de Abeta .....	9
2.3. Agregación del péptido Abeta: oligomerización y formación de placas .....	10
2.4. Abeta intracelular .....	12
<b>3. Proteína Tau y patología neurofibrilar</b> .....	<b>13</b>
3.1. Estructura y Función de Tau.....	13
3.2. Fosforilación de Tau.....	14
3.3. Tau soluble hiperfosforilado.....	15
3.4. Ovillos neurofibrilares de Tau .....	17
<b>4. Patología neurítica, pérdida neuronal y sináptica</b> .....	<b>18</b>
4.1. Disminución de la densidad sináptica .....	18
4.2. Pérdida neuronal.....	18
4.3. Patología neurítica.....	19
<b>5. Patología vascular</b> .....	<b>19</b>
<b>6. Neuroinflamación y respuesta glial</b> .....	<b>19</b>
6.1. Microglía.....	20
6.1.1. Funciones fisiológicas.....	21
6.1.2. Metabolismo microglial.....	23
6.1.3. Papel de la microglía en la patología de la EA.....	23
6.1.3.1. Perfil genético en la activación microglial.....	24
6.1.3.2. Actividad microglial en respuesta a las patologías Abeta y Tau .....	25
6.2. Astrocitos.....	27
6.2.1. Funciones fisiológicas.....	27

6.2.2. Papel de los astrocitos en la patología de la EA.....	28
6.3. Interacción microglía-astrocitos en la respuesta inmune innata .....	30
6.4. Mediadores de la respuesta inflamatoria.....	30
6.5. Células inmunes asociadas al SNC.....	30
6.5.1. Macrófagos asociados al SNC.....	31
6.5.2. Monocitos y células derivadas de monocitos (CDM) .....	32
6.5.3. Células dendríticas.....	32
6.5.4. Linfocitos .....	32

---

## **B. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS** **33**

---

## **C. MATERIALES Y MÉTODOS** **39**

<b>1. Muestras humanas postmortem.....</b>	<b>41</b>
<b>2. Animales de experimentación.....</b>	<b>42</b>
2.1. Líneas transgénicas utilizadas .....	42
2.2. Genotipado de los animales.....	43
2.3. Tratamientos de los animales de experimentación.....	44
2.3.1. Administración de Tamoxifeno para la activación del sistema Cre-LoxP .....	44
2.3.2. Cámara de hipoxia para animales.....	45
2.3.3. Inyección de EdU.....	46
2.4. Obtención de muestras .....	46
<b>3. Cultivos celulares.....</b>	<b>46</b>
3.1. Líneas celulares.....	46
3.1.1. Línea microglial BV2.....	47
3.1.2. Línea neuronal SH-Tau.....	47
3.2. Cultivo de microglía y astrocitos primarios .....	47
3.2.1. Aislamiento de microglía .....	47
3.2.2. Silenciamiento de Trem2 en cultivos de microglía aislada.....	48
3.3. Cámara de hipoxia para cultivos celulares.....	48

<b>4. Aislamiento de microglía <i>ex vivo</i> del tejido cerebral de ratones modelo de la EA</b> .....	49
4.1. Homogenización y gradiente de Percoll para análisis de microglía.....	49
4.2. Homogenización y gradiente de Percoll para aislamiento de microglía destinada a estudios transcriptómicos .....	49
4.3. Homogenización y gradiente de separación mediante el protocolo Miltenyi .....	50
4.4. Análisis y Separación Celular – <i>Fluorescence-activated Cell Sorting</i> (FACS).....	51
4.4.1. Fundamento .....	51
4.4.2. Procedimiento .....	52
<b>5. Aislamiento de fracciones solubles y celulares</b> .....	53
<b>6. Preparación de Abeta monomérico y oligomérico</b> .....	54
<b>7. Ensayo de toxicidad en cultivos celulares, mediante citometría de flujo</b> .....	54
<b>8. Ensayo de estimulación de cultivos celulares</b> .....	54
<b>9. Aislamiento de ARN y proteínas</b> .....	55
9.1. Aislamiento de ARN .....	55
9.2. Aislamiento de proteínas totales .....	56
<b>10. Cuantificación de proteínas: método de Lowry</b> .....	57
<b>11. Western-blot</b> .....	57
11.1. Fundamento.....	57
11.2. Procedimiento.....	58
<b>12. Electroforesis e inmunoensayo en capilar</b> .....	60
<b>13. Retrotranscripción</b> .....	61
<b>14. q-PCR en tiempo real</b> .....	62
14.1. Fundamento.....	62
14.2. Procedimiento.....	64
<b>15. Estudio transcriptómico (Arrays)</b> .....	66

<b>16. Estudios Inmunohistoquímicos</b> .....	67
16.1. Microscopía óptica convencional.....	69
16.2. Inmunofluorescencia.....	69
16.3. Anticuerpos utilizados .....	70
16.4. Cuantificaciones inmunohistoquímicas .....	71
<b>17. Microscopía electrónica de transmisión</b> .....	71
<b>18. Ensayo de medida de los niveles de ATP</b> .....	71
<b>19. Ensayo de proliferación EdU</b> .....	72
19.1. Fundamento.....	73
19.2. Procedimiento.....	74
<b>20. Ensayo de metabolismo Seahorse</b> .....	75
20.1. Fundamento.....	75
20.2. Procedimiento.....	76
<b>21. Análisis estadístico</b> .....	77

## D. RESULTADOS

79

<b>1. Dualidad fenotípica microglial: caracterización diferencial de la respuesta microglial en dos modelos murinos de tauopatía</b> .....	81
1.1. Fenotipo microglial en el hipocampo de modelos murinos de tauopatía.....	81
1.2. Expresión y progresión de la patología Tau en los modelos murinos de tauopatía.....	84
1.3. Evaluación de la toxicidad de las especies solubles fosforiladas de Tau sobre la microglía ...	86
1.4. Caracterización de las formas agregadas de Tau en los modelos murinos de tauopatía y su toxicidad sobre la microglía .....	89
<b>2. Activación microglial: perfil transcriptómico de la microglía activa en respuesta a patología Abeta y Tau <i>in vivo</i></b> .....	92
2.1. Perfil de expresión génica durante la activación microglial.....	92
2.2. La microglía activa presenta un metabolismo oxidativo, dependiente de Trem2 .....	98
2.2.1. La microglía activa presenta elongación mitocondrial .....	101
2.2.2. El tratamiento con oligómeros de Abeta aumenta la capacidad respiratoria máxima <i>in vitro</i> .....	102
2.2.3. El incremento del metabolismo oxidativo podría estar mediado vía mTOR.....	104

2.3. Diferencias transcripcionales específicas en respuesta a las patologías Abeta y Tau .....	109
<b>3. Disfuncionalidad microglial por disminución de la disponibilidad de oxígeno .....</b>	<b>112</b>
3.1. Los pacientes con EA expresan marcadores de respuesta a hipoxia.....	112
3.2. La baja disponibilidad de oxígeno impide la activación microglial <i>in vitro</i> .....	115
3.3. La baja disponibilidad de oxígeno disminuye la microglía asociada a placa <i>in vivo</i> .....	116
3.4. La baja disponibilidad de oxígeno mejora la patología Tau <i>in vivo</i> .....	117
<b>4. Disfuncionalidad microglial por ablación genética de CSF1R.....</b>	<b>127</b>
4.1. Depleción microglial aguda y capacidad de repoblación.....	127
4.1.1. Depleción y repoblación microglial en animales jóvenes.....	128
4.1.2. Depleción y repoblación microglial en animales envejecidos.....	137
4.1.3. Estudio de la depleción y repoblación tras varios ciclos de tratamientos.....	141
4.2. Modelos de depleción microglial crónica .....	142
4.3. Efecto de la depleción microglial en presencia de patología Abeta .....	151
4.3.1. Efectos de la depleción microglial en estadios iniciales de la patología Abeta.....	151
4.3.2. Efectos de la depleción microglial en estadios avanzados de la patología Abeta.....	156

## **E. DISCUSIÓN** **163**

---

<b>1. Reactividad y/o degeneración microglial .....</b>	<b>166</b>
<b>2. Perfil transcriptómico y funcional de la microglía activa.....</b>	<b>172</b>
<b>3. Papel del metabolismo oxidativo en la activación microglial.....</b>	<b>177</b>
3.1. Trem2 es esencial para la inducción del metabolismo oxidativo y la activación microglial .	181
3.2. Balance OXPPOS/HIF en la microglía asociada a placa.....	182
<b>4. Consecuencias de la disfunción microglial por privación de oxígeno .....</b>	<b>185</b>
<b>5. Depleción microglial como modelo de disfunción microglial .....</b>	<b>190</b>
<b>6. Consideraciones finales .....</b>	<b>200</b>

<b>F. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS</b>	<b>203</b>
<hr/>	
<b>G. SUMMARY</b>	<b>207</b>
<hr/>	
<b>H. ANEXO: Tablas Suplementarias</b>	<b>217</b>
<hr/>	
<b>I. ABREVIATURAS</b>	<b>227</b>
<hr/>	
<b>J. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>233</b>
<hr/>	



# Índice de Figuras y Tablas



## **A. INTRODUCCIÓN** **1**

---

Figura A.1. Dinámica de los biomarcadores en la patología de Alzheimer .....	2
Figura A.2. Factores de riesgo genéticos de la EA y sus funciones fisiológicas generales .....	5
Figura A.3. Esquema comparativo de un hemiserebro humano sano y de un paciente de Alzheimer.....	6
Figura A.4. Procesamiento de la Proteína Precursora Amiloide (APP) .....	8
Figura A.5. Agregación del péptido Abeta.....	10
Figura A.6. Clasificación de las placas amiloides.....	12
Figura A.7. Gen MAPT e isoformas de Tau .....	14
Figura A.8. Agregación y propagación de Tau .....	16
Figura A.9. Agregados intracelulares de Tau .....	17
Figura A.10. Funciones fisiológicas microgliales .....	22
Figura A.11. Mecanismo secuencial de activación microglial DAM.....	25
Figura A.12. Activación microglial en modelos de patología de Alzheimer .....	26
Figura A.13. Activación astrogial .....	29
Figura A.14. Macrófagos asociados al SNC .....	31

## **C. MATERIALES Y MÉTODOS** **39**

---

Figura C.1. Representación esquemática del funcionamiento del sistema Cre-LoxP.....	44
Figura C.2. Esquema del tratamiento de los animales CX3CSF1R con tamoxifeno agudo y crónico .....	45
Figura C.3. Esquema del funcionamiento de la separación celular FACS.....	52
Figura C.4. Inmunoblot capilar en el dispositivo Jess (Bio-Techne).....	61
Figura C.5. Esquema del funcionamiento de una sonda Taqman.....	64
Figura C.6. Anatomía de la formación hipocampal a distintos niveles rostro-caudales .....	68
Figura C.7. Detección del agente intercalante de ADN EdU y comparación con el BrdU .....	74
Figura C.8. Cuantificación ex vivo de microglía proliferativa .....	75
Figura C.9. Esquema de los complejos de la cadena de transporte de electrones y los inhibidores aplicados en los ensayos de Seahorse.....	75
Figura C.10. Parámetros clave de la respiración mitocondrial obtenidos a partir de la OCR.....	76
Tabla C.1. Datos de las muestras humanas analizadas.....	41

Tabla C.2. Cebadores, cantidad de ADN y programa de PCR utilizados para genotipar las diferentes líneas de animales transgénicos .....	43
Tabla C.3. Relación de anticuerpos utilizados en Western-Blot.....	60
Tabla C.4. Relación de los reactivos para la retrotranscripción.....	62
Tabla C.5. Secuencias de los cebadores para RT-PCR.....	65
Tabla C.6. Sondas Taqman para RT-PCR.....	66
Tabla C.7. Relación de anticuerpos utilizados para histología .....	71

## D. RESULTADOS

79

<b>1. Dualidad fenotípica microglial: caracterización diferencial de la respuesta microglial en dos modelos murinos de tauopatía.....</b>	<b>81</b>
Figura D.1. Respuesta microglial en los modelos APP, TAU P301S y ThyTau22 .....	82
Figura D.2. Fenotipo microglial en el hipocampo de los ratones WT, ThyTau22 y TAU P301S.....	83
Figura D.3. La expresión y fosforilación de Tau es mayor en el modelo TAU P301S que en el ThyTau22.....	85
Figura D.4. La fosforilación de Tau es superior en el modelo TAU P301S que en el ThyTau22.....	86
Figura D.5. Las fracciones solubles procedentes de ratones ThyTau22, a diferencia de las fracciones solubles de ratones P301S, son tóxicas en cultivos de células BV2 .....	87
Figura D.6. Mecanismo de toxicidad de las fracciones S1 de ratones ThyTau22.....	88
Figura D.7. La agregación de Tau es mayor en el modelo TAU P301S que en el ThyTau22.....	90
<b>2. Activación microglial: perfil transcriptómico de la microglía activa en respuesta a patología Abeta y Tau <i>in vivo</i>.....</b>	<b>92</b>
Figura D.8. Aislamiento específico de la microglía activa de corteza cerebral e hipocampo de ratón .....	93
Figura D.9. Caracterización transcriptómica de la microglía aislada del cerebro de ratones transgénicos modelos de la EA.....	94
Figura D.10. La microglía activa aislada de los modelos APP y TAU presenta un fenotipo DAM y una respuesta inflamatoria asociada a neurodegeneración .....	96
Figura D.11. Ilustración de la microglía Trem2+ en el hipocampo de ratones APP y TAU.....	97
Figura D.12. La microglía activa aislada de los modelos APP y TAU presenta un metabolismo oxidativo.....	99
Figura D.13. Diagrama de los genes incluidos en la ruta KEGG Enfermedad de Alzheimer.....	100

Figura D.14. Las mitocondrias de la microglía asociada a placas de Abeta presentan morfología elongada .....	101
Figura D.15. El tratamiento con oligómeros de Abeta aumenta la capacidad máxima respiratoria microglial <i>in vitro</i> .....	103
Figura D.16. Estudio de la expresión proteica de los complejos de la cadena de transporte de electrones .....	104
Figura D.17. El metabolismo oxidativo de la microglía activa podría estar mediado vía mTOR. 106	
Figura D.18. TREM2 es indispensable para la activación microglial y fagocitosis de Abeta oligomérico.....	108
Figura D.19. Diferente perfil génico en la microglía activa en respuesta a las patologías Abeta y Tau.....	110
<b>3. Disfuncionalidad microglial por disminución de la disponibilidad de oxígeno .....</b>	<b>112</b>
Figura D.20. En el hipocampo de pacientes con EA aumenta la expresión de marcadores de respuesta a hipoxia.....	113
Figura D.21. Las regiones con baja disponibilidad de oxígeno en el cerebro de paciente con EA presentan placas amiloides desnudas de microglía, con un incremento de las neuritas distróficas .....	114
Figura D.22. La respuesta inflamatoria microglial a Abeta se ve comprometida en hipoxia .....	115
Figura D.23. La hipoxia crónica disminuye el <i>clustering</i> de microglía asociada a placa.....	117
Figura D.24. La hipoxia disminuye la activación microglial en el modelo TAU P301S.....	119
Figura D.25. La hipoxia disminuye la activación astrogliar en el modelo TAU P301S.....	120
Figura D.26. Inmunohistoquímica de la activación astrocítica en animales TAU P301S en normoxia e hipoxia .....	121
Figura D.27. La hipoxia disminuye la inflamación y activación del complemento en el modelo TAU P301S.....	122
Figura D.28. La hipoxia disminuye la patología Tau en el modelo TAU P301S .....	123
Figura D.29. La hipoxia disminuye la patología Tau en el modelo TAU P301S .....	124
Figura D.30. La hipoxia <i>per se</i> no induce cambios en la fosforilación ni en los niveles totales de Tau en la línea neuronal SH-Tau .....	125
Figura D.31. Estudio de la patología sináptica en animales TAU P301S sometidos a hipoxia .....	126
<b>4. Disfuncionalidad microglial por ablación genética de CSF1R.....</b>	<b>127</b>
Figura D.32. La depleción microglial producida tras 7 días de inyecciones con tamoxifeno en ratones CX3CSF1R de 2 meses está seguida de una rápida repoblación.....	129

Figura D.33. El tratamiento agudo con tamoxifeno en ratones CX3CSF1R de 2 meses produce elevados niveles de depleción microglial .....	130
Figura D.34. Depleción y repoblación microglial en animales CS3CSF1R de 2 meses.....	131
Figura D.35. Población microglial (Iba1+) en cortes secuenciales de un animal CX3CSF1R.....	132
Figura D.36. El inicio de la repoblación se caracteriza por activación microglial en animales de 2 meses .....	134
Figura D.37. Estudio de marcadores de infiltración de células inmunes tras el tratamiento agudo de depleción en animales de 2 meses.....	136
Figura D.38. Estudio de la reactividad astrocítica tras el tratamiento de depleción aguda en animales de 2 meses.....	137
Figura D.39. La depleción aguda microglial es menos eficaz en animales de 12 meses y es seguida por una rápida repoblación. ....	140
Figura D.40. Estudio de la reactividad astrocítica tras el tratamiento de depleción aguda en animales de 12 meses.....	141
Figura D.41. Un 2º ciclo de depleción aguda no logra una depleción completa y conlleva una super-repoblación microglial 14 días post-tratamiento en animales de 2 meses.....	142
Figura D.42. Estudio de la depleción microglial en animales jóvenes tras tratamientos crónicos .....	143
Figura D.43. Imágenes ilustrativas del hipocampo de ratones WT y CX3CSF1R tratados durante 1 o 2 meses con tamoxifeno oral.....	145
Figura D.44. Estudio del fenotipo microglial e infiltración de células periféricas en animales jóvenes tras tratamientos crónicos con tamoxifeno oral .....	147
Figura D.45. Estudio del fenotipo astrogliar en animales jóvenes tras tratamientos crónicos con tamoxifeno oral .....	148
Figura D.46. Estudio de la depleción y fenotipo microglial en animales envejecidos tras 4 meses de tratamiento con tamoxifeno oral.....	149
Figura D.47. Estudio de la infiltración de células inmunes periféricas y de activación astrogliar en animales envejecidos tras 4 meses de tratamiento.....	150
Figura D.48. La depleción microglial crónica no induce cambios neuronales ni sinápticos en animales envejecidos tras 4 meses de tratamiento con tamoxifeno oral.....	150
Figura D.49. La alimentación con tamoxifeno desde los 4 a los 8 meses en animales APPCX3 produce disminución de la población microglial, incremento en su activación y no induce la infiltración de células periféricas inmunes Cd163+, Ccr2+, Cd3+, pero sí Ly6c+ .....	152
Figura D.50. La alimentación con tamoxifeno desde los 4 a los 8 meses en animales APPCX3 no modifica la reactividad astrocítica .....	153
Figura D.51. Estudio del efecto de la depleción parcial microglial en animales APPCX3 sobre el contenido amiloide.....	154



Figura D.52. La alimentación con tamoxifeno desde los 4 a los 8 meses en animales APPCX3 no induce cambios significativos en la fosforilación de Tau .....	155
Figura D.53. La alimentación con tamoxifeno desde los 4 a los 8 meses en animales APPCX3 no induce cambios neuronales ni sinápticos .....	156
Figura D.54. La alimentación con tamoxifeno desde los 8 hasta los 12 meses en animales APPCX3 reduce los niveles de microglía y la activación microglial, y no conlleva infiltración de células inmunes periféricas.....	158
Figura D.55. Imágenes ilustrativas de la microglía hipocampal en ratones APP, y APPCX3 alimentados de los 8 a los 12 meses con tamoxifeno oral .....	159
Figura D.56. La alimentación con tamoxifeno desde los 8 hasta los 12 meses en animales APPCX3 reduce la reactividad astrocítica .....	156
Figura D.57. La alimentación con tamoxifeno desde los 8 hasta los 12 meses en animales APPCX3 no altera los niveles de Abeta ni de fosfo-Tau .....	156

## **E. DISCUSIÓN** **163**

---

Figura E.1. La activación microglial crónica requiere un metabolismo oxidativo .....	184
--	-----

## **H. ANEXO: Tablas Suplementarias** **217**

---

Tabla Suplementaria 1. Los 20 GeneSet de la categoría “Biological Processes” que más incrementan su expresión en la microglía activa aislada de ratones APP de 12 meses versus WT de 12 meses.....	219
Tabla Suplementaria 2. Los 20 GeneSet de la categoría “Rutas Kegg” que más incrementan su expresión en la microglía activa aislada de ratones APP de 12 meses versus WT de 12 meses. .	220
Tabla Suplementaria 3. Los 100 genes que más se expresan diferencialmente en la microglía activa aislada de ratones APP 12 meses versus WT de 12 meses.....	221
Tabla Suplementaria 4. Los 100 genes que más se sobre-expresan en la microglía activa aislada de ratones APP 12 meses versus TAU P301S de 9 meses.....	222
Tabla suplementaria 5. Los 20 GeneSet de la categoría “Biological Processes” que más incrementan su expresión en la microglía activa aislada de ratones TAU P301S de 9 meses versus WT de 12 meses.....	223
Tabla suplementaria 6. Los 20 GeneSet de la categoría “Rutas Kegg” que más incrementan su expresión en la microglía activa aislada de ratones TAU P301S de 9 meses versus WT de 12 meses .....	224
Tabla suplementaria 7. Los 100 genes que más se expresan diferencialmente en la microglía activa aislada de ratones TAU P301S de 9 meses versus WT de 12 meses.....	225
Tabla suplementaria 8. Genes, con un p-valor ajustado <0.05, que se sobre-expresan en la microglía activa aislada de ratones TAU P301S de 9 meses versus APP de 12 meses .....	22



# A. Introducción



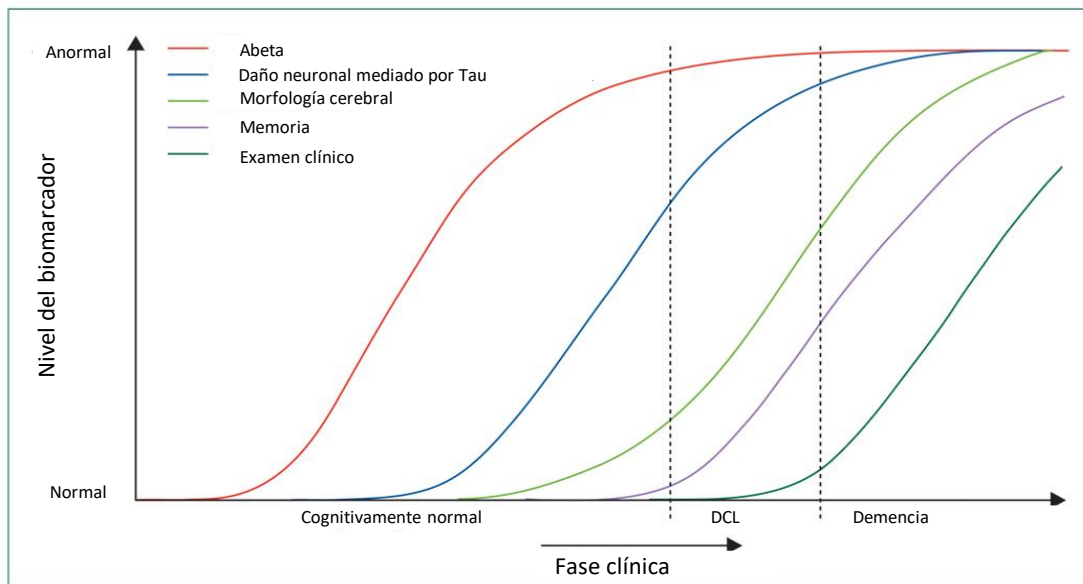
## 1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La Enfermedad de Alzheimer (EA) se define como un proceso neurodegenerativo progresivo e irreversible, que conlleva un deterioro de las funciones cognitivas y alteraciones conductuales (Hane et al., 2017). Fue descrita por primera vez en 1907 por el psiquiatra y neurólogo Alois Alzheimer (Alzheimer, 1907) tras caracterizar, en el cerebro de una paciente, las lesiones histopatológicas típicas de la enfermedad: depósitos extracelulares (placas seniles) y agregados fibrilares intracelulares (ovillos), localizados principalmente en la corteza cerebral e hipocampo. Además de la pérdida de memoria y razonamiento, la EA se manifiesta con desorientación espacio-temporal, cambios de humor, afasia, apraxia y/o agnosia. Sin embargo, en el 80% de los casos la muerte del enfermo suele producirse por causas no relacionadas con la demencia, y sólo el 20% son directamente atribuibles a ésta o a sus complicaciones durante la fase terminal, siendo la malnutrición o la neumonía las más comunes (Kumar y Tsao, 2020).

Desde el punto de vista clínico, la EA se clasifica en 3 fases según el grado de alteración cognitiva (Hane et al., 2017). La primera fase o fase “preclínica” es asintomática; a continuación, se produce la fase prodrómica o de “deterioro cognitivo leve”. Por último, la fase de “demencia” es consecuencia de la pérdida de sinapsis y neuronas en las regiones cerebrales responsables de los procesos cognitivos (corteza entorrinal, hipocampo, amígdala y áreas neocorticales) (Scheltens et al., 2016; Serrano-Pozo et al., 2011). Generalmente, el curso clínico dura de 4 a 8 años tras los primeros signos de la enfermedad, aunque se puede alargar hasta los 20 años (Kumar y Tsao, 2020). Paralelamente, se ha propuesto un sistema de clasificación no diagnóstico, sino basado en biomarcadores, que otorga un valor basándose en tres categorías: A, que se refiere a marcadores amiloideos (PET de placas o Abeta<sub>42</sub> en líquido cefalorraquídeo (LCR)); T, que indica el valor de biomarcadores de Tau (PET de ovillos neurofibrilares o fosfo-Tau en LCR); y N, que se corresponde con biomarcadores de daño neuronal (fluorodeoxiglucosa-PET, resonancia magnética intracraneal o Tau total en LCR) (Jack et al., 2016).

En la actualidad, la EA es la demencia más común, representando el 60-70% de los casos (se estiman 50 millones de personas con demencia a nivel mundial) (OMS 2020). Aunque varios estudios epidemiológicos contabilizan una disminución de enfermos con demencia en las últimas décadas, asociada a un mejor control de los factores de riesgo cardiovasculares y a un incremento en el nivel de educación (Dumurgier y Tzourio, 2020), se estima que en 2050 se alcancen 152 millones de afectados a nivel mundial, en parte debido al incremento en los países de ingresos bajos y medios (OMS 2020). Estos datos revelan que la EA es un serio problema de salud pública, el tercero más grave en los países desarrollados, detrás de los accidentes cardiovasculares y el cáncer.

Una de las claves para el éxito terapéutico en esta enfermedad es el diagnóstico precoz. A día de hoy, el diagnóstico se apoya principalmente en la historia clínica y en los exámenes neuropsicológicos de los pacientes, tales como el MoCA (“*Montreal Cognitive Assessment*”) o el MMSE (“*Mini-Mental Status Examination*”) (Atri, 2019). Aunque se aúnan esfuerzos para poder identificar los síntomas iniciales de la enfermedad, la EA sólo se diferencia del resto de demencias cuando el proceso patológico está muy avanzado y es irreversible (Hane et al., 2017) (Figura A.1). De hecho, la ausencia de buenos marcadores biológicos hace que sólo el análisis neuropatológico *post mortem* permita su diagnóstico definitivo. La evaluación histológica permite clasificar el estadio patológico de cada paciente según el criterio ABC: (A) depósitos  $\beta$ -amiloides, (B) estadio de los ovillos neurofibrilares (NFTs, del inglés *neurofibrillary tangles*) (estadios Braak) y (C) puntuación de las placas neuríticas (Montine et al., 2012).



**Figura A.1. Dinámica de los biomarcadores en la patología de Alzheimer.** Cuando el deterioro cognitivo se manifiesta, las alteraciones neuropatológicas presentan niveles muy elevados. Abeta se mide por el contenido de Abeta<sub>42</sub> en líquido cefalorraquídeo (LCR); la disfunción mediada por Tau se mide por contenido de Tau en LCR o por PET-fluorodeoxiglucosa; la morfología cerebral se cuantifica por resonancia magnética intracraneal. DCL=deterioro cognitivo leve. Modificado de Jack et al., 2013.

Tampoco existe ningún tratamiento farmacológico efectivo que cure la enfermedad, ni siquiera que modifique su curso clínico (Muñoz-Castro et al., 2020). De ahí que hayan cobrado gran importancia las estrategias de soporte no-farmacológico como el establecimiento de rutinas, la simplificación de su entorno o la terapia cognitiva-conductual (Kishita et al., 2020; Na et al., 2019). Por su parte, los fármacos disponibles, como inhibidores de la acetil-colinesterasa y un antagonista parcial de los receptores NMDA, son exclusivamente de carácter sintomático y producen un beneficio limitado sólo en los estadios iniciales de la enfermedad (Yiannopoulou y Papageorgiou, 2020). Por ello, resulta indispensable seguir investigando los agentes causales de la patología y sus mecanismos moleculares y celulares con el fin de desarrollar marcadores de diagnóstico precoz y terapias más efectivas.



## 1.1. Tipos de Alzheimer

Se diferencian dos tipos de EA, que difieren en la edad de inicio, incidencia y causa principal que provoca su aparición, pero que comparten la misma sintomatología y lesiones histopatológicas.

El **Alzheimer de origen temprano** (EOAD; del inglés, *early onset Alzheimer's Disease*), representa entre el 1-3% de los casos de Alzheimer y se manifiesta a edades tempranas, generalmente entre los 35 y 40 años (Ringman et al., 2015). Dentro de la EOAD, un 5-10% de los casos corresponden al Alzheimer Familiar y se originan por mutaciones autosómicas, la mayoría dominantes con total penetrancia, en los genes de la proteína precursora amiloide (APP) y de las presenilinas 1 y 2 (PS1 y PS2), localizados en los cromosomas 21, 14 y 1, respectivamente (Cacace et al., 2016; Calero et al., 2015; Karch et al., 2014; Robinson et al., 2017). Estas proteínas están implicadas en la producción del péptido beta-amiloide (Abeta) (ver Apartado 2.1). Se han descrito 60 mutaciones en APP, más de 300 en PS1 y 56 en PS2 relacionadas con la enfermedad ([www.alzforum.org/mutations](http://www.alzforum.org/mutations)). En el resto de casos de EOAD, las mutaciones génicas subyacentes no están totalmente definidas (Cacace et al., 2016; Pottier et al., 2013). A esta heterogeneidad genética se asocia una heterogeneidad clínica ya que la sintomatología inicial debuta de forma variable (amnesia, afasia, apraxia, etc) en cada paciente (Cacace et al., 2016).

El **Alzheimer de origen tardío** (LOAD; del inglés, *late onset Alzheimer's Disease*), o de inicio esporádico, representa la mayoría de los casos de EA (97-99%). Afecta al 3-4% de la población entre 60-65 años y aumenta exponencialmente con la edad, llegando a afectar a casi un 50% de los mayores de 85 años (Prince et al., 2013). Sus causas son desconocidas y se le otorga un origen multifactorial. Además de la edad, que constituye su principal factor de riesgo, influyen otros factores genéticos y ambientales.

Factores Genéticos: se han descrito polimorfismos genéticos en más de 20 genes implicados en el inicio, progresión y severidad de la patología (Bagyinszky et al., 2014; Calero et al., 2015; Robinson et al., 2017) (Figura A.2). Estudios recientes de GWAS (del inglés, *Genome wide association studies*) han identificado distintos alelos asociados a la patología de Alzheimer (Sancesario y Bernardini, 2018), 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. Los principales genes polimórficos que aumentan el riesgo de padecer la EA esporádica son:

- ApoE (Apolipoproteína E), que codifica una proteína secretada predominantemente por células gliales cuya principal función es ser transportadora de colesterol. Además, ApoE interviene en el metabolismo y el aclaramiento del péptido Abeta (Kumar y Tsao, 2020; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018), en el proceso neuroinflamatorio (Tai et al., 2015), e incluso en la patología Tau y la neurodegeneración (Shi et al., 2017). ApoE presenta tres isoformas,  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  (la más común) y  $\epsilon 4$  (Strittmatter et al., 1993). La isoforma

$\epsilon 4$  representa el principal factor genético de riesgo asociado a la LOAD, incrementando tres veces el riesgo en individuos con una copia de este alelo y quince veces en individuos homocigotos (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). Contrariamente, el alelo  $\epsilon 2$  tiene un papel protector (Corder et al., 1994).

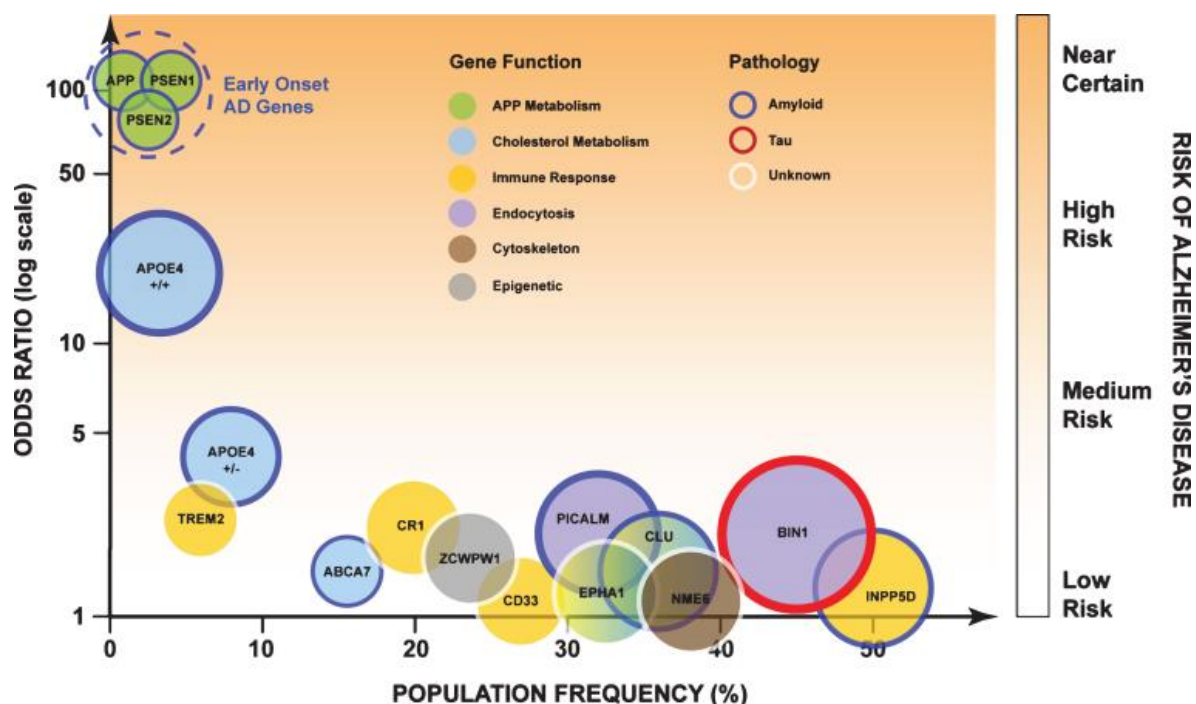
- Clu (clusterina), que codifica una región de la cadena beta de la proteína clusterina o apolipoproteína J (ApoJ) (Robinson et al., 2017). Dicha proteína es secretada por los astrocitos y posee actividad chaperona, participando en la oligomerización/fibrilización de Abeta. Ciertas mutaciones en este gen parecen promover la agregación y formación de las placas amiloides (Bagyinszky et al., 2014).

- Trem2 (del inglés, *triggering receptor expressed on myeloid cells 2*), que codifica un receptor transmembrana de superficie celular perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas, expresado específicamente en la microglía. Está implicado en la activación, fagocitosis, supervivencia y proliferación microglial. Distintas variantes de este gen, como R47H, aumentan el riesgo de desarrollar la EA entre dos y cuatro veces (Gratuze et al., 2018). En modelos animales de EA, así como en muestras de pacientes con EA, se produce un incremento dependiente de la edad de microglía positiva para Trem2. Aunque existe controversia sobre el papel de Trem2 en la progresión de la patología de Alzheimer, parece que, en las etapas iniciales estimula la activación microglial y el aclaramiento y compactación de Abeta, por lo que ejerce un papel neuroprotector mientras que, en estadios más avanzados, promueve una microgliosis continuada que podría agravar la neuroinflamación (Gratuze et al., 2018; Karanfilian et al., 2020). Por otro lado, Trem2 soluble está siendo considerado como un biomarcador para la EA (Brosseron et al., 2019; Rauchmann et al., 2020).

- CR1 (del inglés, *complement receptor type 1*), que codifica el receptor del complemento 1 (receptor de C3b), involucrado en la inmunidad innata. Media la activación de la cascada del complemento inducida por Abeta fibrilar, y en la que participan tanto microglía como astrocitos (Efthymiou y Goate, 2017).

- CD33 (del inglés, *cluster of differentiation 33*). Codifica un receptor transmembrana expresado en microglía que reconoce residuos de ácido siálico presentes en proteínas y lípidos, desencadenando una cascada de señalización que inhibe la respuesta inmune (Zhao, 2019).

En general, todos los genes que modifican el riesgo de padecer EA están implicados en el procesamiento y el aclaramiento amiloideo, la respuesta inmune e inflamatoria (CR1, CD33, TREM2, MS4A, ABCA7, EPHA1, CLU, HLA-DRB5/HLA-DRB1, INPP5D y MEF2C), 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) (Efthymiou y Goate, 2017; Robinson et al., 2017; Sancesario y Bernardini, 2018).



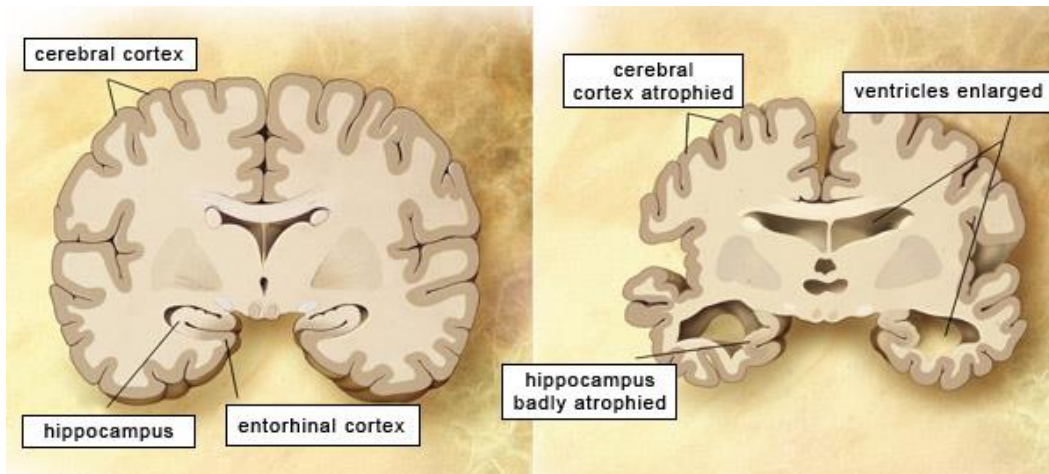
**Figura A.2. Factores de riesgo genéticos de la EA** y sus funciones fisiológicas generales. Los genes de alto riesgo están asociados con un inicio anterior de la patología y un aumento en su severidad, y los factores genéticos de menor riesgo se asocian con un inicio más tardío y una progresión menos severa de la patología. Imagen tomada de Robinson et al., 2017.

Factores Ambientales: la obesidad, el estrés, la hipertensión, la inactividad física y mental, la depresión, las enfermedades vasculares, el tabaco, el traumatismo cerebral y la diabetes mellitus son factores modificables que parecen contribuir al desarrollo de la EA esporádica (Robinson et al., 2017; Scarmeas et al., 2009; Scheltens et al., 2016).

La diabetes mellitus se considera un importante factor de riesgo debido a que la insulina modula la plasticidad sináptica, la memoria y el aprendizaje y el metabolismo de Abeta y de Tau (Sato y Morishita, 2014). Además, en pacientes diabéticos son comunes los daños microvasculares (Domínguez et al., 2014). Evidencias recientes apoyan la implicación del sistema vascular cerebral en la EA (Iadecola, 2016): los enfermos de Alzheimer suelen presentar una red neurovascular más reducida y una típica angiopatía amiloide cerebral, con depósitos de Abeta en los vasos sanguíneos cerebrales (DeSimone et al., 2017), lo que puede provocar su obstrucción y contribuir al declive cognitivo (Hort et al., 2019). Por otro lado, el género también se considera un factor de riesgo de la EA esporádica. En general, las mujeres tienen mayor riesgo que los hombres (Nebel et al., 2018), sobre todo las mujeres postmenopáusicas, posiblemente debido al papel neuroprotector que poseen los estrógenos. A ello se une que las mujeres tienen mayor esperanza de vida.

## 1.2. Rasgos neuropatológicos

A nivel macroscópico, los enfermos de Alzheimer presentan una importante atrofia cortical, adelgazamiento de las circunvoluciones y ensanchamiento de los surcos, engrosamiento de las meninges, agrandamiento de las cavidades ventriculares, disminución del bulbo olfatorio y pérdida de peso y volumen cerebral (Figura A.3). Las técnicas de neuroimagen de alta resolución permiten visualizar la atrofia cerebral y sirven de ayuda para el diagnóstico y evolución de la enfermedad (Eskildsen et al., 2015).



**Figura A.3. Esquema comparativo de un hemisferio humano sano (izq) y de un paciente de Alzheimer (dcha).** El cerebro afectado por la EA presenta menor volumen y ventrículos más dilatados. Esta atrofia afecta principalmente a los lóbulos temporales, frontales, parietales y occipitales. Las regiones más afectadas son las implicadas en las funciones de memoria (hipocampo) y lenguaje (áreas de Broca y de Wernicke). Imagen tomada de "The Brain from the Top" (<https://thebrain.mcgill.ca/index.php>).

Las principales alteraciones microscópicas características de la EA son los agregados proteicos extracelulares en forma de placas de péptido beta-amiloide, los ovillos neurofibrilares intraneuronales de la proteína Tau hiperfosforilada, la disminución de la densidad sináptica, la degeneración neuronal en las áreas cerebrales afectadas y un proceso neuroinflamatorio mediado por células gliales.

## 2. ABETA Y PATOLOGÍA AMILOIDE

Las placas seniles son agregados proteicos localizados en el parénquima cerebral cuyo componente principal es el péptido Abeta, que contiene entre 39 y 43 aminoácidos y deriva del procesamiento proteolítico de la proteína precursora del péptido beta-amiloide (APP) (Figura A.4). En individuos sanos, este péptido circula a baja concentración en plasma y líquido cefalorraquídeo. De hecho, se han descrito depósitos de Abeta insoluble en el parénquima cerebral y en la pared de los vasos sanguíneos cerebrales de personas sanas con edad avanzada (Selkoe, 2004).

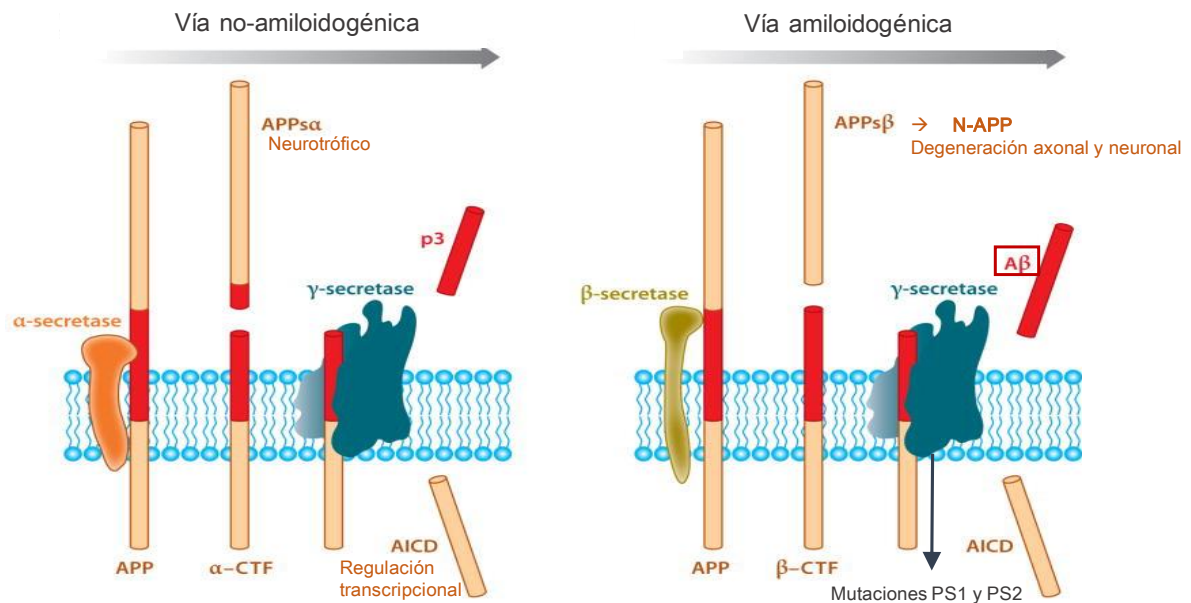
Numerosas investigaciones intentan aclarar el papel fisiológico de Abeta. Algunos resultados sugieren que podría actuar regulando la liberación de vesículas desde terminales presinápticas excitatorias (Abramov et al., 2009), y como modulador postsináptico negativo (Palop y Mucke, 2010). En condiciones fisiológicas, más del 90% de las especies de Abeta están en forma de Abeta40 (soluble), con 40 aminoácidos y Val40 en su extremo C-terminal, y menos del 10% como Abeta42, con los aminoácidos adicionales Ile41 y Ala42, que le confieren mayor hidrofobicidad y capacidad de agregación (Zhang et al., 2011). El acúmulo de Abeta (especialmente de Abeta42) parece ser limitante en la formación de las placas, aunque su mecanismo de formación no está completamente caracterizado.

### 2.1. Síntesis de Abeta

#### 2.1.1. *Proteína Precursora Amiloide y su procesamiento*

APP es una glicoproteína integral de membrana de tipo I muy conservada evolutivamente. Está formada por un largo ectodominio globular (N-terminal) en el espacio extracelular, un único segmento transmembrana y un pequeño dominio citosólico (C-terminal). Su gen se localiza en el cromosoma 21 y está constituido por 18 exones que dan lugar a 10 isoformas, siendo las más frecuentes APP695, APP751 y APP770 (Nguyen, 2015). La isoforma APP695 se expresa predominantemente en neuronas (Haass et al., 1991) y, por tanto, es la mayoritaria en el SNC. Se han descrito 60 mutaciones en el gen APP relacionadas con las formas familiares de la EA ([www.alzforum.org/mutations](http://www.alzforum.org/mutations)), que, en general, suponen una ganancia de función tóxica al aumentar los niveles de Abeta42, disminuir los de Abeta40, o incrementar la patogenicidad de Abeta y su capacidad de agregación (Castro et al., 2019). Sin embargo, la mutación A673T en APP reduce la producción de Abeta y su agregación, proporcionando protección contra el declive cognitivo asociado a la edad (Karran y De Strooper, 2016). La proteína APP sufre diversas escisiones proteolíticas tanto a través de las vías canónicas, explicadas a continuación (rutas amiloidogénica y no amiloidogénica; Figura A.4), como de las no canónicas (Andrew et al., 2016), en las que están implicadas diversas enzimas como las caspasas, meprina,  $\delta$ -secretasa y  $\eta$ -secretasa.

**Ruta no amiloidogénica.** Es la ruta principal en la mayoría de las células y no genera péptido Abeta. En primer lugar, actúa la  $\alpha$ -secretasa, enzima perteneciente a la familia ADAM (del inglés, *A desintegrin and metalloprotease*), que escinde la proteína APP dentro del fragmento de Abeta (aminoácidos 16-17) y libera un fragmento soluble denominado  $sAPP\alpha$ , al que se le atribuyen propiedades neurotróficas y neuroprotectoras (De Strooper, 2010). Además, se genera un fragmento C-terminal (APP-CTF) de 83 aminoácidos (C83), que permanece anclado a la membrana. C83 es sustrato del complejo  $\gamma$ -secretasa, que lo escinde originando los péptidos p3, 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; Wilkins y Swerdlow, 2017).



**Figura A.4. Procesamiento de la Proteína Precursora Amiloide (APP).** Mediante la vía no amiloidogénica, el APP se procesa por la acción secuencial de la  $\alpha$ - y  $\gamma$ -secretasa, generando  $sAPP\alpha$ , p3 y AICD. Por otro lado, en el procesamiento mediante la vía amiloidogénica intervienen la  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasa, dando lugar a los fragmentos N-APP, AICD y  $A\beta_{40-42}$ . Imagen modificada de O' Brien et al., 2011.

**Ruta amiloidogénica.** Es minoritaria en la mayoría de las células, excepto en neuronas, y se activa de forma fisiológica durante el envejecimiento normal, aunque se potencia en la EA. En primer lugar, la proteína APP se escinde por acción de la  $\beta$ -secretasa, atribuida a la enzima BACE-1 (del inglés, *beta-site APP cleaving enzyme 1*), y origina APP soluble ( $sAPP\beta$ ), que se libera al espacio extracelular; y un fragmento C-terminal (APP-CTF) de 99 aminoácidos (C99). C99 permanece anclado a la membrana y es procesado por el complejo  $\gamma$ -secretasa, generando el péptido Abeta (39-43 aminoácidos), que se libera al medio extracelular, y AICD (Selkoe, 2008; Wilkins y Swerdlow, 2017). El procesamiento proteolítico del  $sAPP\beta$  origina N-APP, que parece estar implicado en procesos de degeneración axonal y neuronal (De Strooper, 2010; Jeong, 2017).



Se ha propuesto que los oligómeros solubles de Abeta 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 $\alpha$ , sAPP $\beta$  (Jeong, 2017). Aunque BACE-1 y  $\gamma$ -secretasa se han considerado posibles dianas terapéuticas en la EA, los ensayos clínicos realizados con inhibidores de estas enzimas no han llegado a término (De Strooper, 2010; Hunt y Turner, 2009; Mangialasche et al., 2010). Actualmente, se está usando un inhibidor de BACE-1 en fase 3 de estudio (“Elenbecestat”), y sus resultados parecen eficaces cuando se aplica en los estadios iniciales de la patología (Muñoz-Castro et al., 2020).

### 2.1.2. Complejo $\gamma$ -secretasa

La  $\gamma$ -secretasa es un complejo aspartil-proteasa constituido por un núcleo catalítico formado por PS1 o PS2 y tres proteínas accesorias: nicastrina, APH-1 (*pharynx-defective-1*) y PEN2 (*presenilin enhancer 2*), necesarias para la maduración, estabilidad y actividad de la enzima (Andreeva et al., 2017; De Strooper, 2003; De Strooper et al., 2012). Las presenilinas se expresan predominantemente en neuronas, aunque también pueden hacerlo en astrocitos reactivos (Elder et al., 2010). PS1 y PS2 comparten más de un 65% de homología, siendo PS1 la que se expresa mayoritariamente. Sus principales sustratos son Notch y APP y además participa en el control de la apoptosis, la homeostasis del calcio, el crecimiento neurítico, la plasticidad sináptica, las rutas autofagocíticas/lisosomales, el tráfico de proteínas y la señalización mediada por  $\beta$ -catenina (Oikawa y Walter, 2019). A día de hoy, se han identificado 300 mutaciones en el gen de PS1 y 56 en el de PS2 que producen EOAD ([www.alzforum.org/mutations](http://www.alzforum.org/mutations)). Todas implican una ganancia de función del complejo  $\gamma$ -secretasa, y producen un aumento de Abeta42 y una disminución de Abeta40.

## 2.2. Degradación/eliminación de Abeta

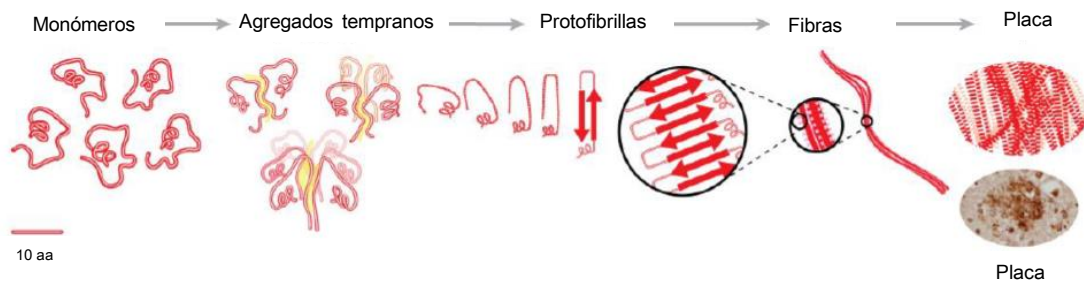
La acumulación patológica de Abeta se origina por un desequilibrio entre su producción y su degradación. Aunque en los pacientes de Alzheimer Familiar existe un aumento en la producción de Abeta, en el Alzheimer esporádico, la acumulación de Abeta parece deberse a una disminución en su degradación y/o aclaramiento (Evin y Weidemann, 2002; Hane et al., 2017). Las enzimas más relevantes que participan en la eliminación de Abeta (Ries y Sastre, 2016) son: (i) metaloendopeptidasas, principalmente NEP (neprelisina) e IDE (enzima degradadora de insulina) implicadas en la degradación de Abeta monomérico. Durante el envejecimiento, se produce una disminución de los niveles de NEP (Farris et al., 2007), que podría ser responsable del aumento de Abeta con la edad. (ii) Metaloproteinasas de la matriz (MMPs), expresadas y secretadas principalmente por astrocitos, participan en la degradación de formas monoméricas y fibrilares de Abeta. (iii) Peptidasas lisosomales, como la catepsina B, que

transforman agregados de Abeta en especies más pequeñas y con mayor afinidad por IDE y NEP (De Strooper, 2010; Mueller-Steiner et al., 2006).

Por otro lado, las células gliales, principalmente los astrocitos, liberan chaperonas extracelulares que facilitan el aclaramiento de Abeta a través de la BHE, como ApoE, ApoJ o Clu,  $\alpha$ 1-antiquimiotripsina y  $\alpha$ 2- macroglobulina ( $\alpha$ 2-M)) (Ries y Sastre, 2016). Además, la glía participa de manera activa en la internalización de Abeta mediante mecanismos de pinocitosis, fagocitosis y/o endocitosis mediada por receptores, entre los que destacan los scavenger receptors (SR), toll-like receptors (TLR), RAGE, receptores Fc, Trem2, LIG3, y receptores de lipoproteínas (Cai et al., 2017; Lee y Landreth, 2010; Ries y Sastre, 2016).

### 2.3. Agregación del péptido Abeta: oligomerización y formación de placas

El péptido Abeta es una proteína de 4 kDa, constituida por 39-43 aminoácidos. La isoforma de 42 aminoácidos (Abeta42) presenta una mayor hidrofobicidad y, por tanto, mayor capacidad de agregación (Hiltunen et al., 2009; Zhang et al., 2011), siendo el componente mayoritario de las placas amiloides. Los mecanismos de agregación de Abeta y el proceso de formación de las placas extracelulares no están claramente definidos, aunque se han propuesto modelos que describen cómo los monómeros de Abeta tienden a agregarse generando formas intermedias oligoméricas solubles, de entre 8 kDa (dímeros) y 100 kDa, que posteriormente dan lugar a las fibras y las placas amiloides (Figura A.5) (Cline et al., 2018; Sakono y Zako, 2010; Takahashi et al., 2017).



**Figura A.5. Agregación del péptido Abeta.** Los monómeros de Abeta pueden autoensamblarse formando dímeros y trímeros (agregados tempranos), protofibrillas y fibras (insolubles) que formarán, finalmente, las placas amiloides. Imagen tomada de Graham et al. 2017.

Los **oligómeros** solubles intermediarios y las protofibrillas parecen ser las formas más tóxicas del péptido Abeta (Choi y Gandhi, 2018; Ricciarelli y Fedele, 2017; ViolyKlein, 2015). Los oligómeros presentan una estructura micelar y pueden ensamblarse para generar estructuras de mayor peso molecular (Iadanza et al., 2018): (i) ligandos difusibles derivados de Abeta, que correlacionan con los déficits cognitivos (Lambert et al., 1998); (ii) estructuras anulares, sólo distinguibles mediante microscopía electrónica de

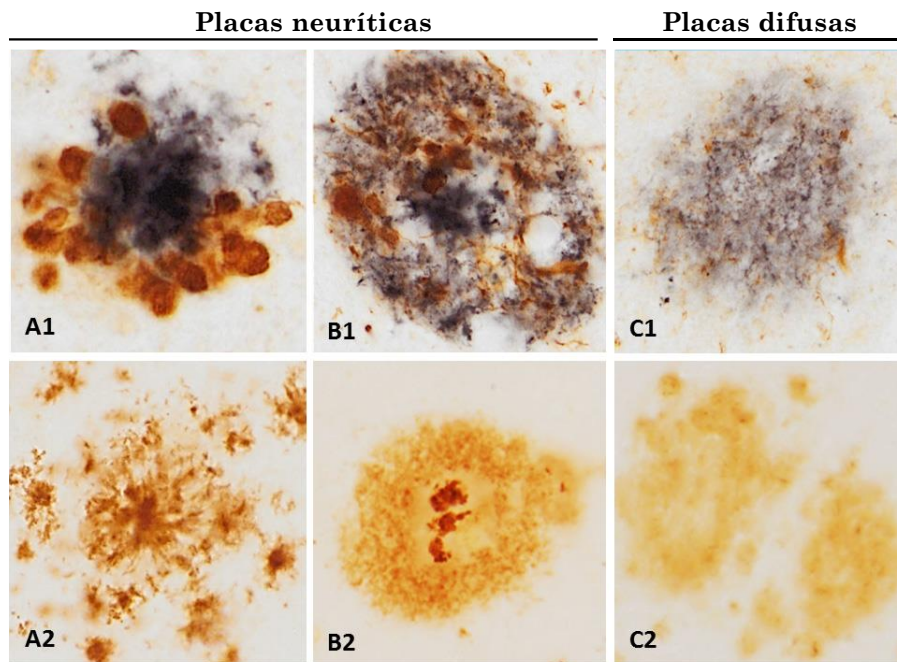


alta resolución (Lambert et al., 1998); (iii) protofibrillas (Ono y Tsuji, 2020; Walsh et al., 1997) y (iv) paranúcleos, Abeta\*56 (Lesné et al., 2006), amiloesferoides (Noguchi et al., 2009), globulómeros, oligómeros prefibrilares, oligómeros fibrilares, etc (Chang y Chen, 2014; Choi y Gandhi, 2018; Lesné et al., 2013). Entre los distintos mecanismos deletéreos que ejercen, los oligómeros parecen inhibir la LTP (del inglés, *long-term potentiation*) en el hipocampo (Haass y Selkoe, 2007). Además, perturban la membrana celular, lo que altera las vías de señalización, la homeostasis del calcio, la formación de canales iónicos, aumenta la permeabilidad, e induce estrés oxidativo, cascadas inflamatorias, disfunciones mitocondriales y modificación de la estructura del ADN (Hane et al., 2017; Reiss et al., 2018; Ricciarelli y Fedele, 2017; Viola y Klein, 2015).

Las **placas amiloides** o seniles son agregados proteicos insolubles que se depositan extracelularmente, tanto en el parénquima cerebral como en la pared de los vasos sanguíneos cerebrales (Greenberg et al., 2020; Thal et al., 2008). Su componente principal son los péptidos de Abeta insoluble (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). Las placas seniles se clasifican en dos grupos según su morfología, composición, y presencia o ausencia de distrofias neuríticas asociadas (Figura A.6) (D' Andrea y Nagele, 2010; Serrano-Pozo et al., 2011; Thal et al., 2008):

a) Placas neuríticas: son depósitos extracelulares de Abeta de aspecto filamentoso, que reciben su nombre por aparecer íntimamente asociadas a neuritas distróficas (inmunopositivas para Tau, APP, Ubiquitina o ChAT), y a células microgliales reactivas, mientras que la astrogliosis se localiza en la periferia (Bouvier et al., 2016; Dickson, 1997). Se subdividen en dos tipos, atendiendo a su morfología: (i) placas clásicas, normalmente asociadas a vasos y caracterizadas por un núcleo amiloide redondo y compacto, formado por Abeta fibrilar y células microgliales, rodeado por un halo difuso que contiene distintas especies solubles de Abeta; y (ii) placas primitivas, con forma esférica, sin núcleo compacto y que suelen aparecer en zonas cercanas a los axones y a las sinapsis.

b) Placas difusas o “pre-amiloides”: son depósitos extracelulares no fibrilares de Abeta. Poseen una estructura amorfa, con límites poco definidos y sin núcleo compacto. Apenas poseen células microgliales, astrocitos o neuritas y su composición principal es Abeta42 (Perl, 2010). Pueden estar presentes en personas sanas sin síntomas de demencia.



**Figura A.6. Clasificación de las placas amiloides.** Las placas neuríticas pueden ser de tipo fibrilar (placas primitivas) (A1 y A2), o clásicas (B1 y B2), con núcleo denso compuesto principalmente por Abeta42 y un halo. Las placas difusas (C) presentan una morfología indefinida. Inmunohistoquímica (A1, B1, C1) doble para Abeta (azul) y fosfo-Tau (marrón); (A2, B2, C2) simple para Abeta42. Imágenes cedidas por el grupo de la Dra. Antonia Gutiérrez.

En contra de la hipótesis de la cascada amiloide (Hardy y Allsop, 1991; Hardy y Higgins, 1992), actualmente hay evidencias de que estas placas podrían no ser el principal agente causal de la neurodegeneración y la respuesta inflamatoria en la patología (Cline et al., 2018; Karran y De Strooper, 2016; Makin, 2018; Ricciarelli y Fedele, 2017). Sin embargo, la deposición de amiloide sí correlaciona con el riesgo de una progresión del deterioro cognitivo leve hacia la EA (Hane et al., 2017), lo que parece indicar que diferentes estructuras moleculares de Abeta presentes en el parénquima cerebral deben contribuir a la neuroinflamación y a la pérdida neuronal típicas de la enfermedad (Benilova et al., 2012; Viola y Klein, 2015).

#### 2.4. Abeta intracelular

El péptido Abeta también se acumula en el citosol y en diferentes compartimentos subcelulares (mitocondria, lisosomas y retículo endoplásmico) de la neurona (Gouras et al., 2015; Sun et al., 2015), pudiendo causar disfuncionalidad en los mismos (Kuruva y Reddy, 2017). El Abeta intraneuronal puede originarse por fallos en la liberación tras su síntesis (Takahashi et al., 2017), o en su reinternalización a través de receptores extracelulares específicos, como la subunidad  $\alpha 7$  del receptor nicotínico (Ma y Qian, 2019; Wang et al., 2000), el receptor LDL (Zerbinatti et al., 2006) o los receptores NMDA (Bi et al., 2002). La acumulación de Abeta intracelular se atribuye a los primeros estadios de la EA (Bayer y Wirths, 2010), ya que se produce en las 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).

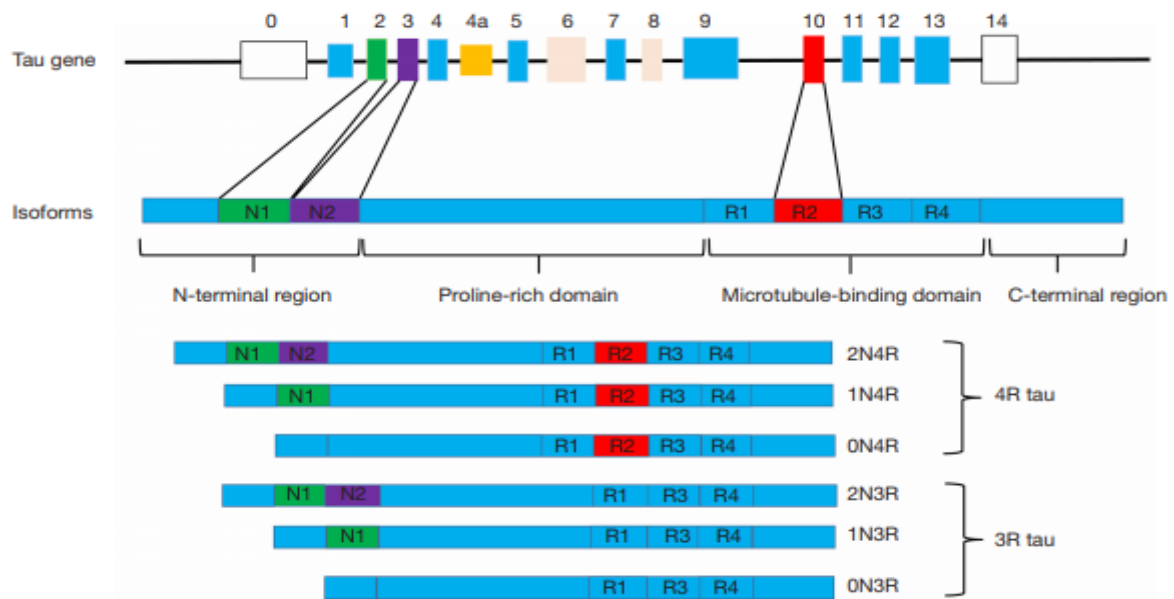
El Abeta intraneuronal podría alterar la función mitocondrial y del proteasoma, provocar una disfunción sináptica, potenciar la hiperfosforilación de Tau (LaFerla et al., 2007), originar déficits en la LTP (Billings et al., 2005) e incluso la muerte neuronal (Bayer y Wirths, 2010).

### 3. PROTEÍNA TAU Y PATOLOGÍA NEUROFIBRILAR

#### 3.1. Estructura y Función de Tau

Tau es una proteína soluble perteneciente a la familia de las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs; del inglés, *microtubule associated proteins*), que se expresa predominantemente en neuronas. Está codificada por el gen MAPT, que contiene 16 exones y está localizado en el cromosoma 17 (Neve et al., 1986). Mediante splicing alternativo, se pueden generar 6 isoformas con tamaños entre 352-441 aminoácidos (Kosik, 1990; Wang y Mandelkow, 2016) (Figura A.7). Cada isoforma se caracteriza por la presencia o ausencia de fragmentos (N) de 29 ó 58 aminoácidos en el extremo N-terminal, y de una secuencia de 31-32 aminoácidos que se repite 3 ó 4 veces en el extremo C-terminal (R) y que constituye el “dominio de unión a microtúbulos”. Por tanto, las isoformas de Tau pueden ser: 0N3R, 0N4R, 1N3R, 1N4R, 2N3R o 2N4R. En el cerebro humano sano hay cantidades similares de Tau 3R y 4R, pero no ocurre lo mismo en enfermedades neurodegenerativas (Gao et al., 2018). En el desarrollo fetal, Tau se distribuye por todo el citoplasma neuronal, pero a medida que maduran las neuronas, se elimina del soma y se sitúa exclusivamente en el axón.

Tau estabiliza y regula la estructura y la dinámica de los microtúbulos neuronales y favorece su polimerización. Además, interviene en procesos de señalización y de organización del citoesqueleto, lo que depende de su estado de fosforilación (Avila et al., 2004). Recientemente, se ha implicado a Tau en el mantenimiento de la integridad del ADN frente a estrés oxidativo, en la regulación de la actividad neuronal, la neurogénesis, la exportación de hierro, la regulación de la insulina cerebral y la depresión a largo plazo (Gao et al., 2018; Mroczko et al., 2019).



**Figura A.7. Gen MAPT e isoformas de Tau.** El gen MAPT presenta 16 exones. N1 y N2 están codificados por los exones E2 (verde) y E3 (morado), respectivamente. La repetición R2 está codificada por el exón E10 (rojo). Los exones E1, E4, E5, E7, E9, E11, E12 y E13 constituyen el componente básico de la proteína Tau (azul). E0 y E14 son no codificantes (blanco). E4a (amarillo) se transcribe sólo en tejido periférico y E6 y E8 no se expresan en el cerebro humano (rosa). La isoforma de Tau está compuesta por 4 regiones: región N-terminal, dominio rico en prolina, dominio de unión a microtúbulos y región C-terminal. Mediante procesamiento alternativo de los exones E2, E3 y E10, se generan 6 isoformas principales de Tau expresadas en el cerebro humano. Imagen tomada de Gao et al., 2018.

### 3.2. Fosforilación de Tau

Tau presenta 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 condiciones fisiológicas, existe un equilibrio entre fosforilaciones y desfosforilaciones necesario para sus funciones fisiológicas. Sin embargo, su hiperfosforilación anómala produce modificaciones estructurales que dificultan su unión a microtúbulos. Se ha demostrado que la fosforilación en Ser208 promueve la agregación de Tau y las fosforilaciones en Ser202 y Thr205 conllevan su deslocalización hacia el soma y las dendritas (Xia et al., 2020). Como consecuencia, se producen agregados intracelulares que interrumpen el transporte axonal y provocan disfunción neuronal (Guo et al., 2017).

En el estado de fosforilación de Tau están implicadas más de 20 quinasas (Gao et al., 2018; Oliveira et al., 2017), entre las que destacan GSK-3 $\beta$  (*glycogen synthase kinase 3*) y Cdk5 (*cyclin dependent kinase 5*), y varias fosfatasa, principalmente PP2A y PP1 (Liu y Götz, 2013; Ma et al., 2017). Además, niveles altos de Abeta y/o el estrés oxidativo, pueden provocar una desregulación en la actividad de las quinasas

de Tau (Moore et al., 2015). Tau puede sufrir además otras modificaciones postraduccionales que afectan a su estado de agregación, como glicosilación, acetilación o ubiquitinación.

La quinasa GSK-3 $\beta$  está constitutivamente activa en el SNC, aunque su actividad está regulada a su vez por fosforilaciones y desfosforilaciones en diferentes sitios (Lauretti et al., 2020). Además, sus niveles de expresión aumentan con la edad (Lee et al., 2006). GSK-3 $\beta$  también está implicada en la formación y acumulación de Abeta ya que APP y PS1 pueden ser sus sustratos (Cai et al., 2012), y además puede regular la actividad catalítica de BACE-1 (Ly et al., 2013). Es más, algunos estudios proponen un mecanismo de retroalimentación entre GSK-3 $\beta$  y Abeta que aumentaría la hiperfosforilación de Tau (Lauretti et al., 2020). Por otro lado, la quinasa CDK5 está formada por dos subunidades: la unidad catalítica Cdk-5 y el polipéptido p25, que actúa como unidad reguladora. La sobreexpresión de p25 aumenta la fosforilación de Tau y la transcripción de BACE-1 mediada por CDK5, dando lugar a un procesamiento aberrante de Abeta (Cortés et al., 2019; Gupta y Singh, 2019).

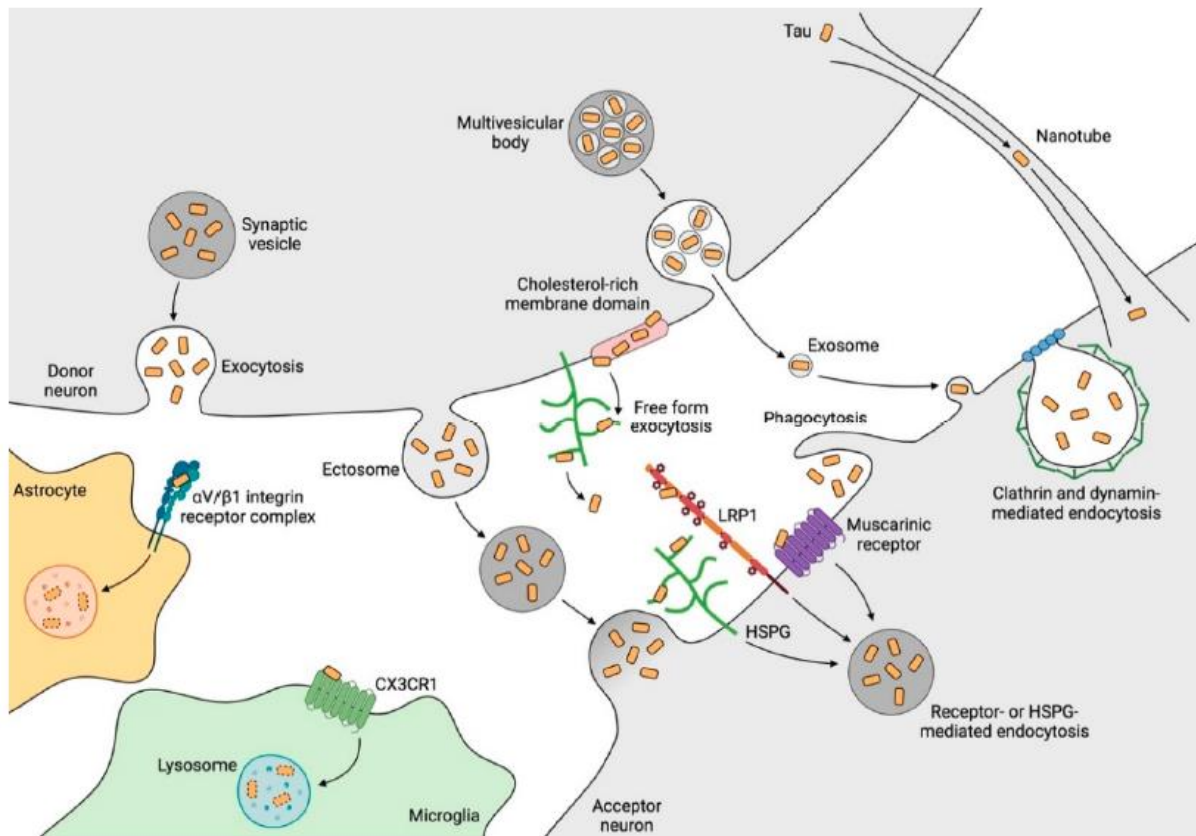
Aunque actualmente no existen fármacos en ensayos clínicos en fase III dirigidos hacia la patología Tau, 17 fármacos se encuentran en fase I, II o II/III. Dada la implicación de la GSK3 $\beta$ , se han desarrollado diferentes inhibidores contra esta diana, siendo el más estudiado el cloruro de litio (Hampel et al., 2019; Torres et al., 2012). Por otro lado, el inhibidor de GSK3 $\beta$  ANAVEX 2-73 ha mejorado la realización de tareas cotidianas en pacientes con deterioro cognitivo leve (Parmentier et al., 2019). Además, otras moléculas que disminuyen la agregación de Tau, como LUCIDITY o Nilotinib, están siendo evaluadas en ensayos en fase II (Medina, 2018). Por otra parte, al igual que en la terapia dirigida contra Abeta, existen proyectos de inmunización activa o pasiva contra Tau (Gauthier et al., 2020).

### **3.3. Tau soluble hiperfosforilado**

Aunque la cuantificación e interpretación del perfil de fosforilación de Tau es complicada (Kimura et al., 2018), diversos estudios asocian su patrón de fosforilación con la progresión de la patología de Alzheimer (Barthélemy et al., 2020; He et al., 2018; Zempel et al., 2010). En el LCR de pacientes con LOAD, se acumula Tau fosforilado en Thr217 aproximadamente 21 años antes del inicio de la sintomatología y, posteriormente, se detecta Tau fosforilado en Thr181, seguido de Thr205 (13 años antes del inicio de la patología) (Barthélemy et al., 2020). Estos indicios apuntan a que la trayectoria de fosforilación de Tau podría usarse como biomarcador precoz de la enfermedad (Barthélemy et al., 2020; Quiroz et al., 2018).

Tau hiperfosforilado se disocia de los microtúbulos, lo que altera el transporte de organelas, principalmente de mitocondrias hacia la sinapsis, desregula la homeostasis del calcio (Calvo-Rodriguez et al., 2020) y produce la activación de caspasas. Como consecuencia, se produce una pérdida de espinas

dendríticas y sinapsis, e incluso muerte neuronal (Kopeikina et al., 2012; Ma et al., 2017). Además, Tau soluble hiperfosforilado se agrega, combinando diferentes isoformas, dando lugar a oligómeros solubles como dímeros y trímeros (Frost et al., 2009; Mroczko et al., 2019). Estos trímeros son considerados la unidad mínima de propagación espontánea desde el parénquima hasta el interior celular (Frost et al., 2009; Mirbaha et al., 2015). Aunque inicialmente se pensaba que Tau extracelular provenía de la degeneración axonal y la muerte neuronal (Blennow et al., 1995), actualmente existen claras evidencias de que la propagación de Tau entre células y entre distintas regiones cerebrales puede producirse por diversos mecanismos como la secreción directa a través de la membrana, o a través de ectosomas, exosomas y nanotúbulos de membrana (Figura A.8) (Brunello et al., 2019; Goedert y Spillantini, 2017; Perea et al., 2020; Vogels et al., 2019). Los agregados de Tau en el espacio extracelular son internalizados por células vecinas, tanto gliales (a través de complejos de receptores de integrinas en astrocitos y del receptor CX3CR1 en microglía) como neuronales (mediante los receptores LRP1, HPGs o muscarínicos). Esto origina un modelo de propagación, probablemente de tipo priónica (Holmes y Diamond, 2014), que empeora la patología.

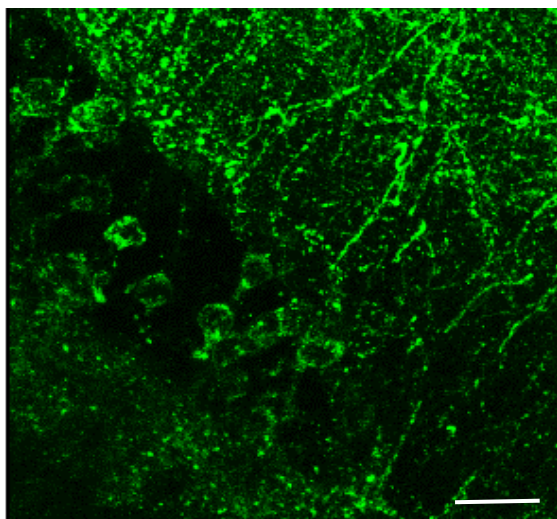


**Figura A.8. Agregación y propagación de Tau.** Los monómeros de Tau soluble disociados de los microtúbulos se ensamblan en oligómeros que se propagan por distintas vías, no excluyentes entre sí. La transferencia patológica de Tau entre células puede tener lugar por secreción directa, ectosomas, exosomas o nanotúbulos de membrana. Las neuronas internalizan el Tau soluble mediante los receptores LRP1, HSPG y receptores muscarínicos; y las células gliales a través de receptores de integrinas, en el caso de los astrocitos, y el receptor CX3CR1, en la microglía. Imagen tomada de Perea et al., 2020.



### 3.4. Ovillos neurofibrilares de Tau

Los ovillos neurofibrilares (NFTs o *Tangles*) son agregados intracelulares formados por pares de filamentos helicoidales (PHFs), cuyo componente mayoritario es la proteína Tau hiperfosforilada (Figura A.9) (Frosch, 2017; Gao et al., 2018; Spillantini y Goedert, 2013). Se han descrito más de 38 sitios de hiperfosforilación de Tau en PHFs aislados de pacientes de Alzheimer (Hanger et al., 2007). Los NFTs pueden acumularse en el soma neuronal y en los procesos neuríticos en forma de filamentos de neuropilo, así como en neuritas distróficas rodeando el núcleo amiloide de las placas neuríticas (Bancher et al., 1987; Braak et al., 1986). Existen distintas enfermedades que presentan agregados intracelulares anormales de Tau hiperfosforilado, conocidas como “tauopatías” (Kovacs, 2017), que se diferencian según la composición y morfología de los filamentos y su distribución en el cerebro. Además de la EA, se incluyen en las tauopatías la parálisis supranuclear progresiva, la demencia frontotemporal (FTD) y el parkinsonismo relacionado con el cromosoma 17 (FTDP-17), entre otros. Se han descrito en torno a 50 mutaciones de Tau ligadas a la FTD (Olszewska et al., 2016), mientras que ninguna se ha asociado al Alzheimer Familiar.



**Figura A.9. Agregados intracelulares de Tau.** Tau fosforilado se acumula en el interior neuronal formando ovillos neurofibrilares. Inmunohistoquímica de fluorescencia para fosfo-Tau (AT8) en el hipocampo de ratones TAU P301S de 9 meses. Barra de escala: 25  $\mu$ m.

Los enfermos de Alzheimer presentan un patrón típico de distribución de las lesiones neurofibrilares con la evolución de la enfermedad, que se divide en seis etapas conocidas como estadios de Braak (Braak y Braak, 1991; Braak et al., 2006; Malek-Ahmadi et al., 2020). Para asignar el estadio Braak, se evalúa principalmente la fosforilación de Tau en los residuos Ser202/Thr205, aunque se está estudiando el patrón de fosforilación de otros residuos (Neddens et al., 2018; Trushina et al., 2019). 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), por lo que sigue un patrón diferente al de la patología Abeta. Los síntomas de la EA generalmente aparecen cuando los agregados de tau y los depósitos de Abeta coinciden en la neocorteza (Hane et al., 2017).

## 4. PATOLOGÍA NEURÍTICA, PÉRDIDA NEURONAL Y SINÁPTICA

La EA se caracteriza por una extensa pérdida de sinapsis y neuronas (Forner et al., 2017) que afectan a regiones cerebrales relacionadas con funciones de aprendizaje y memoria, lo que origina el declive cognitivo característico de esta enfermedad.

### 4.1. Disminución de la densidad sináptica

La disfunción y pérdida sináptica es el hallazgo que mejor correlaciona con el declive cognitivo patológico observado en la EA (Colom-Cadena et al., 2020). En este sentido se ha descrito que, antes de la muerte neuronal, se produce una pérdida de un 25-35% de las sinapsis en la corteza entorrinal e hipocampo de pacientes de EA (Gómez-Isla et al., 1996; Overk y Masliah, 2014). Numerosos estudios tratan de esclarecer las relaciones moleculares entre Abeta, Tau y las alteraciones sinápticas (Spires-Jones y Hyman, 2014). Aunque Abeta participa de manera fisiológica en el desarrollo de las sinapsis, niveles elevados de este péptido disminuyen la excitabilidad neuronal. Sin embargo, la carga total de placas no es el factor que mejor correlacione con el declive cognitivo (Nelson et al., 2012), sino que son las formas solubles de Abeta las que presentan mayor toxicidad sináptica (Cline et al., 2018; DaRocha-Souto et al., 2011; Lesné et al., 2013; Li y Selkoe, 2020).

Por otro lado, se han descrito numerosos mecanismos a través de los cuales Tau regula la función sináptica y cómo sus cambios patológicos pueden producir sobreactivación o internalización de los receptores NMDA en la terminal postsináptica (Chen y Mobley, 2019; Spires-Jones y Hyman, 2014), disrupción del tráfico de mitocondrias y receptores hacia las sinapsis, y alteración de la señalización de calcio, entre otros (Ittner y Ittner, 2018). Al igual que en el caso de Abeta, las formas solubles de Tau parecen ser las responsables de los fallos sinápticos (Ittner y Ittner, 2018; Perez-Nievas et al., 2013).

### 4.2. Pérdida neuronal

En la EA se produce una degeneración neuronal selectiva que afecta progresivamente a regiones y tipos celulares concretos (Jeong, 2017), fundamentalmente a la región CA1 del hipocampo (Price et al., 2001) y a la capa II de la corteza entorrinal (Gómez-Isla et al., 1996), 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), a la parte medial de la sustancia negra, a la parte rostral del locus coeruleus (Busch et al., 1997) y al núcleo del rafe serotoninérgico (Aletrino et al., 1992). En los mecanismos de muerte neuronal están implicados tanto Abeta como Tau (Bloom, 2014; Spires-Jones y Hyman, 2014; Tripathi y Kalita,



2019), así como las especies reactivas de oxígeno, las alteraciones mitocondriales, la sobreactivación de receptores de glutamato y el incremento en la concentración citoplasmática de calcio (Jeong, 2017).

### **4.3. Patología neurítica**

Las neuritas distróficas asociadas a las placas seniles aparecen de forma temprana en la EA y preceden a la pérdida sináptica y a la muerte neuronal (Masliah et al., 1991; Sanchez-Varo et al., 2012; Torres et al., 2012). Son prolongaciones neuronales engrosadas originadas por alteraciones del citoesqueleto y contienen numerosas vesículas donde se acumula APP, BACE1,  $\gamma$ -secretasa, especies solubles y tóxicas de Tau hiperfosforilado, etc. (Sadleir et al., 2016; 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).

## **5. PATOLOGIA VASCULAR**

Existen claras evidencias de que la EA está asociada con deficiencias en la función cerebrovascular, que incluyen la hipoperfusión de zonas vulnerables, la deposición directa del péptido amiloide en la pared de los capilares (angiopatía amiloide) y la disfunción de la barrera hematoencefálica (BHE) (Sweeney et al., 2019). Se ha demostrado que la disfunción cerebrovascular es un evento temprano en la enfermedad (Di Marco et al., 2015; Iturria-Medina et al., 2016), lo que sugiere que sería un potenciador de la progresión de la patología más que una simple consecuencia. De hecho, se ha propuesto que la hipoperfusión que se observa mediante técnicas de neuroimagen podría considerarse como un marcador preclínico de la EA (Hays et al., 2016). Además, la isquemia cerebral puede alterar por sí misma las funciones cognitivas y agravar las deficiencias inducidas por Abeta (Perosa et al., 2020). Es más, la hipoxia podría incrementar el procesamiento de la proteína APP por la vía amiloidogénica (Salminen et al., 2017; Zhang et al., 2007) y reducir la expresión de enzimas implicadas en la degradación de Abeta (Kerridge et al., 2015), aumentando así los niveles del péptido. Por otro lado, la hipoperfusión también promueve la hiperfosforilación de la proteína Tau (Fang et al., 2010), altera la producción de ATP, aumenta el estrés oxidativo y contribuye a la neuroinflamación (Lall et al., 2019).

## **6. NEUROINFLAMACIÓN Y RESPUESTA GLIAL**

Aunque históricamente el SNC ha sido calificado como un órgano inmunoprivilegiado, investigaciones más recientes han descrito un sistema especializado de drenaje linfático en la duramadre (Absinta et al., 2017; Aspelund et al., 2015) así como la capacidad de la BHE para comunicarse con células del sistema inmune periférico (Zenaro et al., 2017).

La neuroinflamación es un proceso común a numerosas enfermedades neurodegenerativas e implica la participación del sistema inmune innato del SNC, coordinado principalmente por la microglía y la astrogía, pero también por células endoteliales, dendríticas y células del sistema inmune adaptativo. En respuesta a un antígeno, las células gliales liberan mediadores inflamatorios (González et al., 2014; Liu et al., 2014) para revertir el daño y recuperar las condiciones fisiológicas. Sin embargo, ante la presencia continuada del agente desencadenante, como los depósitos amiloides o los ovillos neurofibrilares, la neuroinflamación se puede cronificar, favoreciendo un ambiente de estrés oxidativo y procesos de neurotoxicidad y degeneración tisular (Heneka et al., 2015a; Heppner et al., 2015).

Durante años, en la EA, se ha considerado al sistema inmune como un observador pasivo de la cascada patogénica, que simplemente respondía al daño infligido por los agregados proteicos. Estudios recientes en modelos animales de EA combinados con secuenciaciones genéticas masiva de pacientes (estudios GWAS), han asignado a la respuesta inmune un papel más activo en la patogénesis de la EA, y han permitido acuñar el término de “componente celular” para referirse a las complejas interacciones entre neuronas, glía y vasculatura que ocurren en el cerebro de pacientes de Alzheimer (De Strooper y Karran, 2016; Gutierrez y Vitorica, 2018; Prokop et al., 2019). Los estudios GWAS han identificado numerosos polimorfismos en genes involucrados en la respuesta inmune cerebral asociados a la forma esporádica de la enfermedad, como TREM2, TYROBP, CD33, CR1, CLU, ABCA7, HLA-DRB5/HLA-DRB1, MS4A y EPHA1 (Dansokho y Heneka, 2018; Korvatska et al., 2015; Lambert et al., 2013; Shao et al., 2017; Sims et al., 2017).

Clásicamente, se ha asociado el progreso de la EA con un incremento de actividad inflamatoria en el SNC, por lo que se han propuesto terapias dirigidas a frenar dicha respuesta para tratar la enfermedad. Sin embargo, la mayoría de variantes genéticas que aumentan el riesgo de padecer LOAD suponen una pérdida total o parcial de funciones implicadas en procesos claves de la respuesta inmune (Shao et al., 2017), lo que hace cuestionarse la terapéutica antiinflamatoria. Definir los perfiles funcionales (neuroprotector, neurotóxico y/o degenerativo) de la microglía y de los astrocitos con el progreso de la EA contribuirá indudablemente a plantear estrategias terapéuticas más eficientes y seguras para luchar contra la enfermedad (Dansokho y Heneka, 2018; Prokop et al., 2019).

### **6.1. Microglía**

Los primeros indicios sobre la microglía fueron descritos en 1899 por Franz Nissl, que identificó un grupo celular con capacidad migratoria y fagocítica en el cerebro (Nissl, 1899). En las primeras décadas del siglo XX, la escuela española de neurología fundada por Santiago Ramón y Cajal contó con dos neurólogos cruciales para la historia de la microglía: Nicolás Achúcarro y Lund, y Pío del Río Hortega (de Castro, 2019). Aunque Achúcarro fue responsable de los trabajos iniciales, su muerte prematura empujó

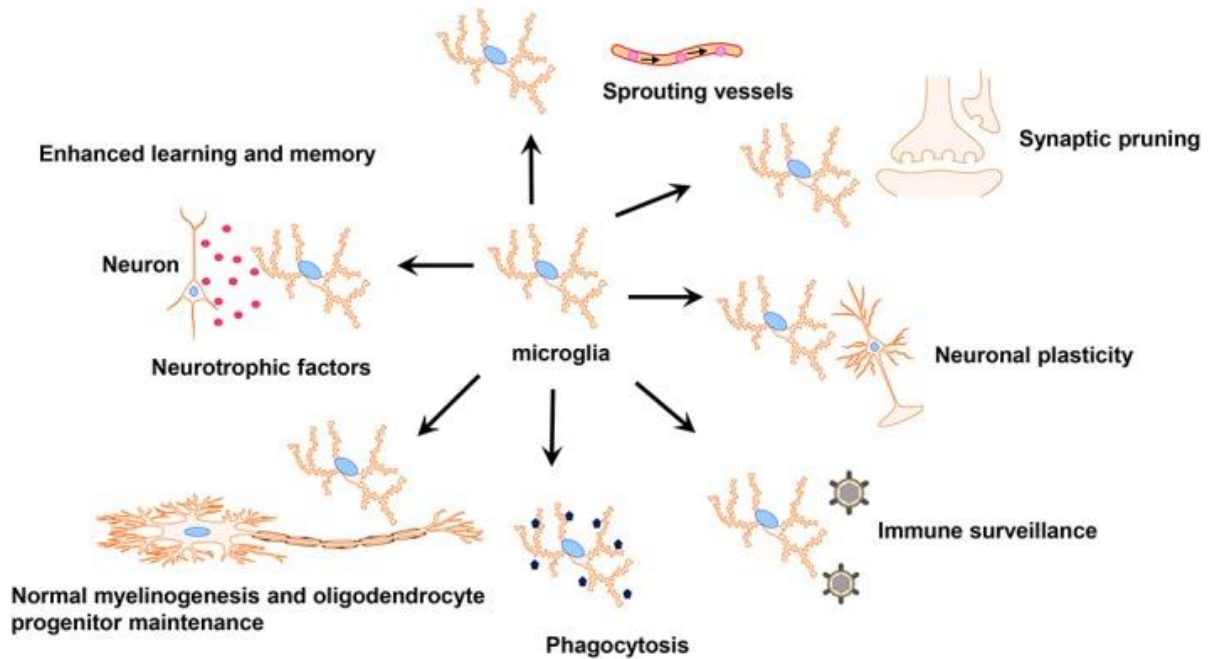
a su alumno Río Hortega a completar sus ensayos. Río Hortega modificó los métodos de tinción propuestos por su mentor, lo que le permitió visualizar con más detalle dos nuevos tipos celulares: microglía y oligodendroglía. A pesar de que este hallazgo desencadenó cierta confrontación con Cajal y otros miembros de la institución (Tremblay et al., 2015), del Río continuó con su estudio, y describió por primera vez la microglía como células pequeñas con numerosas ramificaciones y capacidad plástica (Sierra et al., 2016).

Pío del Río-Hortega otorgó un origen mesodérmico a las células microgliales (Tremblay et al., 2015), concepto que se ha mantenido durante décadas. Sin embargo, actualmente, se ha demostrado que las células microgliales se originan en el saco vitelino a partir de células progenitoras eritropoyéticas y migran al cerebro, donde se propagan, extienden y ramifican, constituyendo hasta un 16% del total de células del SNC adulto en humanos (Ginhoux et al., 2013) y un 5-12% en ratón (Lawson et al., 1990). Presentan una distribución regional, con mayor densidad en la sustancia blanca que en la gris. Su homeostasis y auto-renovación está determinada por varios factores, entre los que destacan la señalización por TGF $\beta$  y CSF1R (Butovsky et al., 2014) (Ginhoux et al., 2010). Defectos genéticos en CSF1R o su ablación farmacológica reducen drásticamente el número de microglía. CSF1R une dos ligandos: IL-34, secretado por neuronas (excepto en el cerebelo) y CSF1, secretado por neuronas y glía. Ambas moléculas presentan conformaciones similares y se unen al receptor CSF1R en sitios superpuestos; sin embargo, sólo CSF1 es esencial para el desarrollo (Chitu et al., 2016). En la vida adulta, se estima que un 28% de la microglía se renueva cada día, siendo la vida media de estas células 4,2 años (Réu et al., 2017).

### **6.1.1. Funciones fisiológicas**

Durante el desarrollo del SNC, la microglía participa en la remodelación de las sinapsis y en el establecimiento y organización de las complejas redes neuronales (Schafer y Stevens, 2015). En la edad adulta, continúa implicada en la supervivencia y diferenciación neuronal, así como en la plasticidad sináptica y prevención de la excitotoxicidad (Colonna y Butovsky, 2017, Schafer et al., 2012) (Figura A.10). La microglía sensa continuamente el entorno a través de sus prolongaciones dinámicas, contactando con neuronas, astrocitos y vasos sanguíneos. Frente a una alteración, adquiere un estado activado con morfología ameboide y se encarga de fagocitar y eliminar microbios, células muertas, agregados proteicos y antígenos solubles (Colonna y Butovsky, 2017). La amplia variedad de receptores presentes en la microglía (PRRs, del inglés *pattern recognition receptors*), principalmente los TLRs (de sus siglas en inglés, *toll-like receptors*), le permite detectar señales asociadas a daño, (DAMPs, del inglés *damage associated molecular patterns*), o a patógenos (PAMPs, del inglés *pathogen associated molecular patterns*). En esta situación, se activan numerosas vías de señalización que producen la liberación de mediadores inflamatorios como factores de necrosis tumoral (TNFs), interleuquinas (ILs, como IL1 $\beta$ ), interferones y quimiocinas. Estos factores activan al resto de células implicadas en la respuesta inmune

a la vez que, de manera paracrina y autocrina, retroalimentan la activación microglial (Cherry et al., 2014; Gomez-Nicola y Perry, 2015). Además, se produce el ensamblaje de los inflamasomas, que activa a la caspasa 1 y el procesamiento de ILs (Rathinam y Fitzgerald, 2016). Concretamente, en la microglía juega un papel fundamental el inflamasoma NLRP3, activado por proteínas mal plegadas, agregados de Abeta, proteínas priónicas y componentes del sistema del complemento (Heneka et al., 2018).



**Figura A.10. Funciones fisiológicas microgliales.** La microglía lleva a cabo diferentes funciones para mantener la homeostasis del SNC: presenta capacidad fagocítica, mejora la plasticidad sináptica y participa en el mantenimiento de los progenitores de oligodendrocitos y en la mielinogénesis, en la vigilancia inmune del entorno, en la poda sináptica, y en la neoformación de vasos. Imagen tomada de Han et al., 2019.

Clásicamente, la microglía activa se ha clasificado en dos fenotipos funcionales extremos, atendiendo a la señal de activación y a la respuesta desencadenada: fenotipo clásico (M1), que generan una respuesta pro-inflamatoria y citotóxica, y fenotipo alternativo (M2), responsable de una respuesta pro-supervivencia, regeneradora y antiinflamatoria. Esta clasificación de la microglía está siendo actualmente cuestionada (Masgrau et al., 2017; Ransohoff, 2016), ya que las células microgliales raramente muestran una polarización completa hacia un fenotipo y coexisten varios tipos en la patología (Colonna y Butovsky, 2017; Leyns y Holtzman, 2017). Los estudios de célula única suponen una poderosa herramienta para descifrar la heterogeneidad de los estadios microgliales, que no sólo dependen del tipo de estímulo, sino también de la localización en el SNC, de la edad del individuo y del microambiente.

### **6.1.2. Metabolismo microglial**

El metabolismo microglial se basa en los conceptos generales del metabolismo de macrófagos, que ante una activación pro-inflamatoria (respuesta a LPS, INF- $\gamma$ ) aumentan la glucólisis y alteran la fosforilación oxidativa (OXPHOS) (Bossche et al., 2017; Pearce y Pearce, 2013; Rodriguez-Gomez et al., 2020). Este metabolismo anaerobio permite una rápida producción de ATP, balanceada con síntesis de macromoléculas, para responder al daño. En estas condiciones, el ciclo de ácidos tricarbóxicos se interrumpe y sus intermediarios se destinan a la producción de citoquinas y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Jha et al., 2015; Tannahill et al., 2013). Estos cambios afectan a la morfología mitocondrial, que sufre fusiones y fisiones para adaptar su capacidad bioenergética (Rambold y Pearce, 2018). En contraposición, en presencia de estímulos anti-inflamatorios (por ejemplo IL-4), aumenta el metabolismo oxidativo y se produce una activación alternativa orientada a la reparación tisular y mediada por el eje AKT-mTORC1 (Covarrubias et al., 2016; Jung et al., 2019).

A día de hoy, el metabolismo microglial no está completamente caracterizado (Borst et al., 2019; Bernier et al., 2020), aunque estudios *in vitro* corroboran el patrón descrito para macrófagos: la activación microglial M1 incrementa la glucólisis anaerobia y disminuye la función mitocondrial, vía inducción de óxido nítrico (Chénais et al., 2002; Ghosh et al., 2018; Gimeno-Bayón et al., 2014; Moss y Bates, 2001; Palmieri et al., 2020). Sin embargo, en la polarización a M2, la microglía en cultivo no modifica su metabolismo respecto al estado quiescente (Orihuela et al., 2016). Por otro lado, las aproximaciones transcriptómicas en modelos animales reflejan un aumento de genes implicados tanto en glucólisis como en OXPHOS (Zhang et al., 2014). Por tanto, se requieren nuevos estudios que utilicen tecnologías emergentes (Bernier et al., 2020) para definir con exactitud cómo los cambios metabólicos influyen en la progresión de patologías, con especial interés en la EA.

### **6.1.3. Papel de la microglía en la patología de la EA**

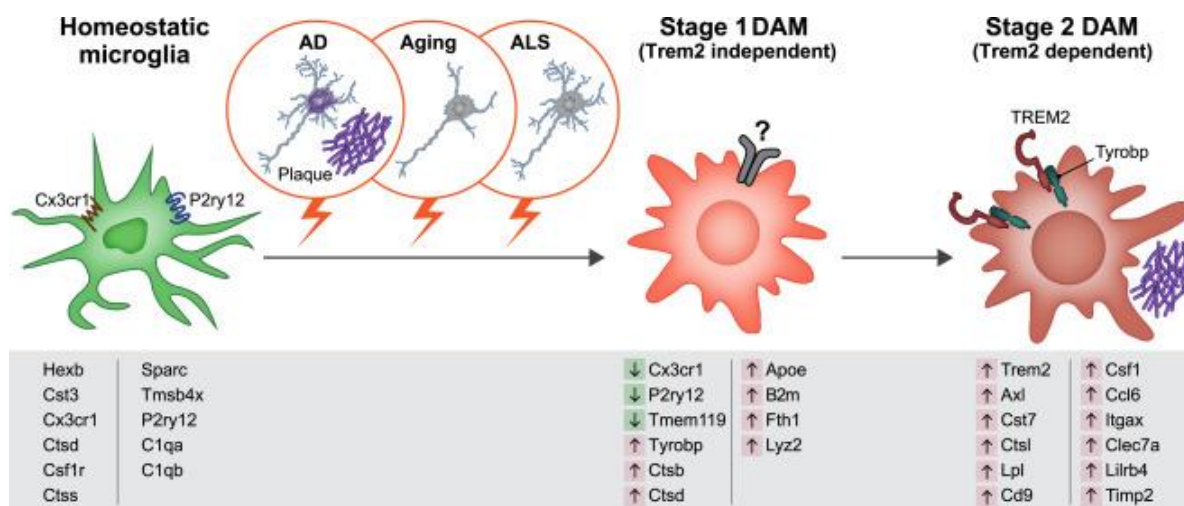
Aunque actualmente está claro que la microglía tiene una implicación esencial en la patología de Alzheimer, su papel parece ser dual y complejo, pudiendo desempeñar una función perjudicial o insuficientemente protectora en estadios avanzados de la enfermedad (Gutierrez y Vitorica, 2018; Navarro et al., 2018). Como se ha mencionado anteriormente, los estudios de GWAS han identificado numerosos polimorfismos en genes asociados con la función microglial considerados factores de riesgo para la EA. Destacan mutaciones en Trem2 (Guerreiro et al., 2013; Jonsson et al., 2013; Korvatska et al., 2015) y en el receptor de superficie CD33 (Bradshaw et al., 2013; Griciuc et al., 2013; Zhao, 2019), ambos implicados en la activación y/o internalización microglial del péptido Abeta (Bradshaw et al., 2013; Guerreiro et al., 2013; Yeh et al., 2017). Además, durante el envejecimiento, principal factor de riesgo del LOAD, la microglía sufre cambios morfológicos y moleculares hacia la hiperreactividad, y una posterior

pérdida progresiva de sus funciones (Colonna y Butovsky, 2017; Flanary et al., 2007; Mosher y Wyss-Coray, 2014; Watanabe et al., 2017).

#### 6.1.3.1. *Perfil genético en la activación microglial*

En los últimos años, se han identificado a nivel transcripcional los perfiles microgliales específicos en diversos modelos de enfermedades neurodegenerativas. De esta forma, se ha caracterizado el fenotipo microglial en modelos amiloidogénicos (Keren-Shaul et al., 2017; Krasemann et al., 2017; Mrdjen et al., 2018; Ofengeim et al., 2017), de tauopatías (Friedman et al., 2018; Leyns y Holtzman, 2017; Wang et al., 2018), y de otras enfermedades neurodegenerativas, como la esclerosis lateral amiotrófica (Spiller et al., 2018) y la esclerosis múltiple (Krasemann et al., 2017), así como en el envejecimiento (Mrdjen et al., 2018; Olah et al., 2018). Estas investigaciones concluyen que en la activación microglial disminuye de la expresión de genes “homeostáticos” (Cx3cr1, P2ry12, P2ry13, Tmem119, y Cd33) (Butovsky et al., 2014) y se induce un programa genético denominado DAM (del inglés, *disease-associated microglia*) (Keren-Shaul et al., 2017), caracterizado por un incremento en la expresión de diversos genes como: (i) Csf1, Clec7a e Igf-1; (ii) Trem2, ApoE y Tyrobp, asociados con un mayor riesgo de padecer Alzheimer (Lambert et al., 2013), y (iii) genes implicados en fagocitosis/degradación lisosomal, respuesta inmune y endocitosis (Hashemiaghdam y Mroczek, 2020). Dentro de este clúster microglial, se ha descrito un subgrupo denominado MGnD (del inglés, *microglia neurodegenerative phenotype*) con una firma molecular caracterizada por el aumento de 28 genes inflamatorios (Spp1, Tfgax, Axl, Lilrb4, ApoE, Clec7a, etc.) y que correlaciona con placas neuríticas de Abeta y con las distrofias neuríticas (Krasemann et al., 2017).

Aunque no se conocen con detalle los mecanismos que regulan el cambio de fenotipo microglial, se han identificado factores transcripcionales dependientes de señales inflamatorias (NFkB, Proteína activadora 1, Factores Reguladores de INF, p53 o STATs), en contraposición con otros que median un estado homeostático y de inspección del entorno (Pu.1, Sall1, Maf) (Holtzman et al., 2017). La transición a fenotipo DAM parece, además, ser un proceso secuencial, mediado por la señalización Trem2-ApoE (Figura A.11) (Hickman y Khoury, 2014; Keren-Shaul et al., 2017; Krasemann et al., 2017; Ulland et al., 2017). Es más, Trem2 soluble aumenta en el LCR de pacientes con deterioro cognitivo leve (Suárez-Calvet et al., 2016), e induce cambios morfológicos y la producción de citoquinas en la microglía (Zhong et al., 2017).



**Figura A.11. Mecanismo secuencial de activación microglial DAM.** La transición de microglía homeostática a microglía DAM pasa por una primera fase, independiente de Trem2 y que cursa con una disminución de la expresión de genes homeostáticos (“Stage 1 DAM”). A continuación, le sigue una segunda fase, dependiente de Trem2, que supone la activación de genes esenciales para la fagocitosis y el metabolismo lipídico (“Stage 2 DAM”). Se muestran los genes clave implicados en cada estado; las flechas indican el incremento (rojo) o disminución (verde) de su expresión. Imagen tomada de Keren-Shaul et al., 2017.

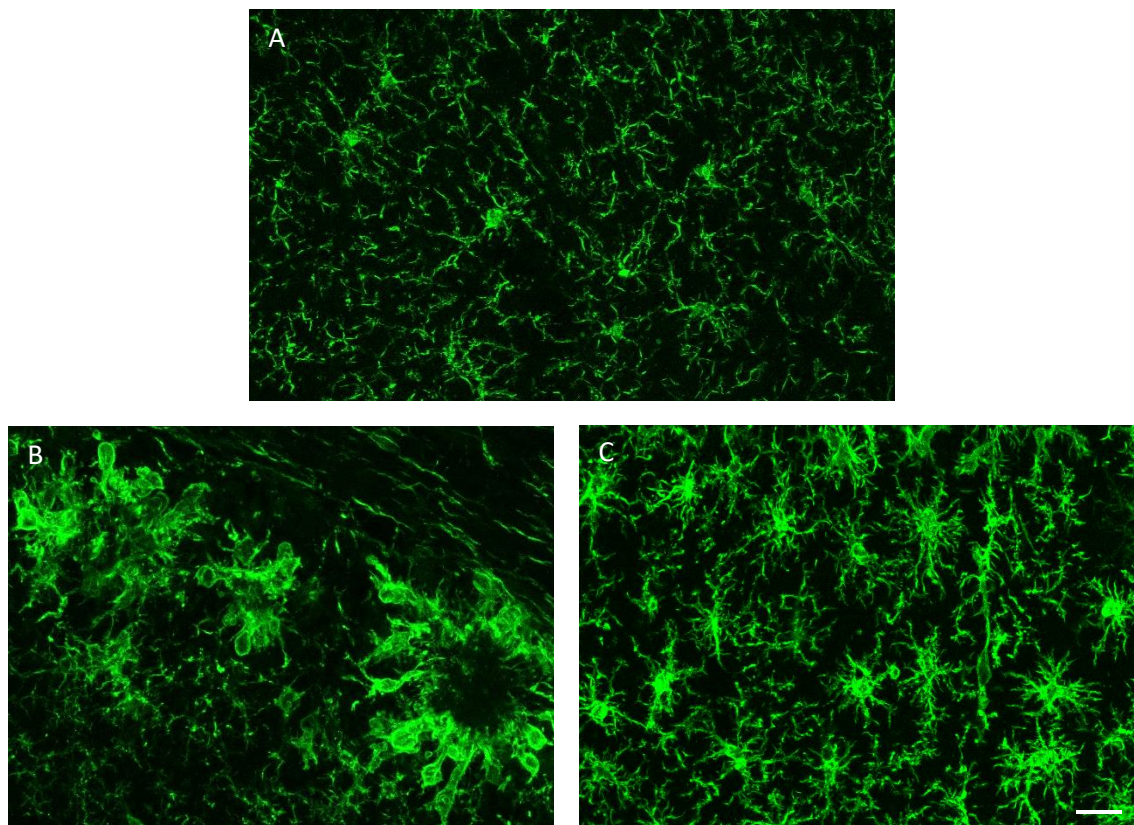
En procesos neurodegenerativos, incluida la EA, se han descrito múltiples estados de activación microglial que podrían corresponder a distintos papeles de estas células en la progresión de la patología (Hansen et al., 2018; Stratoulis et al., 2019). Además, la activación microglial puede estar influenciada por el sexo, la edad y los polimorfismos genéticos interindividuales (Sala Frigerio et al., 2019). Sin embargo, en los estadios finales de la enfermedad, la desregulación genética parece originar en la microglía un patrón de expresión de respuesta global a estrés común con otros tipos celulares (Mathys et al., 2019).

Recientemente, gracias a novedosos avances metodológicos, se ha caracterizado el perfil genético de la microglía humana en la EA, HAM (del inglés, *human Alzheimer’s microglia*) (Srinivasan et al., 2019). La firma genética HAM comparte la mitad de su perfil de expresión con la microglía de individuos controles, es decir, manifiesta cambios asociados a un envejecimiento fisiológico. En contraste, apenas comparte perfil de expresión con la firma DAM, siendo ApoE el único gen que aumenta significativamente en ambos clústeres (Srinivasan et al., 2019). Sin embargo, Thrupp et al. (2020) han reportado que estas diferencias podrían deberse a limitaciones de la técnica experimental, por lo que deben refinarse las nuevas aproximaciones metodológicas antes de establecer conclusiones sólidas.



### 6.1.3.2. *Actividad microglial en respuesta a las patologías Abeta y Tau*

Los depósitos de Abeta atraen a una población de células mieloides conocida como microglía asociada a placa, (PAM, del inglés *plaque-associated microglia*) (Figura A.12 B) (Malm et al., 2005; Yin et al., 2017), que se caracteriza por un aumento de genes pro-inflamatorios y genes implicados en la respuesta fagocítica (Boza-Serrano et al., 2019; Shukla et al., 2019; Yin et al., 2017). Este clúster microglial suele relacionarse a su vez con el concepto de microglía “oscura”, que hace referencia a células microgliales con elevados niveles de estrés oxidativo, remodelación de la cromatina nuclear y un citoplasma denso y oscuro (Bisht et al., 2016; St-Pierre et al., 2020). Esta microglía podría constituir una barrera protectora frente a la toxicidad de la placa, promoviendo su compactación y aislamiento (Yuan et al., 2016). Además, la fagocitosis activa de Abeta oligomérico por la microglía (Mandrekar et al., 2009), junto con la actividad proteolítica de las enzimas que secreta (Nixon y Yang, 2011), impiden el crecimiento de la placa (Bolmont et al., 2008). Este proceso se asocia a la neuroinflamación descrita en modelos animales amiloideos de EA, en los que la activación microglial se inicia alrededor de las placas y se expande con el avance de la patología por todo el parénquima cerebral (Jimenez et al., 2008, 2011).



**Figura A.12. Activación microglial en modelos de patología de Alzheimer.** La microglía homeostática (A) presenta una morfología ramificada, mientras que la microglía activa (B, C) presenta un engrosamiento del cuerpo celular y las prolongaciones. Inmunohistoquímica de fluorescencia para microglía (tinción Iba1) en el hipocampo de ratones WT (A), ratones con patología amiloide (APP; la microglía se dispone alrededor de las placas) (B) y ratones con patología Tau (TAU P301S) (C). Barra de escala: 20  $\mu$ m.



Paralelamente, la microglía parece responder a la patología de Tau a través de distintos mecanismos que incluyen su activación (Figura A.12 C) y la secreción de citoquinas (Bhaskar et al., 2010) (Maphis et al., 2015), la propagación de depósitos de Tau (Asai et al., 2015; Hopp et al., 2018) o la capacidad de fagocitar y degradar depósitos de Tau (Bolós et al., 2015; Luo et al., 2015; Majerova et al., 2014). En contraposición, otros autores sugieren que la respuesta microglial es independiente de la progresión de la patología Tau (Streit et al., 2014; Zhu et al., 2020), o incluso que la microglía podría ser incapaz de responder a la elevada toxicidad de Tau soluble (Sanchez-Mejias et al., 2016; Streit et al., 2009).

En este sentido, en cerebros envejecidos, se ha descrito una microglía senescente caracterizada por una morfología distrófica e incapaz de realizar eficazmente sus funciones (Flanary et al., 2007; Mosher y Wyss-Coray, 2014; Savage et al., 2019). Esta disfuncionalidad microglial parece estar agravada en la EA (Lopes et al., 2008; Mosher y Wyss-Coray, 2014; Tischer et al., 2016) debido a la presencia tanto de depósitos amiloides (Flanary et al., 2007; Gyoneva et al., 2016; Krabbe et al., 2013) como de patología Tau (Sanchez-Mejias et al., 2016; Streit et al., 2009). Nuestro grupo de investigación ha caracterizado un proceso de degeneración microglial en el hipocampo de pacientes de Alzheimer, mediado por formas tóxicas solubles de Tau fosforilado (Sanchez-Mejias et al., 2016). Esta respuesta microglial difiere llamativamente del fenotipo hiperreactivo citotóxico observado en la mayoría de modelos murinos (Gutierrez y Vitorica, 2018; Navarro et al., 2018; Prokop et al., 2019; Romero-Molina et al., 2018). Por consiguiente, es imprescindible dilucidar el papel de la microglía en la progresión de la patología de Alzheimer, que probablemente dependa de la coyuntura contextual.

## 6.2. Astrocitos

Los astrocitos son las células gliales más abundantes del SNC (~35%) y también participan en la respuesta neuroinflamatoria. Aunque morfológicamente son muy heterogéneos, presentan una estructura estrellada con múltiples prolongaciones que conectan con vasos sanguíneos, neuronas, oligodendrocitos, microglía y otros astrocitos. La proteína Gfap (del inglés, *Glial fibrillary acidic protein*), es el componente principal de la red de filamentos intermedios del citoesqueleto de los astrocitos, y por tanto, el marcador más usado para identificarlos. Otras proteínas abundantemente expresadas en los astrocitos son vimentina (Vim), aldehído deshidrogenasa (Aldh) y glutamina sintetasa (Gs) (Phillips et al., 2014; Sofroniew y Vinters, 2010; Verkhratsky et al., 2014).

### 6.2.1. Funciones fisiológicas

Los astrocitos desarrollan múltiples funciones fundamentales para la homeostasis general del SNC (Pestana et al., 2020). Por un lado, contribuyen a la captación de glucosa sanguínea para dar soporte energético a las neuronas (Verkhratsky et al., 2019), a las que además suministran compuestos

antioxidantes, factores tróficos (VEGF, GDNF, bFGF) y otros elementos esenciales para su soporte metabólico. Además, eliminan toxinas del LCR, liberan factores quimiotáxicos, mantienen el equilibrio hidro-salino del parénquima cerebral y contribuyen a la reparación y cicatrización del SNC (Phillips et al., 2014). Los pies astrocitarios forman parte de la BHE, participando en su mantenimiento, proporcionando soporte bioquímico a las células endoteliales y regulando el paso selectivo de sustancias (Ota et al., 2013). Paralelamente, controlan el flujo de agua a través de las acuaporinas (Aqp1 y Aqp4) (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018) y el “drenaje glinfático”, por el que se produce el aclaramiento paravascular de solutos tóxicos (Ries y Sastre, 2016). Por otro lado, los astrocitos regulan funciones neuronales y sinápticas, y a su vez la actividad neuronal también regula el transcriptoma de los astrocitos (Covelo y Araque, 2018; Hasel et al., 2017).

Un insulto agudo o crónico en el SNC origina una activación y un cambio morfológico de los astrocitos, conocida como astrogliosis (Sofroniew y Vinters, 2010), que se caracteriza por la inducción de las proteínas Gfap y Vimentina, implicadas en el engrosamiento de las prolongaciones y el aumento del tamaño del soma (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018; Zamanian et al., 2012). La activación astrocítica puede ejercer un efecto tanto beneficioso como perjudicial para las células de su entorno (Leyns y Holtzman, 2017; Liddeloy y Barres, 2017; Liu et al., 2014; Sofroniew y Vinters, 2010). Además, la deficiencia de cualquiera de sus funciones podría desencadenar o empeorar la disfunción neuronal en distintos procesos neurodegenerativos (Cragolini et al., 2019).

### **6.2.2. Papel de los astrocitos en la patología de la EA**

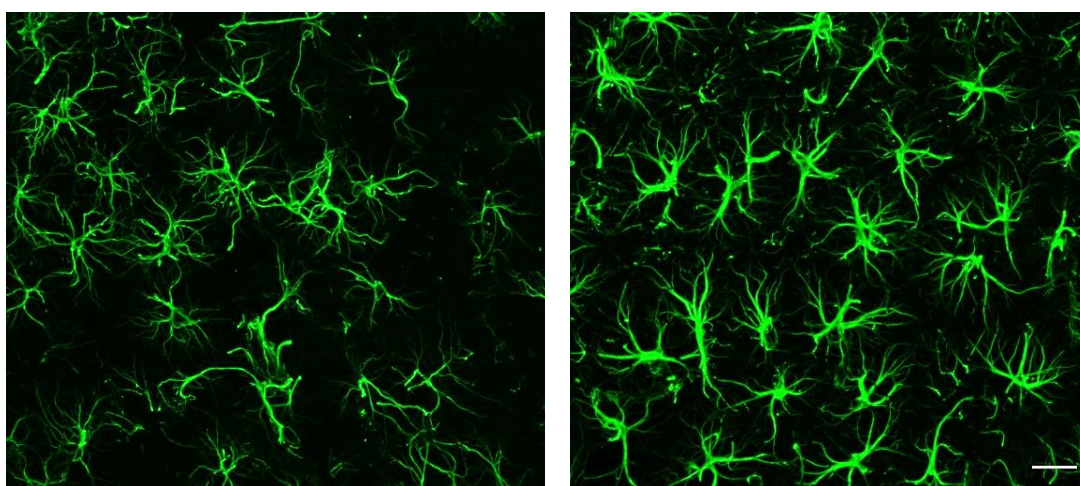
En cerebros *post mortem* de enfermos de Alzheimer, así como en ratones transgénicos modelos de la enfermedad, se produce una reactividad astrocitaria generalizada (Figura A.13) (Cai et al., 2017; Verkhatsky et al., 2019), que se inicia en los primeros estadios de la enfermedad y progresa significativamente a medida que evolucionan la patología amiloidea y de Tau (Garwood et al., 2017; Heneka et al., 2015b).

Los astrocitos reactivos se localizan alrededor de las placas amiloides, lo que sugiere que los depósitos y los oligómeros de Abeta desencadenan la activación astrogliar (Medeiros y LaFerla, 2013; Walsh y Selkoe, 2020). Paralelamente, los factores pro-inflamatorios liberados tras su activación podrían inducir la producción de Abeta en los astrocitos (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). En contraposición, los astrocitos reactivos también podrían tener un papel protector, ya que forman una barrera física alrededor de las placas e intervienen en procesos de captación, aclaramiento y degradación de Abeta (Ries y Sastre, 2016; Verkhatsky et al., 2019). Por otro lado, el cambio morfológico asociado a la activación astrogliar afecta a los pies astrocíticos, produciéndose alteraciones en la integridad de la BHE y contribuyendo así a las alteraciones cerebrovasculares típicas de la EA (Acosta et al., 2017). Como

consecuencia, se acentúa la deposición de Abeta (Cai et al., 2017, 2018; Ries y Sastre, 2016), y se origina un bucle de retroalimentación positiva que agrava el proceso.

Evidencias recientes parecen indicar que los astrocitos poseen un papel neuroprotector en los inicios de la patología, que podría disminuir con la progresión de la enfermedad, probablemente debido a una pérdida de sus funciones fisiológicas y/o a una ganancia de función tóxica (Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). En este sentido, se ha relacionado la progresión de la EA con deficiencias metabólicas en el SNC, donde los astrocitos tienen un papel fundamental (Le Douce et al., 2020; Muñoz-Castro, 2021; Sanchez-Mico, 2019; Verkhratsky et al., 2019; Zhou et al., 2020).

Diversos estudios transcriptómicos han identificado dos fenotipos de reactividad astrogliar, según el estímulo que lo genere: A1 y A2. La neuroinflamación parece inducir un fenotipo A1, caracterizado por un perfil inflamatorio que aumenta la expresión de genes que provocan destrucción sináptica (por ejemplo, genes de la cascada del complemento) (Liddelow et al., 2017). La adquisición del fenotipo A1 depende, en cierta medida, de la interacción con la microglía y se modula por la presencia del alelo  $\epsilon 4$  del ApoE, al menos en modelos animales (Liddelow y Barres, 2017; Shi et al., 2017). Por otro lado, los daños por isquemia producen un fenotipo A2 (Liddelow et al., 2017; Zamanian et al., 2012), caracterizado por un incremento en la expresión de factores neurotróficos, que promueven la supervivencia y crecimiento neuronal, y trombospondinas, que favorecen la reparación de sinapsis. Sin embargo, probablemente esta división en dos fenotipos contrapuestos no representa la realidad (Chai et al., 2017; John Lin et al., 2017; Sosunov et al., 2014), y los astrocitos presenten fenotipos dispares en función de la región en la que se encuentran y/o del estímulo que reciban.



**Figura A.13. Activación astrogliar.** Inmunohistoquímica fluorescente para el marcador astrogliar Gfap. A la izquierda, astrocitos quiescentes del cerebro de un ratón WT. A la derecha, astrocitos activos en el cerebro de un ratón modelo de EA (TAU P301S). La activación astrogliar se caracteriza por un aumento de la expresión de Gfap, del tamaño del cuerpo celular y un engrosamiento de las prolongaciones. Barra de escala: 20  $\mu\text{m}$ .

### 6.3. Interacción microglía-astrocitos en la respuesta inmune innata

Recientemente, se ha postulado que la activación microglial supone la liberación de citoquinas implicadas en la activación astrocítica (Vainchtein y Molofsky, 2020). La señalización a través de receptores purinérgicos induce una polarización astrocitaria hacia un fenotipo mayoritariamente A2 (Yeh et al., 2017), mientras que la liberación de IL1 $\alpha$ , TNF $\alpha$  o C1q conlleva una polarización hacia una respuesta A1 (Liddel et al., 2017). A su vez, la liberación de moléculas pro-inflamatorias por parte de los astrocitos amplifica la respuesta inflamatoria microglial. Concretamente, la liberación de lipocalina-2, de MCP-1 (del inglés, *chemoattractant protein 1*) o del factor C3 del complemento potencian la microgliosis (Lian et al., 2016; Yang et al., 2020). En contraste, los astrocitos también pueden secretar TGF $\beta$ , GDNF u orosomucoide-2 que inhiben la activación microglial (Jha et al., 2018), conteniendo parcialmente la neuroinflamación.

### 6.4. Mediadores de la respuesta inflamatoria

Se han descrito diversas citoquinas mediadoras de la respuesta inflamatoria en la EA, de naturaleza pro-inflamatoria (TNF $\alpha$ , FASL, CH3L1, IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$ , IL6 e IL12a) y anti-inflamatoria (IL13, IGF1, TGF $\beta$ , IL10, IL4) (Heneka et al., 2015b; Leyns y Holtzman, 2017). Algunos ejemplos de quimioquinas y sus receptores con implicaciones importantes en la EA son CCL2/CCR2, CXCL10/CXCR3, CX3CL1/CX3CR1, CXCL12/CXCR4, CXCL3/CXCR1, RANTES y CCL5 / CCR1, CCR2 y CCR5 (Colonna y Butovsky, 2017; Liu et al., 2014). La producción de quimioquinas por astrocitos y microglía en respuesta a citoquinas pro-inflamatorias del SNC podría mediar la migración de células del sistema inmune periférico desde el espacio perivascular hacia el parénquima cerebral (Fani Maleki y Rivest, 2019; Kierdorf et al., 2019). También cabe destacar la participación del sistema del complemento, que facilita la fagocitosis de los antígenos opsonizados o de células dañadas, e induce la liberación de citoquinas pro-inflamatorias (Morgan, 2018; Rajendran y Paolicelli, 2018). Todos los mediadores inflamatorios y sus receptores podrían ser potenciales dianas farmacológicas en enfermedades que cursan con neuroinflamación, como la EA.

### 6.5. Células inmunes asociadas al SNC

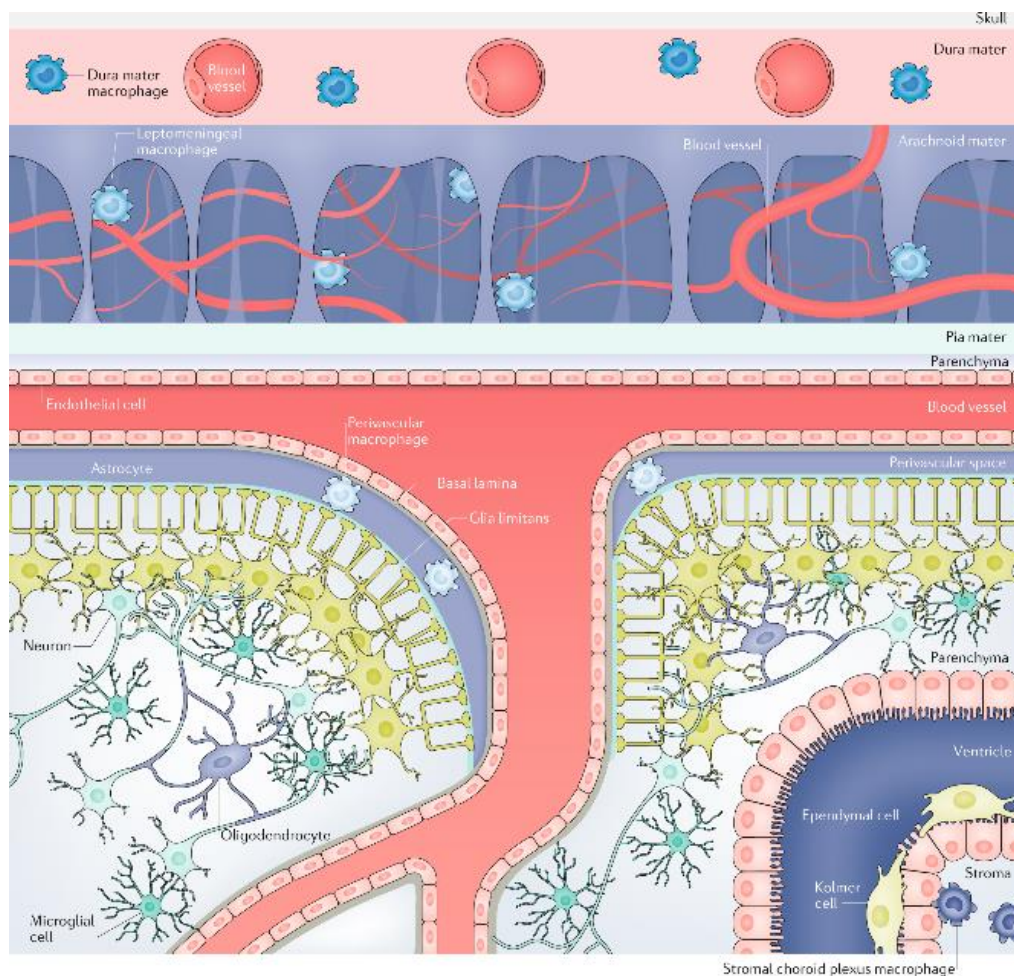
En condiciones fisiológicas, el SNC presenta una extensa red vascular que alberga una población heterogénea de células inmunes residentes que incluye a los macrófagos asociados al SNC, a monocitos, células derivadas de monocitos (CDM), células dendríticas (CD), neutrófilos, mastocitos y linfocitos. Durante la EA, las alteraciones vasculares ya mencionadas deterioran la BHE, posibilitando la entrada de células del sistema inmune periférico. Si la infiltración favorece o no la progresión de la patología es una cuestión pendiente de resolver. Sin embargo, podría compensar las funciones que la microglía endógena disfuncional ya no es capaz de cumplir (Prinz et al., 2011; Muñoz-Castro, 2021). De hecho, la entrada de



células externas podría estar inducida por citoquinas secretadas por la microglía vía señalización Ccr2 (Van Hove et al., 2019). Actualmente, no está definido si realmente existe infiltración de células inmunes periféricas en el cerebro de pacientes de Alzheimer, y qué tipo de células llegarían al parénquima, en caso de existir. A continuación se describen los principales candidatos.

### 6.5.1. Macrófagos asociados al SNC

Las poblaciones de macrófagos asociados al SNC más estudiadas son los macrófagos perivasculares, los macrófagos leptomeníngeos y los macrófagos del plexo coroideo (Figura A.14). Entre otras funciones, controlan la BHE y el intercambio de antígenos y metabolitos con el SNC, teniendo un papel fundamental la glucoproteína MRC1 (del inglés, *mannose receptor C-type 1*) y el receptor Cd163 (Kierdorf et al., 2019). En la EA, los macrófagos asociados al SNC podrían modular la entrada de células inmunes y su fenotipo durante la neuroinflamación (Jordão et al., 2019). Además, se ha propuesto su implicación en la regulación de la angiopatía amiloide cerebral puesto que un aclaramiento deficiente en los espacios perivasculares podría contribuir al cúmulo de depósitos de Abeta vasculares (Thériault et al., 2015).



**Figura A.14. Macrófagos asociados al SNC.** Los macrófagos asociados al SNC engloban a los macrófagos perivasculares, los macrófagos del plexo coroideo, los leptomeníngeos, los residentes en la duramadre y los asociados al epiplexo en el ventrículo (células de Kolmer). Imagen tomada de Kierdorf et al., 2019.

### **6.5.2. Monocitos y células derivadas de monocitos (CDM)**

Los monocitos y las CDM se localizan en la circulación sanguínea o mínimamente infiltradas en tejidos periféricos. Cada uno de los diferentes subtipos de monocitos responde rápidamente a daños produciendo citoquinas pro-inflamatorias (monocitos clásicos e intermedios) o reparando el daño tisular (monocitos no clásicos) (Fani Maleki y Rivest, 2019). En la EA, los monocitos clásicos pueden infiltrarse en el parénquima cerebral por un mecanismo dependiente de Ccr2, que se activa tras la liberación de Ccl2 o Cxcl1 por células residentes en el SNC (Zenaro et al., 2017). Mientras que algunas investigaciones afirman que los monocitos son capaces de eliminar Abeta (Naert y Rivest, 2013; Zenaro et al., 2017), publicaciones recientes discuten dicha función (Reed-Geaghan et al., 2020; Varvel et al., 2015), por lo que su papel en la EA es aún materia de debate.

### **6.5.3. Células dendríticas**

Las células dendríticas (CD) coordinan la respuesta innata y adaptativa, actuando como células presentadoras de antígenos, a través del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clases I y II (MHC I y II), y células fagocíticas. En condiciones fisiológicas, las CD están ubicadas en las meninges y en las zonas en contacto con el LCR, como los ventrículos y el plexo coroideo (Mrdjen et al., 2018). El hecho de que expresen marcadores que también pueden ser expresados por la microglía activa, como CD11c y MHC II, hace que aún se discuta su presencia en el parénquima cerebral (Brezovakova et al., 2018; Kamphuis et al., 2016). Por las mismas razones, aún existen discrepancias sobre la infiltración de CD durante la EA (Brezovakova et al., 2018), donde se propone que podrían participar en la eliminación de las placas amiloides (Butovsky et al., 2007) y en la presentación de péptidos de Abeta (Ludewig et al., 2016).

### **6.5.4. Linfocitos**

Los linfocitos son los principales efectores de la respuesta inmune adaptativa, pudiendo asumir un rol de célula efectora (linfocitos T) o de células humorales y presentadoras de antígenos (linfocitos B). Aunque en condiciones fisiológicas los linfocitos en el cerebro son escasos, su capacidad para secretar factores moduladores les permite influir en las células residentes del SNC (Greenhalgh et al., 2020). En tejido *post mortem* de individuos con EA, así como en modelos animales de la enfermedad, se han localizado linfocitos T tanto en el endotelio vascular como en el parénquima (Merlini et al., 2018; Pietronigro et al., 2019; Unger et al., 2018), si bien su papel en la progresión de la patología aún es controvertido (Dansokho et al., 2016; Späni et al., 2015).

## **B. Antecedentes y Objetivos**





A pesar de que a día de hoy existen unos 35 millones de enfermos de Alzheimer a nivel mundial (OMS 2020), no existe ningún tratamiento que cure o modifique el curso de esta enfermedad, que supone un grave problema sanitario y socio-económico. En las últimas décadas, la mayoría de las estrategias terapéuticas se han basado en atenuar la que se ha considerado la principal causa de la EA, la patología amiloide (Muñoz-Castro et al., 2020). Aunque algunos de los fármacos usados han logrado disminuir los niveles de Abeta, hasta el momento no se ha obtenido una adecuada relación riesgo-beneficio, lo que, sumado a otros factores, cuestiona la validez de la hipótesis de la cascada amiloide (Makin, 2018; Panza et al., 2019). Paralelamente, basándose en la estrecha correlación de la patología Tau con el déficit cognitivo en la enfermedad, también se han evaluado numerosos compuestos que disminuyen la fosforilación y agregación de Tau, aunque sin éxito (Medina, 2018; Muñoz-Castro et al., 2020). Debido al continuo fracaso terapéutico obtenido hasta la fecha, y a los estudios genéticos que asocian ciertos polimorfismos en genes implicados en la respuesta glial con un mayor riesgo de padecer la EA, la neuroinflamación asociada a la patología está cobrando gran importancia y está siendo considerada en los últimos años como una potencial diana terapéutica.

Las patologías amiloide y neurofibrilar se mantienen durante décadas en el cerebro de pacientes de Alzheimer, lo que hace que la neuroinflamación asociada a ellas se cronifique. En estas circunstancias, las características y función de las células microgliales no se conocen con exactitud. Nuestro grupo de investigación ha evaluado en los últimos años la respuesta microglial en modelos animales de EA y en muestras humanas *post mortem* de enfermos. En los modelos transgénicos con patología amiloide, la microglía se activa inicialmente alrededor de las placas mientras que, a edades avanzadas, la activación se extiende por todo el parénquima cerebral como consecuencia de un aumento de los oligómeros solubles de Abeta (Jimenez et al., 2008, 2011; Moreno-Gonzalez et al., 2009). Por un lado, dicha respuesta microglial podría contener la toxicidad de la patología amiloide compactando las placas y facilitando el aclaramiento de distintas formas de Abeta; pero, por otro lado, una activación microglial exacerbada podría aumentar la neurotoxicidad. Sin embargo, en muestras de hipocampo de pacientes de Alzheimer Braak V-VI, la activación microglial es limitada y existe un proceso de degeneración microglial en ciertas regiones hipocampales, donde predomina la tauopatía (Sanchez-Mejias et al., 2016; Navarro et al., 2018). Nuestro grupo de investigación ha demostrado que dicha degeneración microglial parece estar mediada por formas de Tau solubles (Sanchez-Mejias et al., 2016; Romero-Molina et al., 2018). Sin embargo, la respuesta microglial en modelos murinos con patología Tau ha sido menos estudiada. Dada la relevancia de la tauopatía en la EA, es fundamental conocer la respuesta microglial frente a las diferentes formas de fosfo-Tau.

Además, el hecho de que se haya demostrado que en ciertas regiones del hipocampo de pacientes de Alzheimer la microglía está distrófica y reduce su dominio microglial (Sanchez-Mejias et al., 2016; Streit et al., 2020), nos lleva a plantear que el ambiente tóxico y la activación crónica pueden afectar a la

viabilidad y a las funciones microgliales. Aparte de las especies solubles de fosfo-Tau, otros factores como la alteración en la disponibilidad de recursos o mutaciones en genes esenciales para su supervivencia podrían ser responsables de esta disfunción microglial. En esta línea, nuestros estudios recientes acerca del fenotipo astroglial en la patología de Alzheimer revelan que existe una disminución del metabolismo y una pérdida de las funciones neuroprotectoras de los astrocitos en modelos animales (Sanchez-Mico, 2019) y en pacientes (Muñoz-Castro, 2021) de EA. Por consiguiente, un entorno de neuroinflamación mantenido podría producir disfuncionalidad en las células gliales. Sin embargo, los mecanismos e interacciones subyacentes no se conocen.

Por otro lado, las discrepancias entre la respuesta microglial en los modelos animales de EA y las muestras humanas podrían explicar el fracaso en la traslación de resultados a la clínica humana y en la propuesta de dianas terapéuticas. Por ello, es fundamental entender con precisión el fenotipo microglial a lo largo del desarrollo de la EA, así como disponer de modelos animales que mimeticen fielmente la patología en pacientes, tanto el fenotipo de activación como de disfunción microglial.

En base a lo anteriormente expuesto, nuestro objetivo principal es conocer con precisión la respuesta microglial en las distintas coyunturas asociadas a la EA, lo que nos permitirá predecir la respuesta de estas células durante el desarrollo de la demencia y en presencia de otras patologías coetáneas. Nuestra hipótesis de trabajo es que el fenotipo microglial variará en función del grado de desarrollo de las patologías Abeta y Tau, así como de otras alteraciones del entorno. Es fundamental profundizar en el estudio de la activación microglial, caracterizando su perfil transcriptómico y metabolómico, a la vez que desarrollar un modelo de microglía disfuncional. Ambas aproximaciones serán esenciales para que la traslación de los resultados de modelos a humanos sea exitosa. Para ello, planteamos los siguientes objetivos específicos.

Objetivo 1 - **Estudiar el fenotipo microglial en modelos animales con patología Tau.** Dado que la tauopatía es el signo que mejor correlaciona con el declive cognitivo y, teniendo en cuenta que la respuesta microglial hacia la patología Abeta ya ha sido ampliamente caracterizada, consideramos necesario analizar el fenotipo microglial en distintos modelos murinos transgénicos con patología Tau, concretamente en los modelos ThyTAU22 y TAU P301S. Además, caracterizaremos qué formas de Tau son las responsables del fenotipo microglial específico de cada modelo.

Objetivo 2 - **Determinar el perfil transcriptómico y metabolómico de la microglía activa en modelos murinos.** Mediante el aislamiento de células microgliales activas del cerebro ratones con patología Abeta o Tau, caracterizaremos la expresión génica subsecuente a la activación e inferiremos las funciones que podrían derivar de dicho perfil transcriptómico. Además, analizaremos el metabolismo que sustenta la activación microglial crónica y las vías implicadas en el proceso.

Objetivo 3 - **Estudiar la función microglial en situaciones de baja disponibilidad de oxígeno.** Dado que las alteraciones vasculares son una característica típica de numerosas enfermedades neurodegenerativas, entre las que se incluye la EA, analizaremos si en los pacientes con estadios avanzados de la EA se produce una disminución de la disponibilidad de oxígeno. Así mismo, evaluaremos en modelos murinos si la función microglial frente a las patologías Abeta y Tau se altera en situaciones de hipoxia, así como sus principales consecuencias.

Objetivo 4 - **Desarrollar un modelo de depleción microglial.** Teniendo en cuenta el fenotipo microglial degenerativo observado en muestras de hipocampo de pacientes de EA en estadios Braak V-VI, es fundamental desarrollar y caracterizar un modelo murino que mimetice la disfuncionalidad microglial. Este modelo nos permitirá evaluar las consecuencias de la depleción y del recambio microglial en animales WT, así como en modelos de patología Abeta y Tau.



# **C. Materiales y Métodos**



## 1. MUESTRAS HUMANAS POSTMORTEM

Las muestras de tejido proceden de necropsias de individuos control y pacientes con Enfermedad de Alzheimer. La clasificación de los pacientes se ha realizado según los estadios de Braak en función de la patología Tau presente en el tejido cerebral (Braak y Braak, 1991). Las muestras controles proceden de individuos sin ninguna enfermedad psiquiátrica/neurológica conocida y sin lesiones típicas de EA. Las muestras han sido cedidas por i) el Dr. Alberto Rábano Gutiérrez Arroyo, director del Banco de Tejido para Investigación Neurológica (BTIN) de Madrid, perteneciente a la Fundación CIEN del Instituto de Salud Carlos III; ii) el Dr. Isidro Ferrer, del Instituto de Neuropatología y coordinador del Banco de Tejidos Neurológicos del Servicio de Anatomía Patológica, perteneciente al IDIBELL-Hospital Universitario de Bellvitge, de Barcelona; iii) el Banco de Tejidos Neurológicos BioBanc del Hospital clínico-IDIBAPS, en Barcelona; siguiendo en todos los casos las normas generales de la legislación española y del comité ético local. 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 por el Comité Ético de Investigación de los Hospitales Universitarios Virgen Macarena-Virgen del Rocío.

En la Tabla C.1, se detallan las medias de edad y el sexo de los grupos estudiados (basados en el estadio de Braak), así como el intervalo de tiempo transcurrido desde la muerte del individuo hasta la toma de la muestra. El tejido, una vez extraído, se mantiene a  $-80^{\circ}\text{C}$  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 y ARN (Apartado 9).

Estadio Braak	Género		Edad (años)	Tiempo <i>post mortem</i> (h)
	Masculino (%)	Femenino (%)		
<b>Braak 0 (n=6)</b>	66,67	33,33	49 ± 6	6,7 ± 3,4
<b>Braak II (n=17)</b>	52,94	47,06	78 ± 8,5	7 ± 4,6
<b>Braak III-IV (n=12)</b>	63,64	36,36	82,5 ± 8,1	6,1 ± 5,3
<b>Braak V-VI (n=22)</b>	57,14	42,86	75,3 ± 14,6	8,0 ± 3,2

**Tabla C.1. Datos de las muestras humanas analizadas.** Los individuos se clasifican según el estadio Braak y se especifican los porcentajes de individuos de cada sexo y los datos medios  $\pm$  desviación estándar de la edad y el tiempo transcurrido desde la muerte del individuo hasta la toma de muestra.

## 2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

### 2.1. Líneas transgénicas utilizadas

Hemos empleado ratones de entre 2 y 14 meses de edad de las líneas transgénicas que se citan a continuación. Como controles, hemos utilizado los correspondientes ratones no transgénicos (wildtype, WT) con el mismo fondo genético (C57BL/6) y edad.

- APP/PS1 (PS1 $\Delta$ exón9xAPPs) (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine): ratones doble transgénicos PS1dE9/APP<sub>S</sub>, que sobreexpresan el gen APP en su isoforma 695 con la mutación Swedish (K594M/M596L) descrita en casos de Alzheimer Familiar, y el gen PS1, que presenta una delección del exón 9 (PS1dE9), bajo el control del promotor PrP.
- APP (Sanofi-Aventis, París, Francia): simple transgénico APP<sub>SL</sub>, que sobreexpresa el gen APP751 humano con las mutaciones Swedish (KM670/671NL) y London (V717I) descritas en casos de Alzheimer Familiar, bajo el control del promotor Thy-1.
- ThyTAU22 (Sanofi-Aventis, París, Francia): expresan la forma humana de Tau de 4 repeticiones, con las mutaciones G272V y P301S, bajo el control del promotor Thy1.2 (Schindowski et al., 2006). Para este Trabajo, no hemos tenido acceso a la colonia, sino a muestras congeladas de estos ratones de distintas edades, lo que ha limitado nuestro abordaje experimental con este modelo.
- TAU P301S (Línea PS19) (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine): expresan la forma humana de Tau 4R/1N, con la mutación P301S, bajo el control del promotor de la proteína priónica (PrP) (Yoshiyama et al., 2007).
- CX3CSF1R: ratones procedentes del cruce de ratones Cx3Cr1<sup>CreER</sup> y CSF1r<sup>flox/flox</sup> (ambos de Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine). Utilizamos ratones homocigotos para CSF1r<sup>flox/flox</sup> y homo o heterocigotos para Cx3Cr1<sup>CreER</sup>. La expresión de Cre<sup>ER</sup> está controlada por el promotor CX3CR1, exclusivo de microglía, y es dependiente de tamoxifeno. La ablación específica de la correcta expresión del gen CSF1r nos permite disponer de un modelo de depleción microglial selectivo condicional (Kim et al., 2018) (ver Apartado 2.3.1).
- APPCX3CSF1R: ratones Cx3Cr1<sup>CreER</sup>/CSF1r<sup>flox/flox</sup> cruzados con ratones APP<sub>S</sub>, ambos descritos anteriormente.



Los animales se crían en el animalario del Centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla, a una temperatura media de 21°C, un 21% de oxígeno y un fotoperiodo de 14 horas de luz y 10 de oscuridad. Disponen de libre acceso al agua y a una dieta estándar. Todos los experimentos se han realizado en concordancia con las directrices del Parlamento Europeo y del Consejo (Directiva 2010/63/UE), siguiendo la normativa española para la protección de animales utilizados en experimentación (Real Decreto 53/2013). Todos los ensayos 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 se ha reducido al máximo, de acuerdo con la regla de las 3R (reemplazar, reducir y refinar).

## 2.2. Genotipado de los animales

El genotipado de los ratones transgénicos se ha realizado a partir de muestras de falanges de cada animal. Para ello, extraemos el ADN usando el kit Takara (Takara Bio INC, Japón): añadimos 150 µl de la solución Takara e incubamos 15 minutos a 95°C en agitación. El ADN extraído se utiliza para realizar una PCR convencional, utilizando el kit comercial MyTaq™ Red DNA Polymerase (Bioline, Londres, UK) y los cebadores correspondientes al gen de interés (ver Tabla C.2). Para cada gen utilizamos una cantidad concreta de ADN y un programa específico de amplificación (ver Tabla C.2).

Las muestras obtenidas se someten a electroforesis en gel de agarosa al 2%, al que se le añade el intercalante de ADN RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Corea Sur) al 5%, para separar las bandas de ADN según su tamaño. La electroforesis se realiza en tampón Tris-ácido Bórico-EDTA (TBE), a un voltaje constante de 200V durante 10 min. Finalmente, el gel se visualiza bajo luz UV, identificando la banda de interés por referencia al marcador de peso molecular.

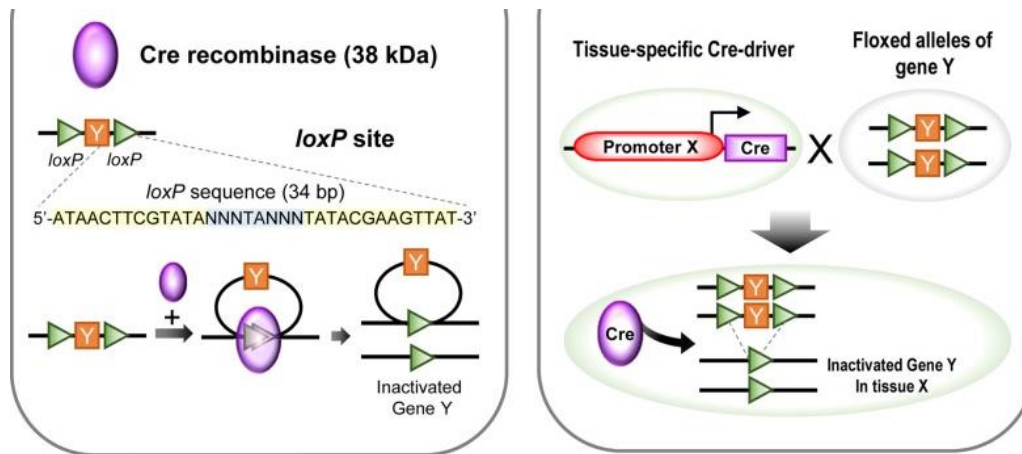
Gen	Cebadores	Cantidad de ADN	Programa de PCR
APP <sub>SL</sub>	5'-GGCTGAGGAACCCTACGAAGA-3' 5'-CAAAGTACCAGCGGGAGATCA-3'	1 µl	MyTAQ
hTAU-P301S	5'-GGC ATC TCA GCA ATG TCT CC-3' 5'-GGT ATT AGC CTA TGG GGG ACA C-3'	1 µl	MyTAQ
Cx3Cr1 <sup>CreER</sup>	CX3.Mt: 5' -CGG TTA TTC AAC TTG CAC CA-3' CX3.Cm: 5'-AAG ACT CAC GTG GAC CTG CT-3' CX3.Wt: 5'-AGG ATG TTG ACT TCC GAG TTG-3'	1 µl	Cx3.Mt: CreFlox Cx3.Wt: Bio58
CSF1 <sup>r<sup>flox</sup>/flox</sup>	5'-GGA CTA GCC ACC ATG TCT CC-3' 5'-CAT GGC TGT GGC CTA GAG A-3'	0.8 µl	CreFlox

**Tabla C.2. Cebadores, cantidad de ADN y programa de PCR utilizados para genotipar las diferentes líneas de animales transgénicos.** Mt=mutante; Cm=común; Wt=silvestre. Programas: MyTAQ= 95°C 1min; 36 ciclos (95°C 1min, 95°C 15seg, 55°C 15seg, 72°C 10seg). Cre/Flox= 95°C 2min, 10 ciclos, bajando 0.5°C/ciclo (94°C 20seg, 65°C 15seg, 68°C 10seg), 28 ciclos (94°C 15seg, 60°C 15seg, 72°C 10seg), 72°C 2min. Bio58= 95°C 1min, 35 ciclos (95°C 15seg, 58°C 15seg, 72°C 10seg).

## 2.3. Tratamientos de los animales de experimentación

### 2.3.1. Administración de Tamoxifeno para la activación del sistema Cre-LoxP

Para estudiar la depleción microglial *in vivo*, tratamos los ratones  $Cx3Cr1^{CreER}/CSF1r^{lox/lox}$  y  $APP-Cx3Cr1^{CreER}/CSF1r^{lox/lox}$  con tamoxifeno, que activa la recombinasa Cre. En este modelo, la enzima Cre está precedida por un promotor específico de células microgliales ( $Cx3Cr1$ ), por lo que sólo se expresa en dichas células. Como se muestra en la Figura C.1, una vez activa, la enzima Cre reconoce los sitios LoxP que flanquean el gen de interés, en este caso, una región concreta codificante del gen  $CSF1r$ , y produce su delección específica. Dado que  $CSF1r$  es esencial para la supervivencia microglial (Han et al., 2017), su expresión anómala conlleva la muerte de las células microgliales.



**Figura C.1. Representación esquemática del funcionamiento del sistema Cre-LoxP.** El tratamiento con tamoxifeno induce la activación de la recombinasa Cre en las células donde se expresa (en este caso, en células microgliales dado que el promotor es el gen  $Cx3Cr1$ ). La enzima Cre activa actúa sobre una región codificante del gen floxeado,  $CSF1r$ , produciendo su expresión anómala. Imagen modificada de Kim et al., 2018.

Para la administración intraperitoneal de tamoxifeno, diluimos el tamoxifeno en polvo (T5648, Sigma) (1.6 mg / 100  $\mu$ l) en etanol-aceite de maíz (C8267, Sigma) (1:5 v/v). Para la correcta disolución, añadimos primero el etanol y calentamos a 60°C durante 5 min. Una vez disuelto, se añade el aceite de maíz y se vuelve a calentar a 60°C durante 10 min hasta que las fases sean homogéneas. El preparado de tamoxifeno puede guardarse a 4°C durante 3 días hasta su uso, y siempre lo calentamos y comprobamos la homogeneidad de la solución antes de cada administración. Los animales se inyectan, utilizando agujas de 25G, durante 5 días consecutivos, 2 días de descanso y 2 días consecutivos (total de 7 días de tratamiento), a una dosis de 75 mg/kg de peso. Una vez finalizado el tratamiento, dejamos un tiempo de 0, 7, 14 o 21 días antes de sacrificar los animales. El segundo ciclo de tratamiento inyectado de tamoxifeno, se inicia 14 días tras el final del primer tratamiento, y consiste en un nuevo ciclo de 7 días de tratamiento, tras los que sacrificamos los animales a los 0, 7 y 14 días.

Para los ensayos de administración oral de tamoxifeno, se proporciona una dieta de pienso con tamoxifeno (250 mg/kg de pienso, Envigo) *ad libitum* durante 1, 2 o 4 meses, estimando que los ratones ingieren una dosis media diaria de tamoxifeno de 40 mg/kg. En este caso los animales se sacrificaron inmediatamente tras finalizar el tratamiento.



**Figura C.2. Esquema del tratamiento de los animales CX3CSF1R con tamoxifeno agudo y crónico.** El tratamiento agudo con tamoxifeno se realiza mediante inyecciones intraperitoneales diarias de 75 mg/kg de peso durante 7 días. Los ratones se sacrificaron 0, 7, 14 o 21 días tras la finalización del tratamiento. Para el tratamiento crónico, se administra una dieta *ad libitum* con pienso con tamoxifeno durante 1, 2 o 4 meses, estimando que los ratones ingieren una dosis media diaria de tamoxifeno de 40 mg/kg, y los animales se sacrifican inmediatamente al finalizar el tratamiento.

### 2.3.2. Cámara de hipoxia para animales

Los ratones TAU P301S de 8-9 meses y los ratones APP/PS1 de 14 meses se estabulan en una cámara con control de la concentración de oxígeno (Coy Laboratory Products, Inc., Grass Lake, MI), donde se someten a hipoxia (9% de oxígeno) durante 21 días. La alimentación, temperatura y ciclos de luz son comunes al resto de animales estabulados (ver Apartado 2.1). Además, la humedad y el CO<sub>2</sub> se controlan mediante la filtración del aire a través de Sodasorb (Grace) y silica gel absorbente (Panreac), respectivamente, usando una bomba conectada a los controladores de humedad y CO<sub>2</sub>. El acceso a la cámara para la alimentación y limpieza es posible gracias a una esclusa, que permite mantener las condiciones de la cámara. Una vez terminado el tratamiento, y antes del sacrificio y procesamiento del ratón (ver Apartado 2.4), se mide su hematocrito individual. Para ello, se extrae una muestra de sangre de la aurícula cardíaca derecha mediante un capilar y, por centrifugación diferencial a 5000 rpm durante 5 min (P Selecta Centrolit II), se diferencia el componente granular de la sangre, del plasma. El hematocrito se calcula como el porcentaje de parte granular (longitudes medidas), respecto al total de sangre del capilar. El hematocrito de los ratones hipóxicos es de un  $72,19 \pm 3,08$  %, mientras que los valores normales están en torno al 40-50 %, lo que nos confirma que los ratones han sido sometidos a un ambiente hipóxico.

### **2.3.3. Inyección de EdU**

El reactivo EdU (5-etinil-2'-deoxiuridina) es un análogo de la tiamina que se incorpora en la hebra de ADN durante su síntesis y que, por tanto, permite evaluar la proliferación celular (ver Apartado 19). Para estos experimentos, los ratones WT, TAU P301S y APP se someten a tres inyecciones intraperitoneales (aguja 25G) en días alternos con EdU (A10044, ThermoFisher) disuelto en PBS (1.5 mg/ 100 µl/día). Para la correcta disolución del EdU, la solución se incuba a 50° en agitación (700 rpm) durante 10 min. Los animales CX3CSF1R se tratan con EdU en paralelo al resto de los animales; en este caso, el tratamiento se inicia 5 días después de terminar un ciclo de inyecciones agudas de tamoxifeno (ver Apartado 2.3.1). Los animales se procesan dos días después de finalizar el tratamiento.

### **2.4. Obtención de muestras**

Para la obtención de las muestras, los animales se anestesian con pentobarbital sódico (Tiobarbital (Braun), 90-120 mg/Kg) y se perfunden transcardialmente con tampón fosfato salino PBS [ $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.1M (Merck) +  $\text{NaHPO}_4$  0.1M (Merck) +  $\text{NaCl}$  0.132M (Panreac), pH 7.4], durante 4 min a un flujo continuo de 10 ml/min, utilizando una bomba de perfusión (DINKO Mod. D-25V). A continuación, se decapitan y se extrae el cerebro. Los hemisferios destinados a estudios inmunohistoquímicos se fijan y crioprotegen: 24 h en solución fijadora PLP (paraformaldehído 4% (Merk), L-Lisina 75 mM (Merk) y metaperiodato sódico 10 mM (Merk) en tampón PBS) y 24-48 h en sacarosa (Applichem) al 30% diluida en PBS. Finalmente, se congelan de manera gradual y se mantienen a -80°C hasta su procesamiento. Para estudios bioquímicos de extracción de proteínas totales y/o ARN (ver Apartado 9), se separan las regiones cerebrales corteza e hipocampo y se congelan a -80°C hasta su uso. En cada diseño experimental, las muestras de diferentes genotipos y edades se procesan de forma simultánea.

## **3. CULTIVOS CELULARES**

Los cultivos celulares se incuban a 37°C, en una atmósfera humidificada con un 5% de  $\text{CO}_2$ . Su manipulación se lleva a cabo bajo condiciones de esterilidad.

### **3.1. Líneas celulares**

Se subcultivan 2-3 veces en semana, manteniendo una confluencia adecuada. Para ello, mediante un rascador (scraper) o mediante el uso de Trypsin 0,25%-EDTA 1 mM (Biowest) se recogen del frasco de cultivo y se resuspenden en el medio correspondiente, haciendo diluciones 1:5 ó 1:10 antes de sembrar de nuevo. El número de células y soporte utilizado en cada ensayo dependen de cada condición experimental.

### **3.1.1. Línea microglial BV2**

Esta línea deriva de la microglía neonatal murina raf/myc-inmortalizada, siendo una de la más utilizada en estudios de neurodegeneración (Stansley et al., 2012). Estas células se mantienen de forma rutinaria en medio DMEM-F12 w/o L-glutamine (Biowest), suplementado con glutamina 2 mM (Biowest), suero fetal bovino (SFB) 10% (Biowest), 100 U/ml de penicilina (Biowest) y 100 µg/ml de estreptomycin (Biowest).

### **3.1.2. Línea neuronal SH-Tau**

La línea SH-SY5Y-Tau (SH-Tau) es una línea celular humana de neuroblastoma que expresa constitutivamente la isoforma 3R de la proteína Tau humana (Hamdane et al., 2003). Se cultiva en medio DMEM-F12 (Biowest) suplementado con glutamina 2 mM, suero fetal bovino (10%), 100 U/mL de penicilina (Biowest), 100 µg/mL de estreptomycin (Biowest) y 1% de aminoácidos no esenciales (Biowest). Además, se añade el antibiótico G418 (0.2 µg/mL) para la selección clonal.

## **3.2. Cultivo mixto de microglía y astrocitos primarios**

Estos cultivos primarios se realizan según se describe en Jiménez et al. (2008). Previamente, las placas de cultivo utilizadas se tratan con poli-D-lisina (Sigma) a 100 µg/ml, durante 2 horas a 37°C, y posteriormente se lavan. Las células se extraen de la corteza e hipocampo de ratones CD1 neonatales (P1-P2). Tras la decapitación de las crías, se extrae el cerebro y se separan cortezas e hipocampos del resto del cerebro, trabajando en PBS (Biowest) frío con antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin). El tejido se homogeniza con tijeras de cirugía en Tripsina-EDTA 1x en PBS (Biowest) (250 µl/cerebro), se incuba a 37°C durante 5 min y se repite el proceso hasta que quede completamente homogeneizado. Posteriormente, se le añade medio completo con SFB, para inhibir la tripsina, y la suspensión de células obtenida se filtra por un filtro de nylon con un diámetro de poro de 40 µm (Fisher Scientific). Las células se siembran en placas de 24 pocillos, a una densidad de 500.000 células por pocillo (área por pocillo: 1.77 cm<sup>2</sup>; Nunc). Se mantienen en medio completo para cultivo mixto: DMEM-F12 suplementado con 10% SFB, 1X aminoácidos no esenciales (Biowest), 10 µg/ml de gentamicina (Biowest), 2 mM de L-Glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. A los 2 días, se retira la mitad del medio y se repone con medio nuevo. Cada 4 días, se renueva todo el medio.

### **3.2.1. Aislamiento de microglía**

La obtención de cultivos enriquecidos en microglía se realiza entre los 20 y 25 días del cultivo mixto. Se recoge el medio del cultivo, que se encuentra condicionado por los factores liberados por las células

(medio condicionado), y se reserva para añadirlo al final. Se realiza un lavado con PBS estéril, para retirar cualquier resto de suero, y se añade medio de aislamiento: DMEM-F12 y tripsina 0,25%-EDTA 1 mM (3:1). Las células se incuban durante 10-45 min a 37°C para que los astrocitos se levanten del cultivo, mientras que la microglía quede adherida a la placa. Cuando se detecta el levantamiento de los astrocitos, se añade medio completo de cultivos mixtos para inactivar la tripsina y se recoge el sobrenadante, donde se encuentran los astrocitos. Por un lado, tendremos la placa original en la que sólo queda la microglía, que se lava con PBS y se le añade el medio condicionado retirado previamente, mezclado con nuevo medio de cultivo en proporción 1:1. Por otro lado, los astrocitos se centrifugan a 800 x g durante 5 min, se resuspenden en medio de mixtos completo y se cultivan en placas de 24 pocillos (500.000 células/pocillo).

### **3.2.2. Silenciamiento de Trem2 en cultivos de microglía aislada**

El silenciamiento de Trem2 se realiza mediante ARN de interferencia. Utilizamos secuencias de shRNA (*small/short hairpin RNA*), que se transcriben en el núcleo celular a partir de un vector que contiene un promotor Pol III. El shRNA presenta secuencias sentido y anti-sentido del gen diana, en horquilla, que se transportan al citoplasma, donde son procesadas por la ribonucleasa Dicer. De esta manera, se obtiene el shRNA interferente que impide la expresión proteica del transcrito de interés, en este caso Trem2. Para el silenciamiento microglial de Trem2 *in vitro*, en primer lugar, cambiamos el medio de cultivo de la microglía aislada a medio de mixtos sin suero, para detener la proliferación celular. Por otro lado, se prepara el reactivo de interferencia, preparando dos mezclas en las siguientes proporciones: (i) 1 µl de shRNA-Trem2 (Sigma-Aldrich) en 4 µl del buffer del Kit Viromer Blue (Lipocalyx); (ii) 0.5 µl de Viromer Blue en 44.5 µl de buffer (esta segunda mezcla se vortea 3-5 seg). A continuación, se mezclan ambas preparaciones, se vortea y se incuba a temperatura ambiente durante 15 min. Seguidamente, se añade la preparación en una proporción 1:10 en el medio de cultivo y se incuba durante 24 horas. Las células microgliales Trem2-KD (*knock-down*) son sometidas a ensayos de estimulación (ver Apartado 8).

### **3.3. Cámara de hipoxia para cultivos celulares**

Los tratamientos de hipoxia de la línea SH-Tau o de la microglía primaria se realizan en una cámara que permite el control de los niveles de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y de la temperatura (Coy Laboratory Products, Inc., Grass Lake, MI). Para el uso de la cámara, se procede a su limpieza con lisol y se programan los parámetros adecuados. Las células se someten a 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C durante 24 h.

#### **4. AISLAMIENTO DE MICROGLÍA *EX VIVO* DEL TEJIDO CEREBRAL DE RATONES MODELO DE LA EA**

En este Trabajo, hemos aislado microglía a partir del tejido cerebral de los diferentes modelos murinos descritos (Apartado 2.1). Para ello, hemos optimizado diferentes protocolos de aislamiento dependiendo de la finalidad de cada estudio. Si bien, en todos ellos la suspensión celular final ha sido teñida con anticuerpos específicos y se ha procedido a su análisis y/o separación celular mediante citometría de flujo.

##### **4.1. Homogenización y gradiente de Percoll para análisis de microglía**

Este protocolo ha sido empleado para cuantificar el número de células microgliales en los modelos de depleción microglial y para los ensayos de proliferación. En primer lugar, se perfunden y sacrifican los ratones, siguiendo el protocolo detallado en el Apartado 2.4. Se extrae la corteza y/o el hipocampo y se disgrega el tejido utilizando un bisturí. A continuación, se homogeneizan en HBSS 1X (X0507-500, Biowest) 10% SFB mediante el paso por una aguja de 20 G (5 ml por hemicorteza). El homogeneizado se filtra por un tamiz de 100  $\mu$ m (previamente humedecido con el mismo tampón de homogeneización) y se centrifuga a 160 x g a 4°C durante 10 min. El pellet obtenido se resuspende en Percoll al 30% preparado en HBSS 1X a partir de Percoll isotónico (Percoll al 90% en HBSS 10X). Utilizamos 3 ml para una hemicorteza, y a continuación añadimos cuidadosamente 2 ml de HBSS 1X, formando un gradiente. Seguidamente, se centrifuga a 800 x g a 4°C durante 15 min sin freno y nos quedamos con el pellet obtenido, donde se encuentran las células microgliales, entre otros tipos celulares. Tras realizar un lavado con PBS, marcamos con anticuerpos específicos y analizamos la población microglial mediante citometría de flujo (ver Apartado 4.4).

##### **4.2. Homogenización y gradiente de Percoll para aislamiento de microglía destinada a estudios transcriptómicos**

Este método se ha utilizado para aislar microglía destinada a los estudios de transcriptómica presentados en este Trabajo. Supone una variación más compleja del protocolo detallado en el Apartado anterior para optimizar el número de células aisladas y obtener también astrocitos, aunque no han sido objeto de estudio de esta Tesis Doctoral. Se basa en el protocolo descrito por Orre et al. (2014).

Tras el sacrificio y perfusión de los ratones, se extrae el cerebro y se aíslan corteza e hipocampo conjuntamente. Se realiza una digestión mecánica con micropipeta, seguida de una digestión química con papaína 8 U/ml, en presencia de DNAsaI 400 U/ml (Roche), en un tampón Krebs-Ringer: EDTA 0.6 mM (Applichem), L-Cisteína 3 mM, Glucosa 0.45%, NaCl 0.12M (Scharlau), KCl 5 mM (Panreac), NaOH 40 mM (Acros Organics) y PIPES 6 mg/ml (Sigma), a pH=7.4. El tejido se incuba con esta solución a 37°C

durante 30 min, con agitación suave (400 rpm). La papaína se inactiva con una solución de BSA 0,5% (Sigma) en DMEM-F12, incubando de nuevo a 37°C durante 15 min a 400 rpm. Posteriormente, se termina de disgregar el tejido con una micropipeta hasta obtener una suspensión de células, que se filtra con filtro de nylon de 100 µm (Fisher Scientific) para eliminar fragmentos de tejido no disgregado. La suspensión de células obtenida se lava, se resuspende en la solución de BSA (0,5% en DMEM-F12) y se deposita con cuidado sobre Percoll (Sigma) al 90%, en HBSS 1x, para generar un gradiente. Mediante centrifugación (200 x g, 15 min, sin freno), la suspensión celular se separa en 3 fases: en la fase acuosa superior quedan los restos celulares, en la fase intermedia la mielina y parte de las células, y en la fase inferior quedan el resto de células en suspensión. Retiramos la fase superior para descartar todos los debris, y mezclamos la fase intermedia con la inferior, que lavamos de nuevo con la solución de BSA (0,5%, en DMEM-F12). Finalmente, centrifugamos (200 x g, 15 min, sin freno), para obtener el pellet de células. En este pellet se encuentran todos los tipos celulares presentes en la corteza e hipocampo. Por separación celular dependiente de fluorescencia se aislará específicamente microglía, separándola de astrocitos, neuronas y demás células del SNC.

### **4.3. Homogenización y gradiente de separación mediante el protocolo Miltenyi**

Para el aislamiento de microglía destinada a los estudios metabolómicos (realizados en colaboración con la Dra. Coral Barbas de la Universidad de San Pablo CEU), se ha empleado el kit comercial “Adult Brain Dissociation Kit” (Miltenyi Biotec) con el objetivo de minimizar el tiempo de aislamiento. Tras el sacrificio de los ratones, se extrae el cerebro, que se lava con PBS, y se aíslan corteza e hipocampo conjuntamente. A continuación, el tejido cerebral se trocea con un bisturí y se disgrega mecánicamente con una micropipeta en presencia del Mix 1 (50 µl de enzima P + 1.9 ml del Buffer Z) del Kit comercial indicado anteriormente. A continuación, se incuba durante 15 min a 37°C en agitación, permitiendo que tenga lugar la digestión enzimática mediada por el Mix 1. Seguidamente, disgregamos nuevamente el tejido con micropipeta y añadimos el Mix 2 (20 µl de enzima A + 20 µl del Buffer Y). Incubamos 10 min en agitación a 37°C, disgregamos el tejido mecánicamente e incubamos de nuevo durante 10 min. A continuación, centrifugamos a 300 x g a 4°C durante 5 min.

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 a 4°C durante 10 min. El pellet se resuspende en PBS que, posteriormente, se mezcla con Debris removal solution. Seguidamente, mediante la adición de PBS frío, se crea un gradiente de densidad que se centrifuga a 3000 x g a 4°C durante 10 min 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 1000 x g a 4°C durante 10 min y el pellet resultante se resuspende en 100 µl de PBS con 0,5% de BSA (Fisher Scientific). En esta



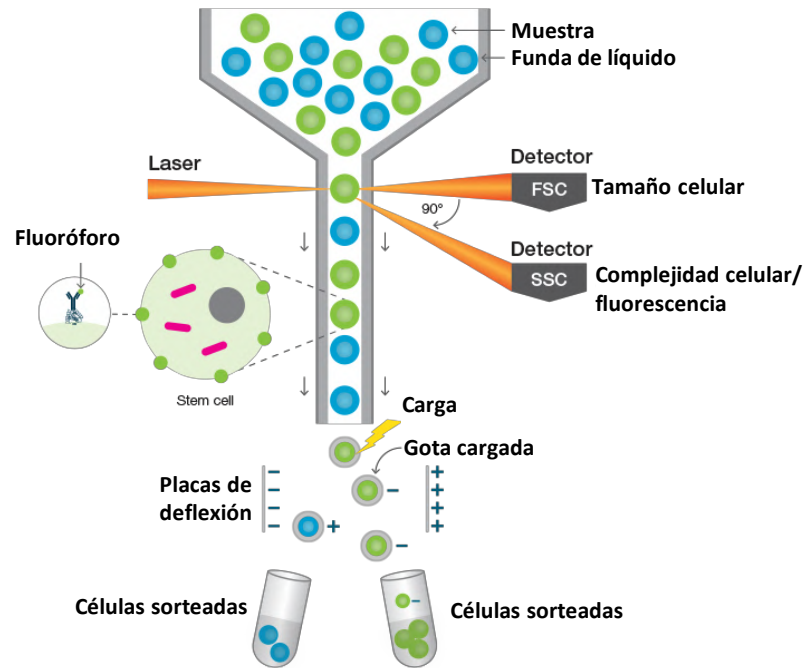
suspensión se encuentran diferentes tipos celulares presentes en la corteza e hipocampo del ratón utilizado.

#### **4.4. Análisis y Separación Celular – *Fluorescence-activated Cell Sorting* (FACS)**

##### **4.4.1. *Fundamento***

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular multiparamétrico basada en un flujo de partículas en suspensión, generalmente células, alineadas a través de un capilar, sobre el que incide un láser focalizado. Así, es posible cuantificar simultáneamente múltiples características físicas y químicas de cada célula, que produce una señal individual al interferir con dicha fuente de luz (Barrera-Ramírez et al., 2004). A cada célula hay unidos diferentes anticuerpos específicos marcados con fluorocromos de manera que, cuando el haz incide sobre una célula, se genera una luz dispersada policromática originada por los diferentes fluorocromos. Esta luz, recogida por detectores de alta sensibilidad, proporciona detallada información de cada célula individual. De esta forma, la luz dispersada hacia delante y lateralmente provee información sobre el tamaño y la complejidad / granularidad de la célula respectivamente. Además, gracias a los marcajes utilizados, es posible obtener información de las características antigénicas (inmunofenotipo) y de diferentes procesos celulares (ciclo celular, proliferación, apoptosis, fagocitosis, etc.) específicos de cada célula.

Adicionalmente, algunos citómetros de flujo presentan capacidad de clasificación y separación celular, FACS, con alta pureza, en función de su marcaje. Las células individualizadas pasan entre dos placas que establecen un campo eléctrico, otorgando una carga a las gotas de suspensión celular según los parámetros medidos. 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 (Figura C.2).



**Figura C.3. Esquema del funcionamiento de la separación celular FACS.** Imagen modificada de BioRad. En este Trabajo, se ha utilizado el citómetro de flujo analizador BD FACS Canto II y el Separador Celular FACS Aria Fusion (Becton Dickinson), del Servicio de Citometría de Flujo y Separación Celular del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS). Los resultados han sido analizados mediante el programa FACSDiva™ (BD Bioscience).

#### 4.4.2. Procedimiento

Para aislar la microglía de manera específica, marcamos la suspensión de células obtenida durante 20 min a temperatura ambiente y en oscuridad con los anticuerpos: Anti-CD45-PE (clon HI30; Immunostep) a una dilución 1:33; Anti-CD11b-APC (clon M1/70, Immunostep) a 1:33 ó Anti-CD11b-CF-Blue (clon M1/70; Immunostep) a 1:20; y, sólo para algunos ensayos, Anti-Clec7a-FITC (FAB17561G, RD Systems) a una dilución 1:10. Utilizamos también los isotipos correspondientes como control negativo para descartar uniones inespecíficas.

Las células marcadas se pasan por el Citómetro Analizador BD FACS Canto II o por el Separador Celular FACS Aria Fusion. En primer lugar, realizamos una selección de células (población P1), mediante la representación de SSC (Side Scatter, informa de la complejidad celular) frente a FSC (Forward Scatter, informa del tamaño celular), que nos permite descartar los debris, restos celulares y mielina. Seguidamente, descartamos los dobletes y seleccionamos las células individuales (población P2), que muestran una relación lineal en la representación FSC-H vs FSC-A. En tercer lugar, mediante inmunomarcajes fluorescentes distinguimos poblaciones definidas, donde la población CD45+/CD11b+ corresponde a las células microgliales. Dentro de esta población, en los experimentos correspondientes, separamos además la microglía activa (CD45+/CD11b+/Clec7a<sup>high</sup>) de la microglía no activa

(CD45+/CD11b+/Clec7a<sup>low</sup>), utilizada posteriormente en estudios transcriptómicos mediante arrays de hibridación (ver Apartado 15). Para comprobar el correcto aislamiento microglial, se realiza además un estudio de marcadores específicos por qPCR (protocolos detallados en Apartados 9.1, 13 y 14).

## **5. AISLAMIENTO DE FRACCIONES SOLUBLES Y CELULARES.**

Este método nos permite separar diferentes fracciones celulares mediante el uso de distintos disolventes y centrifugaciones seriadas. En primer lugar, aislamos la fracción soluble (S1) de proteínas extracelulares y citosólicas mediante ultracentrifugación diferencial. Se lleva a cabo en ausencia de detergentes, de manera que posteriormente podemos utilizar esta fracción S1 para el tratamiento de cultivos celulares. Partimos de tejido de hipocampo o corteza de los animales transgénicos y lo disgregamos, utilizando tijeras de cirugía, en PBS (al que añadimos un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche) y fosfatasas (Sigma)). Seguidamente, pasamos la suspensión por un homogenizador Dounce's (Wheaton) y lo sometemos 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 a 4°C 1 hora (Optima Max, Beckman Coulter). El sobrenadante obtenido corresponde a la fracción proteica soluble (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 (ver Apartado 10) y se guardan a -80°C hasta su uso.

El pellet resultante de la ultracentrifugación (P1) es resuspendido en una solución RIPA (1% CHAPS (Sigma), 1% deoxicolato (Sigma), 0.2% SDS (Sigma) e incubado 30 min a temperatura ambiente en agitación (1400 rpm). Seguidamente, se centrifuga a 27000 x g 4°C 30min. El sobrenadante resultante (S2) corresponde al contenido vesicular y puede almacenarse a -80°C hasta su uso. El pellet (P2) es resuspendido en SDS al 2% e incubado 15 min a temperatura ambiente. A continuación, se centrifuga a 27000 x g a 4°C 30 min y el sobrenadante obtenido corresponde a la fracción de membranas y agregados lábiles (S3). Este pellet (P3) es disuelto en SDS 4% - Urea 8M e incubado toda la noche en agitación hasta su disolución; y corresponde a los agregados resistentes. Tanto S3 como P3 se almacenan a -80°C hasta su uso.

Por otro lado, para aislar las fracciones sarkosyl-insolubles, nos basamos en el protocolo de Luo et al. (2015). El tejido de ratón es homogeneizado por un homogenizador Dounce's (Wheaton) en un tampón de homogeneización (10 mM Tris, 0.8 M NaCl, 1 mM EGTA, 10% sacarosa, pH 7.4), al que le añadimos inhibidores de proteasas y fosfatasas. Posteriormente, se centrifuga a 5000 x g a 4°C durante 1 h. Los sobrenadantes obtenidos se incuban durante 2,5 horas a 37°C en agitación con 1% Sarkosyl (Sigma-Aldrich) y 1% beta-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) en el tampón de homogeneización. A continuación,

se centrifuga a 100.000 x g a 4°C durante 30 min. El pellet resultante, que constituye la fracción resistente a sarkosyl, se lava dos veces en PBS, se resuspende en PBS y se almacena a -80°C hasta su uso.

## 6. PREPARACIÓN DE ABETA MONOMÉRICO Y OLIGOMÉRICO

Para la preparación de monómeros y oligómeros de Abeta, seguimos el procedimiento usado por Ojha et al. (2011). Partimos de un vial con 0.5 mg del péptido Abeta42 (AnaSpec), que se disuelve en 100 µl de HFIP (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol; Sigma) y se incuba a 4°C durante 1 h con agitación suave. A continuación, se separan 5 alícuotas de 20 µl y se evapora el HFIP en un concentrador de vacío (Jouan RC10.22; Thermo Fisher Scientific) durante 20 min. El pellet de cada alícuota se disuelve en 4.43 µl de DMSO y se incuba 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, añadimos 223.5 µl de PBS para conseguir una concentración final de 100 µM de Abeta. Si lo incubamos a 4°C en agitación suave durante 24 h, obtendremos Abeta oligomérico.

## 7. ENSAYO DE TOXICIDAD EN CULTIVOS CELULARES, MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Para este ensayo, los tratamientos se realizan utilizando el medio correspondiente de cada tipo celular (Apartado 3), en placas de 24 pocillos y en ausencia de SFB, para no interferir en la supervivencia celular. Utilizamos una concentración de 0.1 µg/µl en el caso de los tratamientos con las fracciones solubles (S1) y estaurosporina (Sigma) a 1.2 µg/ml, como control positivo de apoptosis celular. En los ensayos de inhibición de caspasas, se añade el inhibidor z-VAD-FMK (Sigma) durante 30 min antes del tratamiento con S1. Tras 3-12 horas de tratamiento, se recogen todas las células (en suspensión y adheridas a la superficie de la placa) y se determina la viabilidad mediante el kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Immunistep) y el citómetro de flujo BD Canto II, analizando los resultados con el software FACS Diva™ (BD Bioscience). Este kit se basa en un doble marcaje con Anexina V, conjugada con FITC (fluoresceína-5 isotiocianato) y que tiene gran afinidad por la fosfatidilserina que queda expuesta hacia el exterior de las células durante el proceso de apoptosis; y con yoduro de propidio (IP), que permite conocer la integridad de la membrana plasmática. En necrosis y apoptosis tardía, se pierde la integridad de membrana y el IP puede acceder al núcleo celular y unirse al ADN. Por lo tanto, el marcaje simultáneo con PI y Anexina V permite discriminar y cuantificar las células viables (AnexinaV-/IP-), las células en apoptosis temprana (AnexinaV+/IP-), las células en apoptosis tardía (AnexinaV+/PIP+) y las células necróticas (AnexinaV-/PI+).

## 8. ENSAYO DE ESTIMULACIÓN DE CULTIVOS CELULARES

Para evaluar la estimulación microglial *in vitro*, los cultivos de microglía primaria, procedentes de animales WT o de animales Trem2KO, se tratan con LPS (1 mg/ml), monómeros u oligómeros de Abeta

(10  $\mu$ M) (ver Apartado 6) durante 3 o 24 horas en medio de cultivos mixtos sin SFB. Seguidamente, se retira el medio y se recogen las células añadiéndoles el reactivo TRIsure™ (Bioline). Posteriormente, se extraen el ARN y las proteínas siguiendo el protocolo descrito en el Apartado 9. Una vez obtenido el ADNc (Apartado 13), medimos mediante qPCR (Apartado 14) marcadores de estimulación de interés, como interluquina-1-beta (IL1 $\beta$ ), interluquina-6 (IL6) o TNF $\alpha$ .

## **9. AISLAMIENTO DE ARN Y PROTEÍNAS**

El método empleado para la extracción de ARN y proteínas se basa en la diferente solubilidad de las distintas biomoléculas (ARN, ADN, proteínas y lípidos) en disolventes orgánicos. Se utilizan los reactivos Tripure® (Roche) o TRIsure™ (Bioline), indistintamente. Ambos contienen tiocianato de guanidina, un agente caotrópico que rompe las membranas y desnaturaliza las proteínas, incluyendo proteasas, ADNasas y ARNasas. Para garantizar una extracción de ARN óptima, es necesario minimizar la actividad ribonucleasa por lo que rutinariamente tratamos el agua con dietilpirocarbonato (DEPC; Sigma) a una concentración del 0.1% (p/v) (Fedorcsak y Ehrenberg, 1966), durante 12 horas. Seguidamente, se elimina el DEPC en exceso por tratamiento térmico, ya que éste puede alterar el ARN por carboximetilación. Todos los reactivos y material fungible utilizados se adquieren libres de ARNasas.

Cuando trabajamos con tejidos, es necesaria una homogenización de la muestra con un dispersador (Polytron; Heidoph), durante 15 segundos a máxima potencia. El proceso comienza añadiendo 1 ml del reactivo Tripure® ó TRIsure™ por cada 50-100 mg de tejido, o 0.5 ml de Tripure® ó TRIsure™ por cada 10<sup>6</sup> células de cultivo o aisladas de tejido, aproximadamente. A continuación, el homogenizado se incuba 10 min a temperatura ambiente para permitir una disociación completa de los complejos núcleo-proteicos. Posteriormente, se añade cloroformo (Sigma) (0.2 ml por ml inicial de Tripure® añadido), se agita fuertemente y se deja incubar a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación, se centrifuga a 12000 x g a 4°C durante 15 min, obteniéndose una solución trifásica: la fase superior acuosa corresponde al ARN y las proteínas, lípidos y ADN se encuentran en la interfase y fase inferior orgánica. Por tanto, podemos aislar tanto el ARN como las proteínas, las cuales se encuentran desnaturalizadas, por lo que solamente pueden utilizarse para estudios en Western-blot (WB) (Apartado 11).

### **9.1. Aislamiento de ARN**

Se extrae la fase superior acuosa cuidadosamente y se le añade una mezcla de isopropanol (Sigma) y glicógeno (Thermo Scientific) (0.6  $\mu$ l glicógeno en 750  $\mu$ l de isopropanol, si hemos partido de 1 ml de Tripure®), que ayudará a la precipitación del ARN, incubándolo a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente, se incuba a temperatura ambiente durante 10 min, y se centrifuga a 12000 x g a 4°C 15 min. El pellet de ARN obtenido se lava con etanol (Scharlau) preparado al 75% (v/v) en agua tratada con

DEPC. Seguidamente, se vuelve a centrifugar a 12000 x g a 4°C 15 min y, por último, el pellet obtenido se deja secar y se resuspende en agua tratada con DEPC.

Por otra parte, en cuanto a las muestras humanas, éstas no han sido obtenidas en las condiciones idóneas para obtener ARN de alta integridad. Las necropsias no son inmediatas, como puede ocurrir con las muestras de células o de modelos, y el tejido humano es almacenado en los Bancos de Tejidos durante varios años. En consecuencia, hemos empleado 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. Seguidamente, 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 260 nm/ 280 nm (longitud de onda a la que absorben los aminoácidos aromáticos); una razón de 2.1 indica que la muestra de ARN no presenta prácticamente contaminación por 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 para la visualización del ARN y la muestra correspondiente. Tras la electroforesis, el sistema de análisis recoge la fluorescencia emitida por la muestra, que ha sido estimulada con láser, creando un electroferograma (fluorescencia/tiempo). El electroferograma proporciona el RIN (del inglés, *RNA Integrity Number*), que establece una clasificación numérica de la calidad del ARN que comprende valores del 1 al 10, de degradado a perfectamente conservado. Una vez se ha purificado, cuantificado y comprobado su integridad, el ARN es almacenado a -80°C.

## 9.2. Aislamiento de proteínas totales

Partiendo de la solución trifásica anterior, utilizamos las fase intermedia y orgánica inferior para extraer proteínas. En primer lugar, se precipita el ADN genómico añadiendo etanol al 100%, (0.3 ml por cada ml inicial de Tripure). Se mezcla por inversión repetida y se incuba 2-3 min a temperatura ambiente. Se centrifuga a 2000 x g a 4°C 5 min y se recupera el sobrenadante (donde están las proteínas) en un tubo

nuevo. A continuación, las proteínas se precipitan con isopropanol (1.5 ml de isopropanol por cada ml de reactivo Tripure inicial), se agita invirtiendo el tubo varias veces, se incuba 10-15 min a temperatura ambiente y se centrifuga a 12000 x g a 4°C 10 min. El precipitado se lava con guanidina (Sigma) 0.3 M en 95% (v/v) de etanol (2 ml por cada ml de Tripure), se agita fuertemente y se incuba 20 min a temperatura ambiente, para después centrifugar a 7500 x g a 4°C 5 min. Este proceso se repite dos veces más y luego se realiza un último lavado con etanol absoluto para eliminar los restos de guanidina. Finalmente, se deja secar el precipitado hasta que se evapore todo el alcohol. Para solubilizar las proteínas, el precipitado se resuspende en SDS 4% (Appllichem) - urea 8M (Appllichem) y se deja incubando toda la noche en agitación a temperatura ambiente. Las proteínas solubilizadas se congelan en diferentes alícuotas a -20°C hasta su uso.

## **10. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS: MÉTODO DE LOWRY**

La determinación de la concentración de proteínas se realiza mediante el método de Lowry (Lowry et al., 1951). La curva patrón se construye usando BSA (Sigma) con un rango de sensibilidad de 10-100 µg, y la absorbancia se determina a 750 nm. Para cuantificar proteínas solubilizadas en SDS 4%-urea 8M, se añade a la curva patrón el mismo porcentaje de urea y SDS que presentan las diluciones de las proteínas (normalmente 1:10). Por otra parte, para cuantificar muestras con bajo contenido en proteínas, se utiliza una variante denominada micro-lowry (modificación de Fryer et al., 1986) y la curva patrón se hace en un rango de 1 a 10 µg. En cualquier caso, a cada reacción se le añade la mezcla cobre-tartrato, en una razón 1:1:100 de CuSO<sub>4</sub> al 5% (Panreac), NaKTartrato al 10% (Sigma) y Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10% (Panreac) en NaOH 0.5 N y se incuba a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación, añadimos el reactivo de Folin&Ciocalteu (Sigma) diluido en agua (1:1), e incubamos a temperatura ambiente 20 min. Finalmente, se lee la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 595 nm y se construye la curva patrón para el cálculo de la concentración de proteínas en cada muestra.

## **11. WESTERN BLOT (WB)**

### **11.1. Fundamento**

Esta técnica permite la detección y cuantificación de proteínas específicas presentes en las proteínas totales extraídas en función de su movilidad electroforética, lo que depende de su tamaño. Se utilizan geles de poliacrilamida (PAGE) en condiciones desnaturizantes siguiendo el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Esta electroforesis tiene lugar en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS; Panreac), que dispersa agregados proteicos y desnaturiza las proteínas. Por otra parte, su presencia, tanto en los geles como en los tampones de electroforesis y transferencia, garantiza que las proteínas se encuentren desnaturizadas y cargadas negativamente, lo que nos permite diferenciarlas

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), en presencia de PSA (persulfato de amonio; Sigma), que actúa como catalizador de la polimerización, y TEMED (Tetrametiletildiamina; Sigma), que inicia la reacción. En estos geles, podemos variar el diámetro de poro, cambiando las concentraciones de acrilamida y bis-acrilamida, para resolver proteínas de diferentes tamaños. En este Trabajo, los geles preparados han variado entre 10, 12 o 14% de acrilamida.

### 11.2. Procedimiento

Para llevar a cabo la electroforesis, las proteínas deben estar preparadas en un tampón de carga: SDS 2.3%, beta-mercaptoetanol (Sigma) 10%, glicerol (Sigma) 20% y azul de bromofenol (Sigma) 0.005%, en tampón 10 mM Tris-HCl a pH 6.8. Para la preparación del gel, usamos 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 necesarios según las condiciones de cada experimento (normalmente 15 pocillos). La electroforesis se lleva a cabo en tampón 25 mM Tris-HCl a pH 8.4 con Glicina 0.19 M (Appllichem) y SDS 0.1% (p/v), sometiéndola a un voltaje constante de 90-120 V. En el caso de proteínas de muy bajo peso molecular, como por ejemplo el péptido Abeta (4.5 kDa), hemos optado por utilizar geles de poliacrilamida al 16% junto con un tampón de electroforesis que contiene 100 mM tricina (Appllichem), pH 8.45.

A continuación, transferimos las proteínas retenidas en el gel de poliacrilamida a una membrana, que puede ser de nitrocelulosa (Hybond-C extra, Amersham) o de PVDF (Inmobilon-P, Millipore), ambas con 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro. Utilizamos un soporte que nos 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 constantes durante 60-120 min. Al terminar, teñimos la membrana con solución de Rojo Ponceau's (Sigma), preparado al 0.1% con ácido acético 5% (Panreac) en agua, para comprobar que las proteínas se han transferido correctamente. Después, lavamos con TPBS [Tween-20 (Sigma) 0.1% (v/v) en PBS] y realizamos el bloqueo con leche desnatada (BioRad) al 5% en TPBS, durante 30-60 min a temperatura ambiente. En caso de usar una membrana de PVDF, es necesario activarla sumergiéndola en metanol antes de usarla para la transferencia, y hervirla en PBS durante 5 min antes de bloquearla.

Tras el bloqueo, la membrana se incuba con el anticuerpo primario (Tabla C.3) correspondiente en TPBS, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, retiramos el exceso de anticuerpo con tres lavados de 5 min de TPBS. Seguidamente, incubamos 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente (Cell Signalling), que está unido a la peroxidasa de rábano (HRP). Volvemos a lavar con TPBS y, para visualizar las proteínas marcadas, usamos el reactivo Pierce ECL 2 Western Blotting



Substrate (Thermo Scientific) que contiene el sustrato de la peroxidasa. Finalmente, mediante el sistema de captación Chemidoc Touch (Imaging System), recogemos la señal quimioluminiscente producida, que será proporcional a la cantidad de proteína específica de la muestra. La intensidad de las bandas se cuantifica utilizando el software Image Lab (BioRad).

ANTICUERPO	PROTEÍNA / ANTÍGENO DIANA	ESPECIE HUÉSPED	DILUCIÓN	TAMAÑO BANDA	PROVEEDOR
<b>Anticuerpos primarios</b>					
<b>82E1</b>	Abeta	Ratón	1/6000	4,5 KDa	IBL
<b>6E10</b>	Abeta	Ratón	1/6000	4,5 kDa	Palex
<b>AT8</b>	Fosfo-tau (Ser199/202-Thr205)	Ratón	1/1000	50-80 kDa	Thermo Scientific
<b>AT100</b>	Fosfo-tau (Thr212-Ser214)	Ratón	1/1000	50-80 kDa	Innogenetics
<b>AT180</b>	Fosfo-tau (Thr231)	Ratón	1/1000	50-80 kDa	Thermo Scientific
<b>ATP sintasa beta</b>	Subunidad beta de la ATP sintasa	Ratón	1/1000	50 kDa	BD Biosciences
<b>Caspasa 3</b>	Caspasa 3 escindida (activa)	Conejo	1/1000	17 kDa	Cell Signalling
<b>Caspasa 8</b>	Caspasa 8 escindida (activa)	Conejo	1/1000	17 kDa	Cell Signalling
<b>Caspasa 9</b>	Caspasa 9 escindida (activa)	Conejo	1/1000	38 kDa	Cell Signalling
<b>HIF1<math>\alpha</math></b>	Subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia	Conejo	1/100	110-120 kDa	Cayman
<b>NDUFS2</b>	Subunidad del complejo NADH deshidrogenasa	Conejo	1/1000	52 kDa	Abcam
<b>PSD95</b>	Proteína de densidad Postsináptica	Conejo	1/1000	95 kDa	Cell Signalling
<b>OC</b>	Abeta (Formas fibrilares)	Conejo	1/5000	86 kDa	Merck-Millipore

<b>RPL26</b>	L26 proteína ribosomal 60S	Conejo	1/1000	20 kDa	Sigma
<b>SDHA</b>	Complejo succinato deshidrogenasa, subunidad A	Ratón	1/1000	70 kDa	Abcam
<b>Sinaptofisina</b>	Proteína de densidad Presináptica	Conejo	1/1000	38 kDa	Synaptic Systems
<b>TAU12</b>	Tau (total)	Ratón	1/1000	50-80 kDa	Merck-Millipore
<b>TAU46</b>	Tau (total)	Ratón	1/1000	50-80 kDa	Cell Signalling
<b>VGAT</b>	Transportador GABA vesicular	Conejo	1/5000	50-60 kDa	Synaptic Systems
<b>VGLUT</b>	Transportador glutamato vesicular	Conejo	1/2000	50 kDa	Synaptic Systems
<b>beta-Actina</b>	Housekeeping protein	Ratón	1/10000	42 kDa	Sigma-Aldrich
<b>Gapdh</b>	Housekeeping protein	Conejo	1/1000	37 kDa	Cell Signalling
<b>Anticuerpos secundarios</b>					
<b>Anti-IgG conejo</b>	Secundario (HRP)	Caballo	1/10000	-	Cell Signalling
<b>Anti-IgG ratón</b>	Secundario (HRP)	Cabra	1/10000	-	Cell Signalling

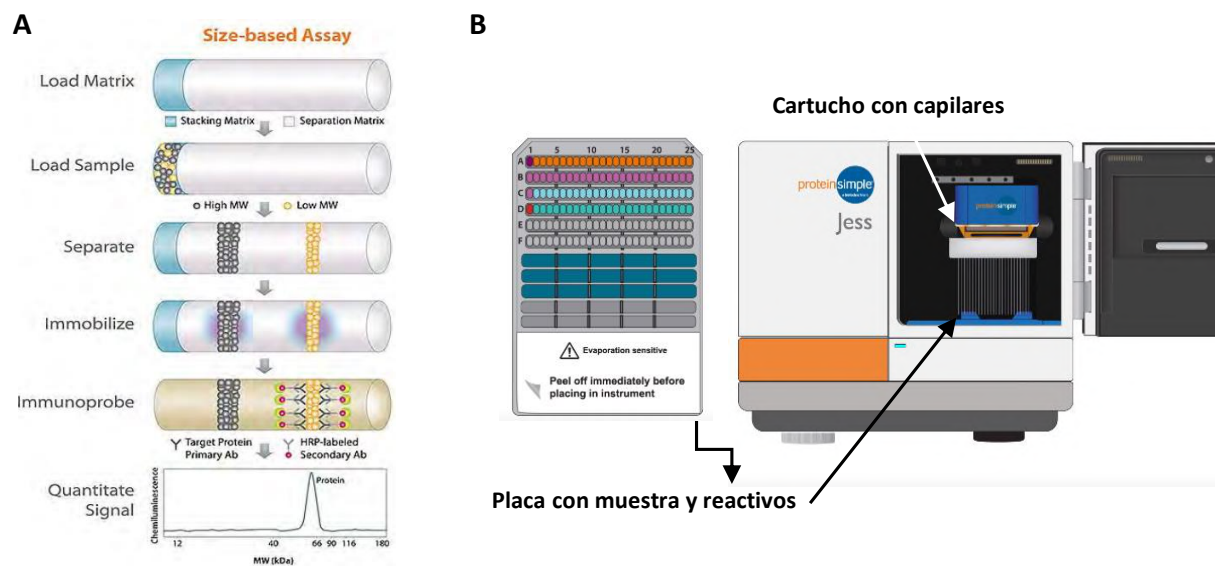
**Tabla C.3. Relación de anticuerpos utilizados en Western-Blot.** Se detalla el antígeno diana, la especie huésped, la dilución utilizada y el peso molecular esperable.

## 12. ELECTROFORESIS E INMUNOENSAYO EN CAPILAR

La electroforesis en capilar se realiza utilizando el aparato Jess (Bio-Techne), que cuenta con numerosas ventajas: alta eficiencia de separación, sensibilidad, y menor consumo de muestra respecto al WB convencional (3  $\mu$ l de muestra frente a 7.5-15  $\mu$ l). Tras la separación en la matriz, las proteínas son inmovilizadas para el inmunoensayo y la detección. Para realizar la técnica, se utilizan los reactivos del Kit Jess-Protein Simple (Bio-Techne) y se siguen las indicaciones facilitadas. Brevemente, se preparan: (i) las muestras (se diluyen a la concentración adecuada y se les añade la Master Mix), (ii) los anticuerpos primarios y secundarios, diluidos a la concentración adecuada en el buffer "Antibody diluent"; (iii) el reactivo de detección en los casos de quimioluminiscencia (luminol-peroxidasa); y (iv) el marcador de peso molecular biotinilado. Los diferentes compuestos y la solución de lavado se cargan en la placa proporcionada, que posteriormente se centrifuga a 1000 x g 5 min y se introduce en el aparato Jess. Por otro lado, también se introduce el cartucho de capilares, en nuestro caso, un cartucho de 25 capilares

con una matriz de 12-230 kDa (Bio-Techne) (Figura C.3). Para la configuración y análisis del ensayo se utiliza el software Compass for Simple Western (Protein Simple).

Para la puesta a punto de cada ensayo, es necesario determinar la concentración de la muestra y de los anticuerpos primarios y secundarios, el tiempo de carga de la muestra en la matriz y los tiempos de incubación con cada uno de los anticuerpos. Una vez optimizado, esta tecnología permite la medida simultánea de varios anticuerpos, incluso con el mismo peso molecular, gracias a su triple sistema de detección (quimioluminiscencia y dos canales de fluorescencia).



**Figura C.4. Inmunoblot capilar en el dispositivo Jess (Bio-Techne).** (A) Diagrama de flujo del ensayo de inmunoblot. (B) Introducción de la placa, que contiene las muestras y los reactivos, y del cartucho de capilares en el dispositivo.

### 13. RETROTRANSCRIPCIÓN

La retrotranscripción permite obtener ADN complementario (ADNc) a partir de ARN mensajero (ARNm). El ADNc es una biomolécula más estable que permite un manejo más seguro de la muestra. Se forma a partir de un molde de ARN en presencia de un cebador mediante la actividad de la enzima transcriptasa inversa, que sintetiza una hebra de ADN complementaria y genera un híbrido ARN-ADN, el cual, por degradación del ARN, quedará como ADN monocatenario.

Para la reacción de retrotranscripción, partimos del RNA resuspendido en agua con DEPC (ver Apartado 9.1) y utilizamos el “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (Applied Biosystem), que contiene: mezcla de cebadores aleatorios, mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTP), enzima transcriptasa inversa y tampón de retrotranscripción, que asegura unas condiciones óptimas para el funcionamiento de la enzima. La combinación de estos reactivos, siguiendo las especificaciones indicadas en la Tabla C.4, da

lugar a una mezcla de reacción que se mezcla con nuestro ARNm en una proporción 1:1. Para que tenga lugar la reacción, la muestra se incuba en un termociclador (MasterCycler Gradient, Eppendorf), durante 10 min a 25°C, para permitir la hibridación de los cebadores con su secuencia complementaria, seguido de 2 h a 37°C, para que tenga lugar la retrotranscripción. El ADNc obtenido se conserva a -20°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
H <sub>2</sub> O tratada con DEPC	42%	-

**Tabla C.4. Relación de los reactivos para la retrotranscripción** (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.

## 14. qPCR EN TIEMPO REAL

### 14.1. Fundamento

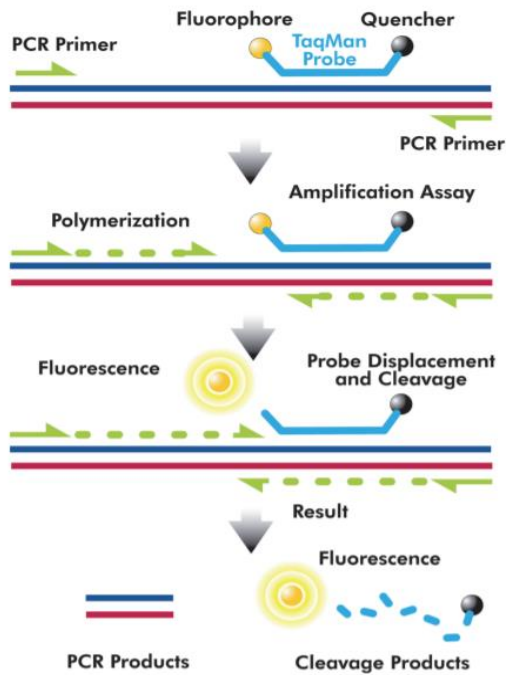
La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica con numerosas aplicaciones y alta sensibilidad. Se denomina RT-PCR cuando se parte de ADNc, obtenido a partir de ARNm mediante retrotranscripción (Apartado 13). En la PCR cuantitativa (qPCR) a tiempo real, el análisis de las muestras amplificadas tiene lugar durante la reacción, monitorizando una señal fluorescente asociada al producto de cada ciclo. Durante el transcurso de este Trabajo hemos empleado dos métodos para la cuantificación del ARNm.

Por un lado, hemos utilizado cebadores específicos junto con el fluoróforo de unión al ADN bicatenario SYBR-green I. Este fluoróforo emite poca fluorescencia mientras está en solución o cuando el ADN se encuentra desnaturizado (monocatenario). Sin embargo, durante la etapa de elongación, cantidades crecientes del mismo se intercalan en la doble cadena de ADN que se está sintetizando, provocando un aumento en su fluorescencia de hasta 100 veces. El incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida por SYBR-green I. El complejo resultante ADN-SYBR green I absorbe a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 497 nm y emite a 520 nm. El principal inconveniente de este tipo de fluoróforos es su baja especificidad, debido a que se unen de manera indiscriminada a cualquier fragmento de ADN bicatenario, como productos generados inespecíficamente o dímeros de

cebadores. Con la finalidad de minimizar la inespecificidad, se deben emplear condiciones de reacción óptimas y cebadores diseñados para ser lo más específicos posible para la diana, a la vez que no sean complementarios entre sí. Por otra parte, también es recomendable iniciar la reacción de síntesis de ADN a temperaturas elevadas (hot-start PCR), lo cual disminuye el riesgo de amplificaciones inespecíficas. Para el diseño de cebadores, en primer lugar, obtenemos la secuencia del gen de estudio de PubMed.gov (U.S. National Library of Medicine and National Institutes of Health; www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez). La secuencia obtenida se introduce en el programa informático Primer Express v2.0 (Applied Biosystems) que nos permite escoger entre las mejores opciones de pares de cebadores posibles, optimizados para PCR a tiempo real.

Para comprobar la especificidad del cebador, determinamos la temperatura de hibridación ( $T_m$ ) de los fragmentos amplificados durante la PCR en un proceso denominado curva de disociación. Cada fragmento amplificado tiene una  $T_m$  característica, que depende principalmente de su longitud y del porcentaje en G+C. Los productos de PCR de diferente longitud y porcentaje en G+C tienen temperaturas de hibridación distintas y, por lo tanto, se observa más de una caída drástica de la fluorescencia emitida en función de la temperatura. Cuando se representa la derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura ( $-dF/dT$ ), podemos observar un pico si el producto de PCR contenía un único producto de amplificación, o más de uno si durante la PCR se han amplificado también regiones inespecíficas. De esta forma, comprobamos la especificidad del cebador, previamente a su uso.

Por otro lado, el segundo método utilizado para cuantificar la expresión de ARNm en este Trabajo consiste en el uso de sondas de hidrólisis o sondas Taqman, que permiten la detección exclusiva de secuencias específicas. Se trata de oligonucleótidos de 20-24 bases de longitud, que se unen complementariamente 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. 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 FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) del fluoróforo de baja longitud de onda (reporter) al fluoróforo de alta longitud en el otro extremo (quencher), apantallando la fluorescencia. Durante la fase de elongación, la sonda que ha hibridado con su secuencia complementaria está unida a una cadena simple de ADN, y flanqueada por cebadores específicos. 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, siendo su intensidad proporcional a la presencia de secuencias diana en la muestra.



**Figura C.5. Esquema 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 liberada. A partir del cebador, la ADN polimerasa copia la secuencia complementaria hasta llegar a la sonda. Entonces, ésta es hidrolizada por el extremo 5', liberando al fluoróforo y permitiendo que el aumento de fluorescencia, anteriormente apantallado, sea detectado. Finalmente, la enzima hidroliza el resto de la sonda, completando la copia de la secuencia diana.

Durante la fase exponencial del proceso de amplificación, hay un punto denominado ciclo threshold (Ct) en el que el incremento de la señal fluorescente se registra como estadísticamente significativo, distinguiéndose de la fluorescencia *background*. A mayor número de copias iniciales, antes se alcanza este aumento significativo en la fluorescencia (Bustin, 2002; Ginzinger, 2002). La señal registrada se normaliza con la fluorescencia de referencia para corregir las fluctuaciones de fluorescencia provocadas por cambios en la concentración o el volumen, y se obtiene un valor de Ct para cada muestra (software SDS 107, Applied Biosystems). Para la cuantificación, se ha utilizado el método de comparación de Ct, donde la cantidad de ADNc (unidades de expresión de la diana estudiada), normalizada por el gen housekeeper (normalmente Gapdh) viene dada por la ecuación:  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001).

## 14.2. Procedimiento

En los casos que hemos utilizado SYBR-green I, se ha comprobado en primer lugar la especificidad de los cebadores y la eficiencia del proceso de amplificación realizando un ensayo con diferentes cantidades de ADNc, representando Ct frente a  $\log X_0$ , donde  $X_0$  es la cantidad de ADNc utilizado. La eficiencia de la amplificación ( $E_{x,Ct}$ ) viene dada por la ecuación:  $E_{x,Ct} = 10^{-1/m}$ . Siendo la eficiencia máxima  $E_{x,Ct} = 2$ , la pendiente de Ct frente a  $\log X_0$  debe tener un valor = -3,2.

Una vez verificada la eficiencia y especificidad de los cebadores (Tabla C.5), medimos la expresión de la secuencia diana en las muestras de interés. Para ello, preparamos una mezcla de reacción: 10  $\mu$ l de FastStar SYBR-Green® Master Mix (2X) (Roche), 0.6  $\mu$ l de cebador específico (forward) 10  $\mu$ M, 0.6  $\mu$ l de cebador específico (reverse) 10  $\mu$ M, 7.8  $\mu$ l de agua milliQ y 1  $\mu$ l de ADNc. En placas de 96 pocillos,

realizamos la amplificación en el ABI PRISM Sequence Detection Systems 7900, siguiendo el programa predeterminado: activación inicial de la Taq (2 min 50°C), desnaturalización inicial (10 min 95°C) y 40 ciclos de desnaturalización (15 seg 95°C) e hibridación/elongación (1 min 60°C). El análisis de los resultados se realiza con el programa ABI Prism 7900 SDS Software.

Cebador (ratón)	Secuencia Forward	Secuencia Reverse
<b>CD14</b>	5'-GGACTGATCTCAGCCCTCTG-3'	3'-GCTTCAGCCCAGTGAAAGAC-5'
<b>GBP2</b>	5'-GGGGTCACTGTCTGACCACT-3'	3'-GGGAAACCTGGGATGAGATT-5'
<b>EMP1</b>	5'-GAGACACTGGCCAGAAAAGC-3'	3'-TAAAAGGCAAGGGAATGCAC-5'
<b>H2-D1</b>	5'-TCCGAGATTGTAAAGCGTGAAGA-3'	3'-ACAGGGCAGTGCAGGGATAG-5'
<b>PSMB8</b>	5'-CAGTCCTGAAGAGGCCTACG-3'	3'-CACTTTCACCCAACCGTCTT-5'

**Tabla C.5. Secuencias de los cebadores** (Sigma) utilizados para el análisis de expresión de ARNm de ratón mediante RT-PCR, basadas en la publicación de Liddelow et al. (2017).

Por otro lado, se utilizaron sondas Taqman (Applied Biosystems) (Tabla C.6), que han pasado previamente controles de calidad, garantizando la especificidad por la secuencia diana y la eficiencia de amplificación. Para llevar a cabo la RT-PCR preparamos una mezcla de reacción: 10 µl de iTaq™ Universal Probes Supermix (Bio-Rad) (2X), 1 µl de Taqman™ Gene Expression Assay (Applied Biosystem) (20X), 8 µl de agua milliQ y 1 µl 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 Expresión Assay (20X) (“Sonda Taqman”), contiene los cebadores específicos del gen a cuantificar y una sonda Taqman MGB, marcada con FAM™ en el extremo 5' y el quencher en el 3'. La concentración del vial es de 18 µM para cada primer y 5 µM para la sonda. Al igual que en el caso de uso de cebadores, en placas de 96 pocillos, realizamos la amplificación en el ABI PRISM Sequence Detection Systems 7900, siguiendo el programa predeterminado y nuevamente el análisis de los resultados se realiza con el programa ABI Prism 7900 SDS Software.

Sonda (ratón)	Referencia	Sonda (ratón)	Referencia
<b>ALDH1L1</b>	Mm03048957_m1	<b>IL1β</b>	Mm00434228_m1
<b>CD4a</b>	Mm01132415_g1	<b>IL6</b>	Mm00446190_m1
<b>CD4b</b>	Mm00437893_g1	<b>Ki67</b>	Mm01278617_m1
<b>CCL2</b>	Mm00441242_m1	<b>Lgals3</b>	Mm00802901_m1

<b>CCR2</b>	Mm00801681_m1	<b>LY6C</b>	Mm00841873_m1
<b>CD3</b>	Mm01179194_m1	<b>P2RY12</b>	Mm01950543_s1
<b>CD45</b>	Mm01293577_m1	<b>TMEM119</b>	Mm00525305_m1
<b>CD68</b>	Mm03047340_m1	<b>TNFalfa</b>	Mm00443258_m1
<b>Cd163</b>	Mm00474091_m1	<b>Sonda (humano)</b>	<b>Referencia</b>
<b>Clec7a</b>	Mm01183349_m1	<b>Hif1<math>\alpha</math></b>	Hs00153153_m1
<b>CX3CR1</b>	Mm02620111_s1	<b>Vegfa</b>	Hs00900055_m1
<b>Gfap</b>	Mm01253033_m1	<b>Hmox</b>	Hs01110250_m1
<b>Iba1</b>	Mm00479862_g1	<b>Slc7a</b>	Hs01001189_m1
<b>Trem2</b>	Mm04209424_g1	<b>Bhlhe40</b>	Hs01041212_m1
<b>IGF1</b>	Mm00439560_m1	<b>Preli2</b>	Hs00794719_m1

**Tabla C.6. Sondas Taqman** (Applied Biosystems) utilizadas para el análisis de expresión de ARNm de ratón o humano mediante RT-PCR.

## 15. ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO (ARRAYS)

El estudio transcriptómico de microglía aislada se ha realizado utilizando arrays de hibridación de Affymetrix (ThermoScientific), en el Servicio de Genómica y Secuenciación del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS). Esta aproximación nos permite detectar transcritos (ARNm) de genes codificantes, expresados por la microglía, en animales WT y modelos murinos de EA. El uso de los arrays de hibridación permite analizar una extensa cobertura de genes, lo que genera un rendimiento y fiabilidad muy elevados. Tras obtener las células microgliales aisladas, se extrae su ARN, se cuantifica y se comprueba su integridad (RIN) (Apartado 9.1). Debido a la baja concentración de ARN obtenido, éste se ha amplificado y marcado usando el GeneChip® WT PICO Reagent Kit (ThermoScientific). Para la amplificación se utilizaron 5 ng de ARN total, que fue cargado siguiendo los procedimientos descritos por el fabricante en el manual del usuario (WT Pico Reagent Kit User Guide). El ADNc amplificado se ha cuantificado, fragmentado y marcado para la hibridación en el Clariom™ S Pico Assay mouse (ThermoScientific), siguiendo los protocolos descritos en el manual del usuario. Por último, el lavado, marcaje (GeneChip® Fluidics Station 450; ThermoScientific) y escaneo (GeneChip® Scanner 3000; ThermoScientific) se han llevado a cabo siguiendo los protocolos descritos en el manual correspondiente. Finalmente, los datos se normalizan usando el método RMA (Robust Multi-Array). El análisis de expresión diferencial y de componentes principales se ha realizado usando el software TAC (Transcriptome Analysis Console; Affymetrix, ThermoScientific). Para el análisis de enriquecimiento se



utiliza el software GSEA (del inglés, *Gene Set Enrichment Analysis*) (Subramanian et al., 2007) y se han descargado las bibliotecas estandarizadas de rutas KEGG (integrante de Canonical Pathways) y de Procesos Biológicos (integrante de Gene Ontology) (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/collections.jsp>). Para el análisis de enriquecimiento en vías de señalización específicas publicadas previamente, hemos incluido manualmente los set génicos de interés en las bibliotecas anteriormente mencionadas.

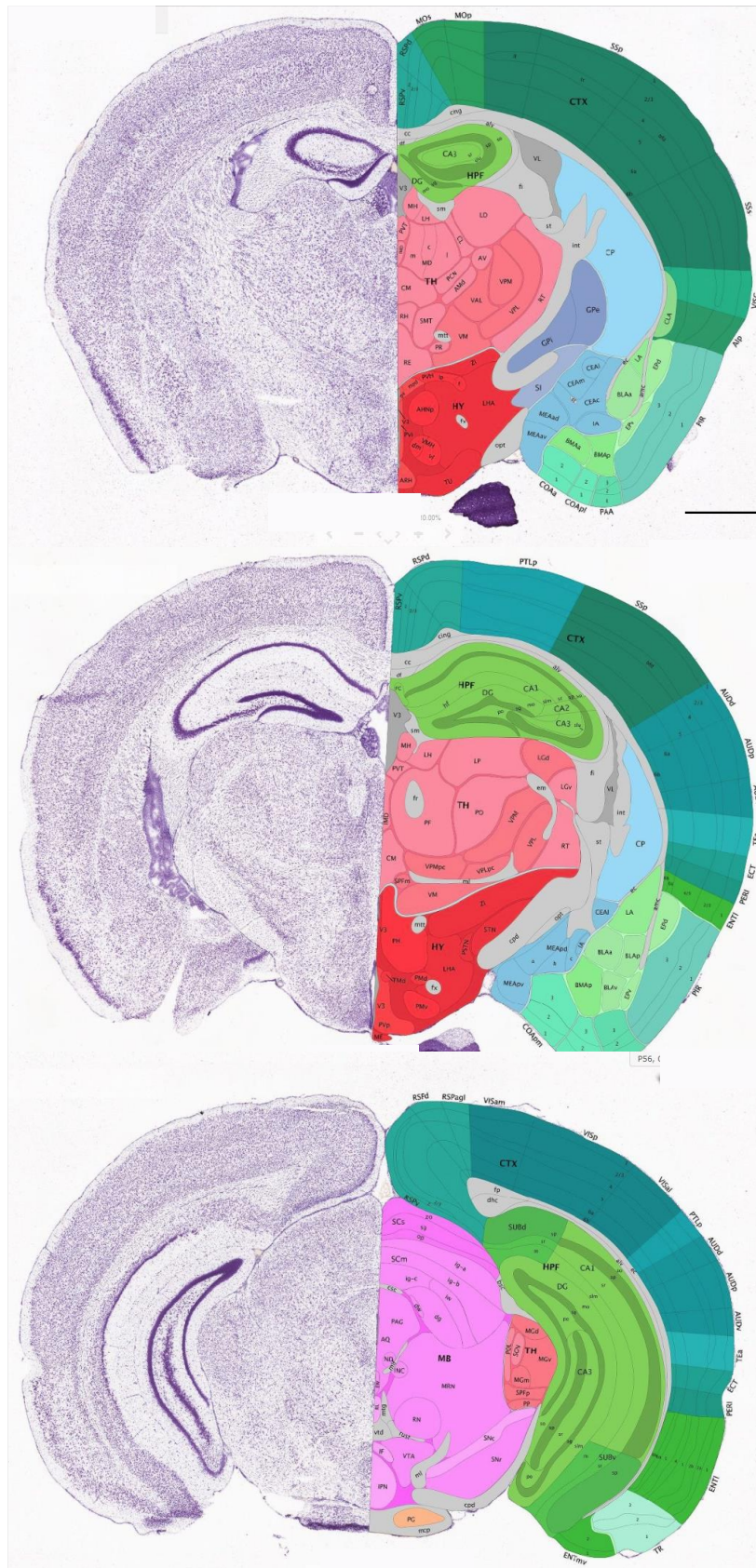
## 16. ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

Las técnicas inmunohistoquímicas permiten detectar moléculas de interés en el tejido de estudio gracias a la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo. Para ello, los hemiserebros aislados de los diferentes modelos murinos se cortan en un criostato Leica (CM 1950), en secciones coronales de 30 µm de grosor siguiendo el eje rostro-caudal. Estas secciones se recogen de manera seriada en PBS en placas multipocillo (7-10 series por placa) y posteriormente se almacenan en *free-floating* en solución anticongelante (30% glicerol, 30% etilenglicol en un buffer de fosfato) en tubos individuales (cada tubo corresponde a un pocillo) a -20°C, hasta su uso.

La delimitación anatómica de las formaciones cerebrales se ha realizado siguiendo el atlas de Franklin y Paxinos para cerebro de ratón (Franklin y Paxinos, 2008). Concretamente, el hipocampo está presente entre los niveles Bregma -0,94 a -4,04 mm. La formación hipocampal la constituyen el subículo, el hipocampo propio (o *cornu ammonis*, CA) y la circunvolución dentada o giro dentado (Andersen 2007). Como se observa en la Figura C.4, de forma general, el hipocampo en su extremo rostral aparece en posición dorsal tras los niveles de los núcleos septales, delimitado ventralmente por el tálamo dorsal, dorsalmente por el cuerpo caloso y dorso-lateralmente por el córtex parietal. A niveles caudales, el hipocampo se curva y se extiende ventralmente hacia el área amigdalina, estando limitado lateralmente por las cortezas perirrinal y entorrinal, entre otras (Cassel et al. 1997).

Los estudios inmunohistoquímicos realizados en colaboración con la Dr Antonia Gutiérrez se han llevado a cabo siguiendo protocolos similares a los descritos a continuación, con leves modificaciones (Gomez-Arboleda, 2017).

Todos los pasos se realizaron en agitación, a menos que se indique lo contrario. Los pasos de lavado fueron de 5 min cada uno.



**Figura C.6. Anatomía de la formación hipocampal a distintos niveles rostro-caudales.** La formación hipocampal está formada por el hipocampo propio (regiones CA), el giro dentado y el subículo. Esquemas tomados de <http://atlas.brain-map.org>. Barra de escala: 1 mm.

### 16.1. Microscopía óptica convencional

Las secciones seleccionadas se lavan 3 veces en PBS-1% Tritón (Sigma) y, a continuación, se realiza un tratamiento con calor para mejorar la exposición del antígeno a detectar. Para ello, se incuban las secciones durante 30 min en una solución de citrato (0.65 g ácido cítrico, 0.48 g citrato sódico en 2 L de H<sub>2</sub>O destilada, pH=6) en un baño a 80°C. A continuación, las secciones se dejan enfriar y se realizan tres lavados nuevamente con PBS-1% Tritón. Seguidamente, se procede a la inactivación de la peroxidasa endógena con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% y metanol al 10% en PBS durante 15 min. A continuación, se realizan tres lavados con PBS y se procede a la permeabilización, incubando con PBS-1% Tritón durante 1 hora a temperatura ambiente, y posteriormente al bloqueo. La solución de bloqueo previene las uniones inespecíficas y consiste en una incubación con 1% Tritón y 5% BSA durante 2-3 horas a temperatura ambiente. A continuación, se incuba la solución del anticuerpo primario (ver Tabla C.7) diluido en PBS Tritón 1% BSA 1% durante toda la noche a 4°C (tras 30 min a temperatura ambiente). Al día siguiente, tras incubar 30 min a temperatura ambiente de nuevo, se realizan tres lavados con PBS-0.1% Tritón y se incuba con el anticuerpo secundario (ver Tabla C.7) diluido en 0.1% Tritón 1% BSA, durante 70 min. Seguidamente, se realizan tres lavados en PBS-0.1% Tritón y se incuba con la solución de estreptavidina (ExtrAvidin<sup>®</sup>, Sigma) diluida 1/2000 en PBS-0.1% Tritón, durante 90 min. Se realizan nuevamente 3 lavados con PBS-0.1% Tritón y se procede a visualizar la reacción de la peroxidasa con la solución de revelado: 3-3' diaminobencidina, DAB (D5905, Sigma) en PBS (1 pastilla en 10 ml de PBS, filtrando la solución antes de ser usada) + 1 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (por cada ml de DAB utilizado). El tiempo de revelado varía según el anticuerpo utilizado, entre 0.5-4 min. A continuación, se realizan numerosos lavados en PBS y H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> para eliminar los restos de DAB y las secciones se montan en portaobjetos (Labbox) gelatinizados y se dejan secar toda la noche. Al día siguiente, se procede a la deshidratación: 5 min H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, 5 min EtOH 70%, 3 min EtOH 90%, 5 min EtOH 96%, 3 min EtOH 100%, 10 min xileno. Finalmente, se procede al montaje, utilizando medio DPX (Scharlau). Para las tinciones dobles (Iba+ y TioS), se realiza el protocolo anteriormente descrito, incluyendo las modificaciones del protocolo estándar de tinción de azul de prusia (Lara-Ureña, 2020).

### 16.2. Inmunofluorescencia

Las secciones seleccionadas se lavan 3 veces en PBS y, a continuación, se realiza el tratamiento con calor (descrito en el Apartado anterior) para mejorar la exposición del antígeno a detectar. A continuación, las secciones se dejan enfriar y lavan nuevamente tres veces con PBS. Seguidamente, se procede a la permeabilización, incubando con PBS-1% Tritón (Sigma) durante 1 hora a temperatura ambiente; y al bloqueo mediante una incubación con Tritón 1% y BSA 5% durante 2-3 horas a temperatura ambiente. A continuación, se incuba la solución del anticuerpo primario (ver Tabla C.7) diluido en 1% Tritón 1%BSA durante toda la noche a 4°C (tras 30 min a temperatura ambiente). Al día siguiente, tras incubar 30 min

a temperatura ambiente de nuevo, se realizan tres lavados con PBS-0.1% Tritón y se incuba con el anticuerpo secundario (ver Tabla C.7) diluido en 0.1% Tritón 1% BSA, durante 1 hora. Seguidamente, se realizan tres lavados en PBS-0.1% Tritón, un lavado con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> y se procede al montaje de las secciones en portaobjetos (Labbox), utilizando glicerol al 50% en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> como medio de montaje.

### 16.3. Anticuerpos utilizados

En la Tabla C.7 se detallan las características de los anticuerpos utilizados para los diferentes estudios inmunohistoquímicos.

ANTICUERPO (nomenclatura)	PROTEÍNA / ANTÍGENO DIANA	ESPECIE HUÉSPED	DILUCIÓN	PROVEEDOR
<b>Anticuerpos primarios</b>				
<b>AT8</b>	Fosfo-tau (Ser199/202-Thr205)	Ratón	1/1000	Thermo Scientific
<b>CD45</b>	Receptor de membrana. Marcador de microglía activa	Ratón	1/1000	Bio-Rad
<b>CD68</b>	Glucoproteína de membrana situada en lisosomas, endosomas y superficie celular, que interviene en la fagocitosis. Marcador de microglía activa.	Conejo	1/1000	Abcam
<b>Gfap</b>	Proteína ácida fibrilar glial. Marcador de astrocito activo.	Conejo	1/10000	Dako
<b>Iba1</b>	<i>Ionized calcium binding adapter molecule</i> . Marcador de microglía homeostática.	Conejo	1/1000	SYSY
<b>Iba1</b>	<i>Ionized calcium binding adapter molecule</i> . Marcador de microglía homeostática.	Conejo	1/1000	Wako (estudios en muestras humanas)

<b>Trem2</b>	Triggering receptor expressed on myeloid cells 2. Marcador de microglía activa	Oveja	1/100	R&D Systems Bio-Techne
<b>Abeta<sub>14-24</sub> (clon 4G8)</b>	Abeta	Ratón	1/2000	BioLegend
<b>TioS</b>	Tiofálvina-S	-	0.005%	Sigma
<b>Anticuerpos secundarios</b>				
<b>Anti-IgG Conejo</b>	Secundario biotinilado	Cabra	1/500	Vector Lab
<b>Anti-IgG Ratón</b>	Secundario biotinilado	Cabra	1/500	Vector Lab
<b>Anti-IgG Conejo</b>	Fluoróforos AF488 y AF564	Burro	1/500	Molecular Probes
<b>Anti-IgG Ratón</b>	Fluoróforos AF488 y AF564	Burro	1/500	Molecular Probes
<b>Anti-IgG Oveja</b>	Fluoróforo AF488	Burro	1/500	Abcam

**Tabla C.7. Relación de anticuerpos utilizados para histología.** Se detalla el antígeno diana, la especie huésped, la dilución utilizada y el proveedor.

#### 16.4. Cuantificaciones inmunohistoquímicas

El estudio del número de células microgliales por placa en los ratones APP/PS1 en condiciones de normoxia e hipoxia se ha realizado en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Alberto Pascual. Las placas de Abeta de corteza e hipocampo, teñidas con TioS, se seleccionan de forma aleatoria, sin conocer el tratamiento recibido por el animal en cada muestra (n=4/grupo). Las cuantificaciones se realizan en superimágenes generadas mediante el sistema NewCast (Visiopharm) asociado al microscopio BX61 (Olympus) del Servicio de Microscopía del Instituto de Biomedicina de Sevilla. El número de células microgliales se obtiene mediante el marcaje Iba1+.

La cuantificación de la superficie de placas amiloides cubiertas por células microgliales en muestras humanas *post mortem* se ha realizado en colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Antonia Gutiérrez. Consideramos la cobertura microglial de la placa como el porcentaje de área teñida por Iba1 en relación al área periplaca (círculo a 30 µm de los bordes de la placa). Las imágenes Iba1/4G8 se adquieren mediante el microscopio automático Olympus VS120, conectado al microscopio óptico Olympus BX61VS acoplado a una cámara digital a color de alta resolución (VC50 Olympus). Para la adquisición de las imágenes se utiliza el software Olyvia 2.6 (Olympus, Dinamarca), obteniéndose imágenes de 1654 pixel x 877 pixel; donde el tamaño de pixel es 28.34 pixel/cm. Las imágenes digitales



(n=3 individuos Braak V-VI) se procesan mediante el sistema de análisis de imagen Visilog 6.3 (Noesis, Francia). La señal Iba1+ se convierte en escala de grises (8 bits) y se identifica estableciendo un nivel umbral (120-130) mantenido en todas las secciones. Finalmente, se mide el área periplaca Iba1+ y se considera el índice de protección como el ratio entre Iba1/Abeta. Para la cuantificación de neuritas distróficas (fosfo-Tau, AT8+), se seleccionan aleatoriamente placas de Abeta TioS+ y el área TioS+ y fosfo-Tau+ se estima mediante el software Fiji (Image J) en placas individuales. Los resultados se presentan como el porcentaje del área fosfo-Tau+ respecto al área de placa.

## 17. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Los estudios de microscopía electrónico de transmisión (MET) se han realizado en colaboración con el laboratorio de la Dra. Antonia Gutierrez. Los ratones se perfunden transcárdialmente, además de con PBS para drenar la sangre, con 180 ml de solución fijadora, compuesta por paraformaldehído al 4%, L-lisina 75 mM y meta-peryodato sódico 10 mM en tampón fosfato (PB) 0.1 M y pH 7,4 durante 30 min. A continuación, se extraen los cerebros, se postfijan por inmersión en la misma solución fijadora durante una noche a 4°C y se cortan en secciones coronales de 100-150 µm en un vibratomo. Seguidamente, las secciones se fijan con la solución de tetróxido de osmio 1% (Electron Microscopic Sciences) en tampón fosfato PB [NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1M + NaHPO<sub>4</sub> 0.1M, pH 7.4], a 4°C durante 20 min y en oscuridad, se lavan con PBS 0,1M, se deshidratan en etanol y se incluyen en plano en resina Araldite (EMS, USA) (Gomez-Arboleda, 2017). Las áreas seleccionadas se cortan en secciones ultrafinas mediante un ultramicrotomo, se tiñen con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinan al microscopio electrónico JEOL JEM 1400 de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Málaga. La cuantificación de la morfología mitocondrial se realiza mediante el software Fiji midiendo el área, perímetro y los ejes mayor y menor. Se utiliza la función “Fit Ellipse” para calcular los ejes. Se calculan los siguientes parámetros: (i) circularidad ( $4\pi \cdot \text{area} / \text{perimeter}^2$ ), donde un valor de 1.0 equivale a un círculo perfecto y a medida que nos aproximamos a valores de 0.0 se infiere una forma elongada; y (ii) ratio de aspecto: ejes mayores/ejes menores.

## 18. ENSAYO DE MEDIDA DE LOS NIVELES DE ATP

La medida de los niveles de ATP se realiza utilizando el kit “ATP Molecular Probes” (ThermoFisher) que permite su determinación cuantitativa mediante bioluminiscencia, en presencia de luciferasa de luciérnaga recombinante y su sustrato D-luciferina, siguiendo la siguiente reacción: Luciferina + ATP + O<sub>2</sub> → Oxiluciferina+ AMP+ Pi+ CO<sub>2</sub> + luz (emisión máxima a 560 nm).

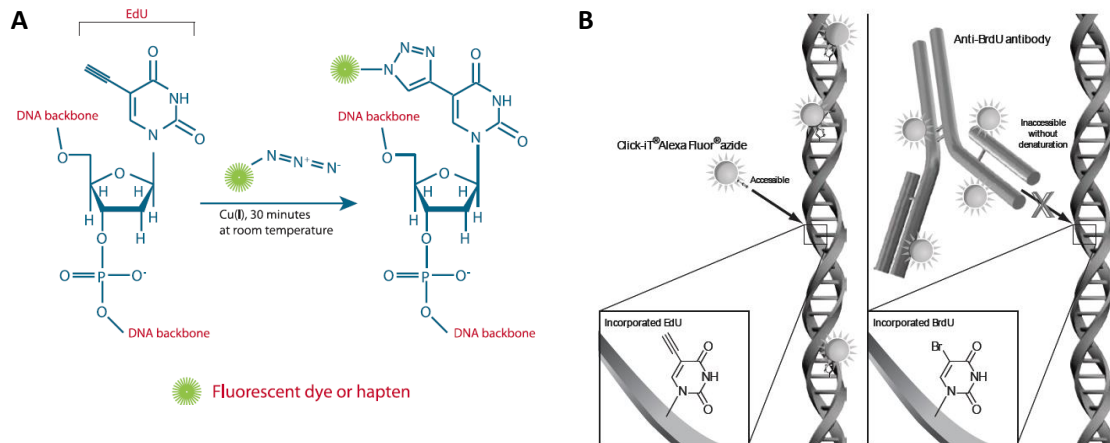
Hemos realizado este ensayo en células BV2 control y tratadas con S1 procedente de ratones ThyTAU22 de 12 meses (0.1 µg/µl) durante 3 o 6 horas en el medio de cultivo correspondiente, sin SFB. Una vez

finalizado el tratamiento, hemos utilizado un raspador para recoger las células en 350  $\mu\text{l}$  de PBS, destinando 50  $\mu\text{l}$  para el conteo del número de células, que será necesario para la normalización del ensayo. El resto del volumen se sonica a máxima potencia durante 10 seg 3 veces, dejando 1 min entre una sonicación y la siguiente y manteniendo las muestras en hielo. A continuación, se centrifuga a 14000 x g durante 10 min y se procede al ensayo, siguiendo las indicaciones del kit. Brevemente, se preparan los estándares de ATP y la mezcla de reacción, que se añade tanto a los estándares como a las muestras de interés (140  $\mu\text{l}$  de mezcla de reacción y 10  $\mu\text{l}$  de muestra). Se incuba durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. La lectura de la luminiscencia se realiza en placas de 96 pocillos blancas con fondo plano (ThermoFisher) en el aparato Synergy HT (Biotek). La concentración de ATP de las muestras se extrapola a partir de la curva estándar construida.

## 19. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN EDU

### 19.1. Fundamento

El método más óptimo para medir proliferación celular es la medida directa de la síntesis de ADN. Para ello, anteriormente se utilizaban nucleósidos radioactivos, como la  $^3\text{H}$ -timidina. Posteriormente, esta aproximación fue reemplazada por el uso del nucleósido bromo-deoxiuridina (BrdU). El EdU (5-etinil-2'-deoxiuridina) es un análogo de la tiamina que se incorpora al ADN durante su síntesis activa y constituye una alternativa más reciente al BrdU. La detección del EdU se basa en una reacción tipo *click*, catalizada por cobre (I), entre el residuo alcano de la molécula EdU y la azida presente en el reactivo de detección, de manera que se forma un anillo estable de triazol (Figura C.5 A). Esta reacción es muy eficiente, sensible, con bajo *background* y fácilmente detectable mediante citometría de flujo, fluorimetría o microscopía de fluorescencia. El pequeño tamaño de la azida requerida para la detección permite la lectura del EdU en condiciones suaves, en contraste con la severa desnaturalización del ADN requerida para los ensayos con BrdU (Figura C.5 B). Para la detección del BrdU se requiere HCl, DNasa o elevadas temperaturas para permitir el acceso del anticuerpo de detección al complejo BrdU-ADN. Por tanto, la eliminación del proceso de desnaturalización en el ensayo con EdU permite obtener resultados más reproducibles.

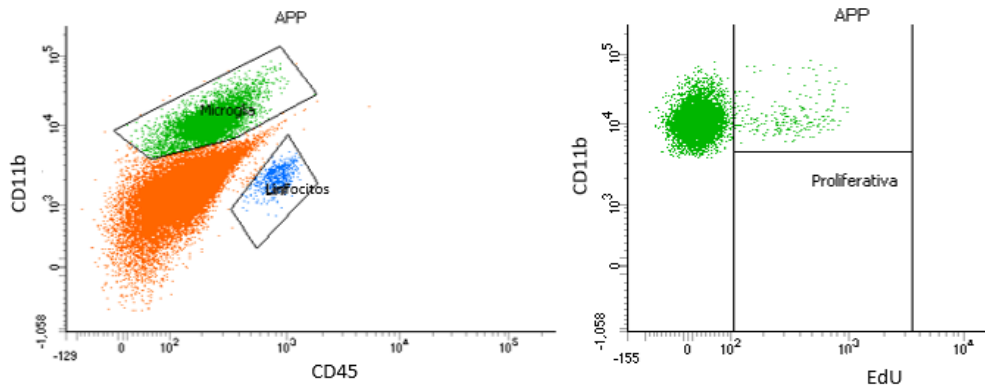


**Figura C.7. Detección del agente intercalante de ADN EdU y comparación con el BrdU. (A)** Diagrama de la detección del EdU incorporado al ADN. Se produce una reacción tipo *click* entre el residuo alcano de la molécula EdU y la azida del compuesto de detección. **(B)** Comparación de la accesibilidad de la molécula de detección al agente intercalado en el ADN EdU o BrdU.

## 19.2. Procedimiento

Para estudiar la proliferación microglial en los diferentes animales transgénicos respecto a WT, los animales son sometidos a 3 inyecciones de 1.5 mg de EdU, tal y como se describe en el Apartado 2.3.3. Al finalizar el tratamiento, se procede al sacrificio de los animales (Apartado 2.4) y se realiza el protocolo de homogenización y gradiente de Percoll, descrito en el Apartado 4.1, para el aislamiento de células microgliales. A continuación, se procede a la fijación y permeabilización de las células obtenidas utilizando el Kit comercial EdU Click-it (BCK-FC647-100, Base Click). Brevemente, se lavan las células en 1% BSA en PBS, se centrifugan ( $1000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$  durante 5 min) y el pellet se resuspende e incuba durante 15 min, protegido de la luz, en el compuesto de fijación (compuesto D). A continuación, se repite un lavado con 1% BSA en PBS y, posteriormente, las células se incuban durante 15 min con el compuesto de permeabilización, basado en saponina. Para la detección del agente intercalante EdU, se realiza una conjugación con el fluoróforo Eternon-Red 645 Azida, en una reacción tipo “click-it”, siguiendo las indicaciones del Kit. Finalmente, la suspensión celular se tiñe también con los anticuerpos específicos para la detección de microglía Anti-CD45-PE (clon HI30; Immunostep) y Anti-CD11b-CF-Blue (clon M1/70; Immunostep), ambos a una dilución 1:33, y se analiza por citometría de flujo (ver Apartado 4.4). Para la cuantificación de células microgliales proliferativas se realiza el procedimiento de selección inicial de células individuales descrito en el Apartado 4.4, y posteriormente se cuantifica el porcentaje de células CD45+/CD11b+/EdU+ (Figura C.4).



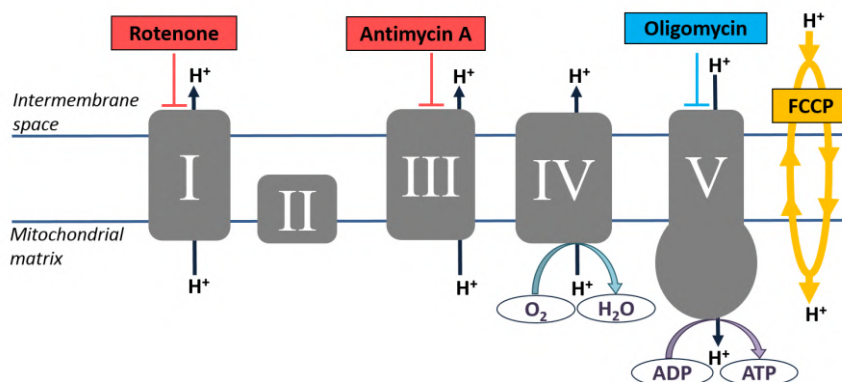


**Figura C.8. Cuantificación ex vivo de microglía proliferativa.** Tras la selección de células individualizadas, se selecciona la población microglial (CD45+CD11b+). Dentro de la población microglial, seleccionamos las células EdU+ que se corresponden con la microglía proliferativa.

## 20. ENSAYO DE METABOLISMO SEAHORSE

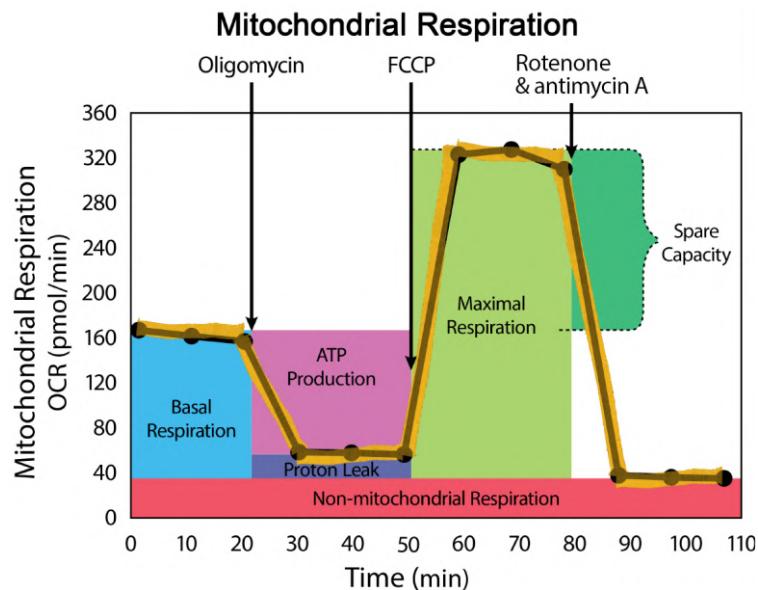
### 20.1. Fundamento

El fenotipo energético de la microglía primaria ha sido determinado mediante 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. De esta forma, permite estudiar la respiración mitocondrial, ligada al consumo de oxígeno, así como la glucólisis, puesto que la acidificación del medio puede relacionarse con la producción de lactato por esta vía. Ambos parámetros son calculados en condiciones basales y tras la inyección de diferentes compuestos que modulan el metabolismo. En este Trabajo, se han empleado cuatro inhibidores mitocondriales de forma secuencial: oligomicina, carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP, del inglés *carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazine*), rotenona y antimicina A (Figura C.9).



**Figura C.9. Esquema de los complejos de la cadena de transporte de electrones y los inhibidores aplicados en los ensayos de Seahorse.** 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.

Tras la medida de las condiciones basales, la adición de oligomicina inhibe la ATP sintasa o complejo V mitocondrial bloqueando la conductancia de protones. Esto inhibe la fosforilación oxidativa y permite calcular la producción de ATP y la entrada pasiva de  $H^+$  a través de la membrana mitocondrial interna (*proton leak*). Posteriormente, se añade FCCP, un desacoplante mitocondrial que disipa el gradiente de protones, disminuyendo el potencial de membrana de la membrana interna de las mitocondrias. Por lo tanto, desacopla la cadena de transporte de electrones de la síntesis de ATP y conlleva la aceleración de la cadena respiratoria, incrementando el consumo de oxígeno del complejo IV a su máximo nivel. La diferencia entre el valor de OCR para FCCP y basal es una buena medida de la capacidad de la célula para responder a un aumento de demanda energética, denominada como *spare respiratory capacity*. Por último, se adiciona una mezcla de rotenona y antimicina A. La rotenona es un inhibidor mitocondrial que previene la transferencia de electrones desde el complejo I mitocondrial a la ubiquinona mediante el bloqueo del sitio de unión de la ubiquinona y 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 y de la capacidad respiratoria máxima (Figuras C.5 y C.6).



**Figura C.10. Parámetros clave de la respiración mitocondrial obtenidos a partir de la OCR** en condiciones basales y tras la adición de drogas que modulan el metabolismo. Se obtiene los parámetros: respiración basal, producción de ATP, proton leak, capacidad máxima respiratoria, capacidad celular y respiración no-mitocondrial.

## 20.2. Procedimiento

En primer lugar, se aísla la microglía primaria tal y como se indica en el Apartado 3.2.1. Se cultivan 35.000 células/pocillo en una placa de cultivo específica (Seahorse XFp Cell Culture Miniplates, Agilent), previamente tratada con poli-D lisina. Las placas constan de 8 pocillos con un radio de 3.81 mm: se

cultivan células en seis de ellos, y se dejan dos pocillos sólo con medio (serán utilizados 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 y se incuba durante 24 horas a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, se realiza el tratamiento con oligómeros de Abeta a 10 µM (Apartado 6) en medio de cultivos mixtos sin SFB, suplementado con B27 (20 µl/mL) durante 12 o 24 horas.

Tras el tratamiento, se sigue el protocolo comercial proporcionado por Agilent, utilizando los medios, reactivos y material incluidos en el Kit. De forma breve, el medio de tratamiento se sustituye, tras dos 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 está formulado en base al medio de cultivos común DMEM, pero se caracteriza por la ausencia de bicarbonato y rojo fenol. La microglía se incuba a 37°C en una estufa (sin controlador de CO<sub>2</sub>) durante 1 h. En este tiempo, se cargan los reactivos en el cartucho de Seahorse, previamente hidratado e incubado a 37°C con la solución calibradora. En este Trabajo, la microglía se trata con 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). El cartucho con las drogas se introduce en el analizador Seahorse XFp para su calibración y seguidamente se introduce la placa con la microglía. El OCR se mide cada 6 min durante 72 min y los correspondientes compuestos se inyectan de manera secuencial a intervalos de 18 min. El OCR se calcula de manera automática mediante el uso del software Seahorse XFp (Agilent). Una vez finalizadas las medidas, las células se recogen en SDS al 4% en PBS, para realizar una cuantificación de proteínas mediante WB (Apartado 11). Una vez comprobado que no existen diferencias en la cantidad de proteína entre las muestras, los resultados de OCR se han normalizado respecto a las medidas finales (medidas tras la adición de rotenona/antimicina A) para comparar los ensayos independientes.

## **21. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los experimentos de este Trabajo se han repetidos un mínimo de 3 veces. El método de análisis estadístico varía según las muestras empleadas y se ha desarrollado con el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Inc.). Para las comparaciones entre dos grupos, se ha utilizado el t-test de Student no-pareado de dos colas. Para las comparaciones de más de dos grupos, se ha utilizado el test ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples Tukey, en los casos que se ha estudiado el efecto de grupo, o seguido del test de comparaciones individuales Fisher's LSD en caso contrario.

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 entre dos grupos, la prueba U de Mann Whitney. Por

otro lado, los análisis estadísticos de correlaciones entre variables se han realizado mediante el coeficiente de correlación de Spearman, seguidos por un análisis de regresión lineal. Los datos se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar;  $p < 0.05$  se considera como significativo. Mostramos el nivel de significación de la siguiente manera:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) o  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

# D. Resultados



## 1. DUALIDAD FENOTÍPICA MICROGLIAL: CARACTERIZACIÓN DIFERENCIAL DE LA RESPUESTA MICROGLIAL EN DOS MODELOS MURINOS DE TAUOPATÍA

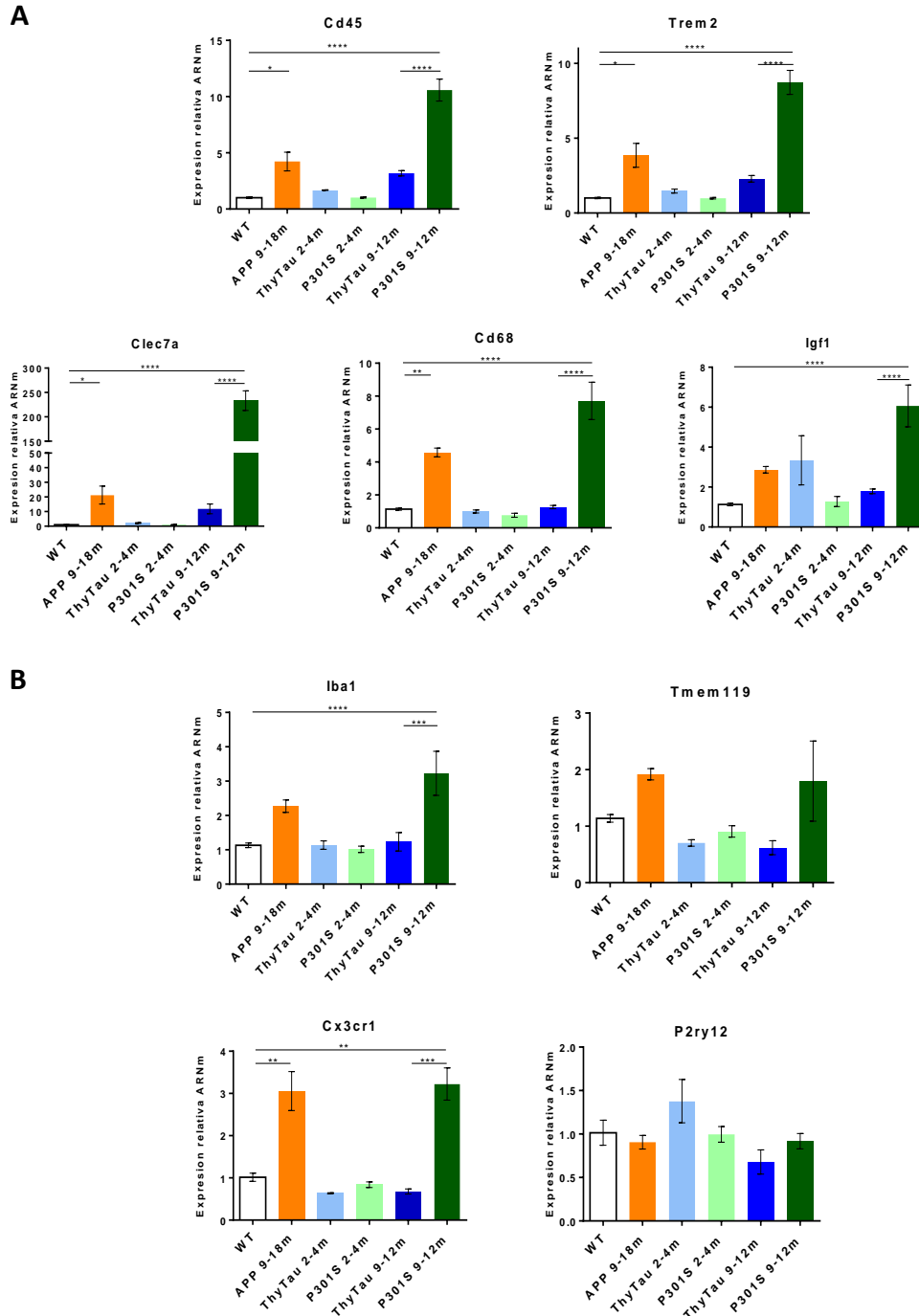
En los últimos años, nuestro grupo de investigación ha caracterizado la respuesta microglial en el hipocampo de ratones con patología amiloide (Jimenez et al., 2008, 2011) y de pacientes con EA (Gutierrez y Vitorica, 2018; Navarro et al., 2018; Sanchez-Mejias et al., 2016). Nuestros resultados muestran que, mientras que en los ratones con depósitos amiloideos se produce una potente microgliosis que progresa con la patología, en el hipocampo de pacientes Braak V-VI, la activación microglial es muy limitada, y además existe una microglía patológica con prolongaciones fragmentadas y distróficas. Esta degeneración microglial parece estar mediada por formas solubles de Tau (Sanchez-Mejias et al., 2016). Con el objetivo de esclarecer la respuesta microglial frente a la patología neurofibrilar, en el presente Trabajo caracterizamos el fenotipo microglial en dos modelos distintos de patología Tau: ThyTAU22 y TAU P301S.

### 1.1. Fenotipo microglial en el hipocampo de los modelos murinos

En primer lugar, medimos en el hipocampo de ratones TAU P301S y ThyTAU22 la expresión, mediante qPCR, de genes implicados en la activación microglial e incluidos en la firma génica DAM (Keren-Shaul et al., 2017); usando como control positivo y negativo animales APP y WT, respectivamente (Figura D.1 A). Como esperábamos, en el modelo APP comparado con el WT, se produce un aumento significativo de los marcadores de activación microglial Cd45, Trem2, Clec7a y Cd68. Sin embargo, en el modelo ThyTAU22, la activación microglial es muy limitada, tanto a edades tempranas (2-4 meses) como avanzadas (9-12 meses), como ocurre en ciertas regiones del hipocampo de pacientes con EA (Sanchez-Mejias et al., 2016). De hecho, nuestros resultados muestran que en los animales ThyTAU22 con patología establecida ninguno de los marcadores de activación microglial aumenta significativamente. Contrariamente, cuando la patología Tau es patente en el hipocampo del modelo TAU P301S (9-12 meses), observamos una importante activación microglial, que es, para los genes evaluados, bastante superior a la producida en el modelo APP. Por consiguiente, la comparación directa entre ambos modelos de tauopatía muestra un incremento significativo de la microgliosis en los animales envejecidos TAU P301S respecto a los animales ThyTAU22 de la misma edad.

Ya que la activación microglial es paralela a la disminución en la expresión de genes homeostáticos (Butovsky et al., 2014; Keren-Shaul et al., 2017), cuantificamos mediante qPCR la expresión de los marcadores microgliales homeostáticos Cx3cr1, Iba1, P2ry12 y Tmem119. Como se observa en la Figura D.1 B, no se producen cambios estadísticamente significativos en P2ry12 y Tmem119 entre los distintos grupos evaluados, mientras que Iba1 y Cx3cr1 aumentan en los ratones APP y TAU P301S de edades

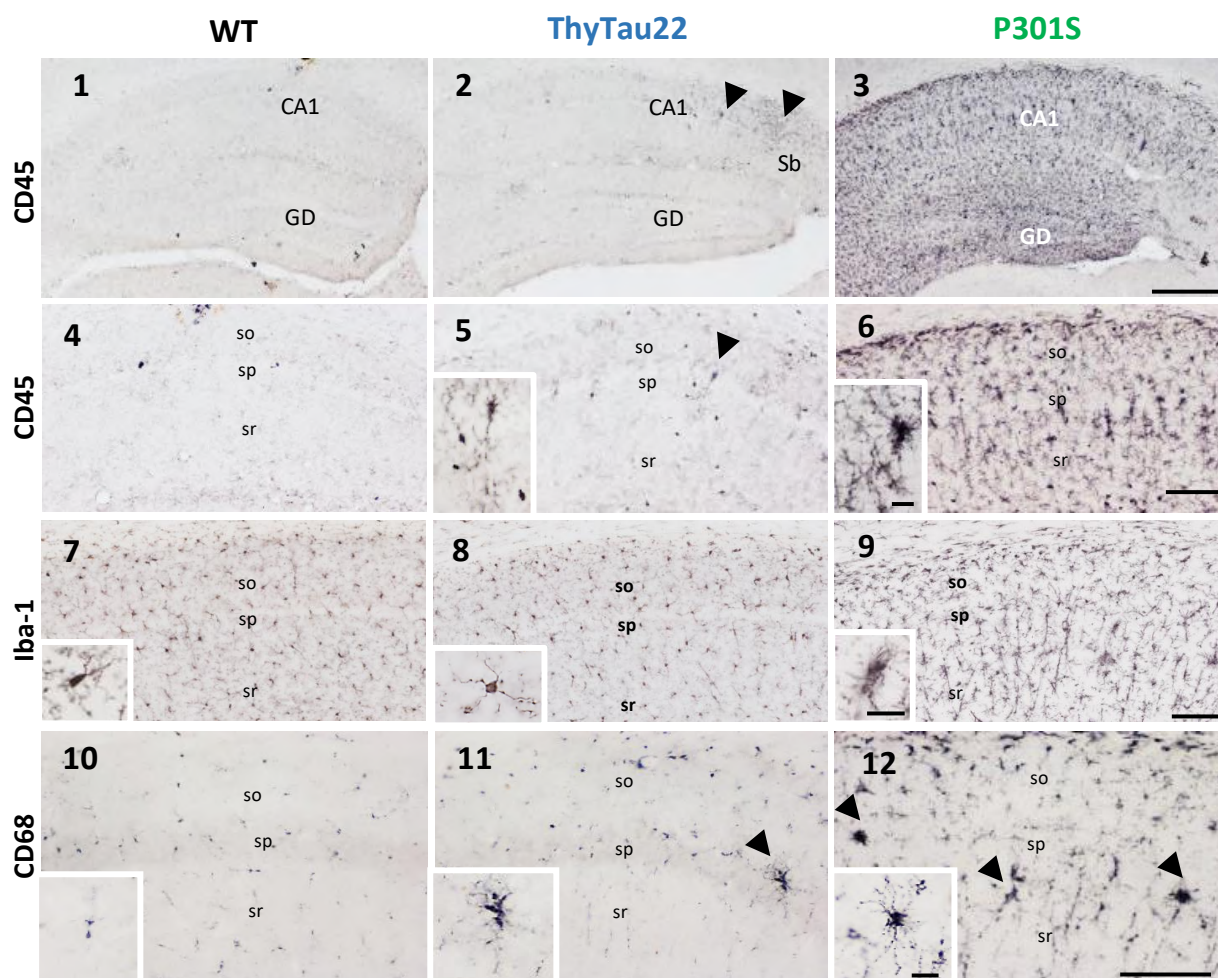
avanzadas en comparación con los valores de ratones WT de 9 meses. Este incremento, contrario a lo esperado, podría deberse a una posible proliferación microglial consecuencia de la activación, y por tanto, no reflejaría un aumento en la expresión del gen, sino un mayor número de células microgliales. De hecho, el análisis de expresión del marcador de proliferación Ki67 aumenta en ratones APP y TAU P301S con patología establecida (datos no mostrados).



**Figura D.1. Respuesta microglial en los modelos APP, TAU P301S y ThyTAU22.** Expresión de genes asociados a la respuesta DAM (A) y homeostática (B) en los modelos APP (9-18 meses, n=4-7), ThyTAU22 (2-4 meses y 9-12 meses, n=4-8) y TAU P301S (2-4 meses y 9-12 meses, n=5-9). Los niveles de expresión medidos por qPCR se han normalizado por Gapdh y se refieren a los valores de ratones WT (9 meses, n=4). La significancia estadística se ha analizado mediante el test ANOVA, seguido del test Tukey de comparación múltiple, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001. Se muestra la significancia para las comparaciones de mayor relevancia. Romero-Molina et al., 2018.



Para corroborar los resultados de expresión génica, realizamos, en colaboración con el grupo de la Dra. Antonia Gutiérrez, un estudio inmunohistoquímico con el marcador homeostático microglial Iba1, y los marcadores CD45 (activación) y CD68 (fagocitosis), en ambos modelos de patología neurofibrilar, usando animales WT como control (Figura D.2). Como esperábamos, la mayoría de las células microgliales presentes en el hipocampo de ratones TAU P301S de edades avanzadas son positivas para CD45 y CD68 y, presentan una morfología típica de activación, caracterizada por un engrosamiento del cuerpo celular y un acortamiento de las prolongaciones. En contraposición, en el modelo ThyTAU22 apenas se observa tinción para estos dos marcadores y la morfología microglial (analizada mediante el marcador Iba1) responde a un fenotipo en reposo.



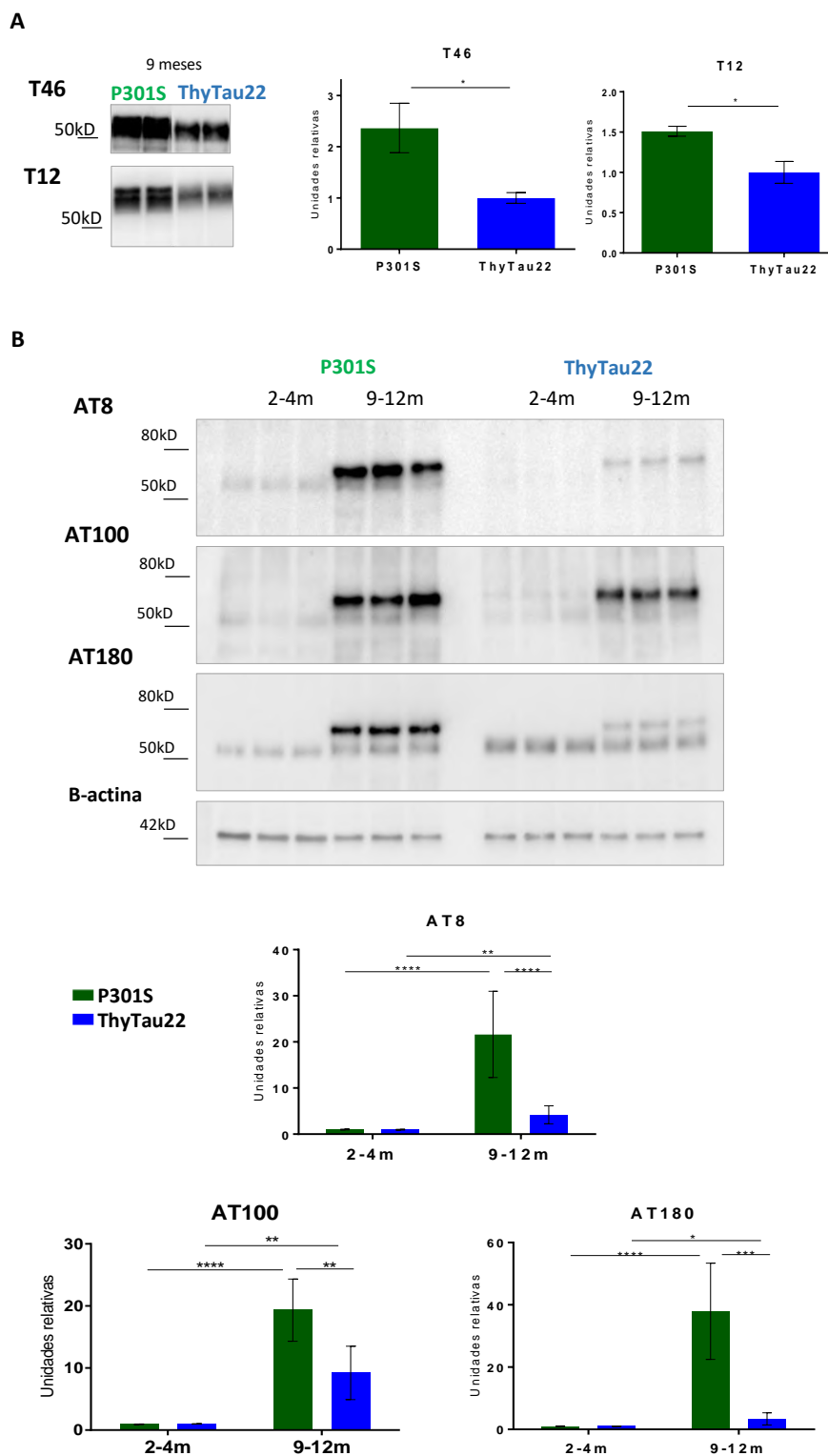
**Figura D.2. Fenotipo microglial en el hipocampo de los ratones WT, ThyTAU22 y TAU P301S.** Imágenes representativas de inmunotinciones con CD45 (1–6), Iba1 (7–9) y CD68 (10–12) en secciones de hipocampo de ratones de 9 meses: WT (1, 4, 7, 10), ThyTAU22 (2, 5, 8, 11) y TAU P301S (3, 6, 9, 12). GD, giro dentado; so, stratum oriens; sp, stratum piramidale; sr, stratum radiatum. Barras de escala: (c1–c3) 400  $\mu$ m; (c4–c12) 100  $\mu$ m; ampliaciones, 20  $\mu$ m. Romero-Molina et al., 2018.

## 1.2. Expresión y progresión de la patología Tau en los modelos murinos de tauopatía

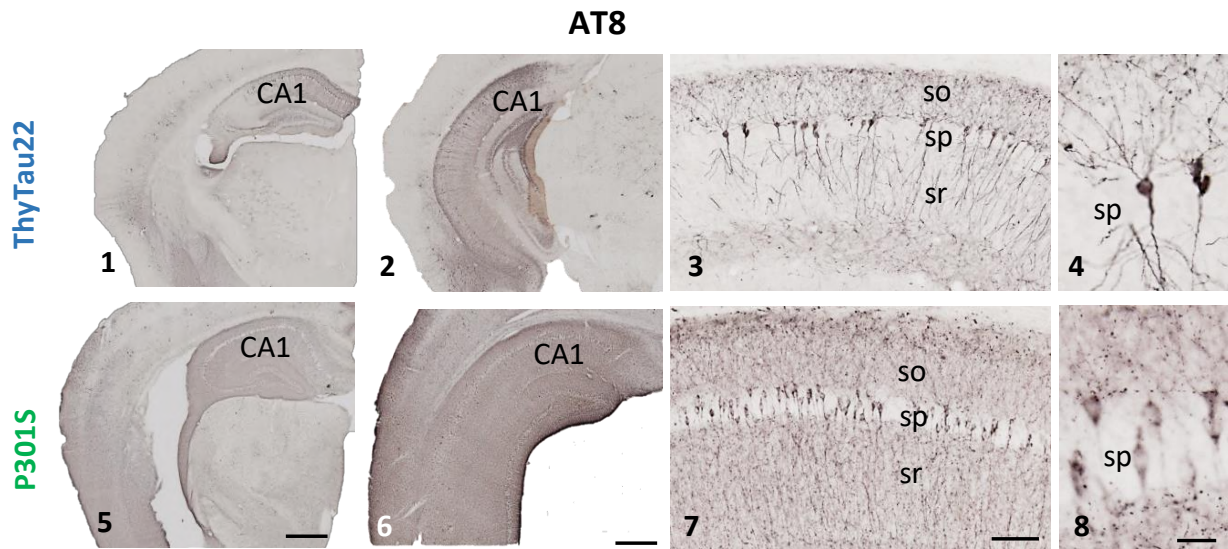
La exacerbada respuesta microglial descrita en los ratones TAU P301S en comparación con los ratones ThyTAU22 podría deberse a una expresión y progresión diferencial de la patología Tau entre ambos modelos. Por ello, determinamos mediante Western-blot la acumulación y fosforilación de Tau a edades tempranas (2-4 meses) y avanzadas (9-12 meses) en ambos modelos transgénicos.

Para estudiar la acumulación de Tau total, utilizamos los anticuerpos T46 (se une al extremo C-terminal de Tau) y T12 (se une al extremo N-terminal). Como se observa en la Figura D.3 A, los niveles de Tau total, a la edad de 9 meses, son significativamente superiores en el modelo TAU P301S comparado con el ThyTAU22. Esta acumulación diferencial podría inducir un patrón de fosforilación distinto en ambos modelos, por lo que evaluamos tres regiones de fosforilación de Tau con los anticuerpos AT8 (Ser202/Thr205), AT100 (Ser212/Thr214) y AT180 (Thr231). Como era de esperar, en ambos modelos se produce un incremento dependiente de la edad en la fosforilación de Tau (Figura D.3 B). Además, a edades avanzadas, la acumulación de especies de Tau fosforiladas reconocidas por AT8, AT100 y AT180 es mucho mayor en el hipocampo de ratones TAU P301S que en el de ratones ThyTAU22.

Adicionalmente, verificamos estos resultados mediante inmunohistoquímica (anticuerpo AT8) en colaboración con el grupo de la Dra. Antonia Gutiérrez. Cabe destacar que, a edades avanzadas (9 meses), la acumulación de Tau fosforilado en ambos modelos ocurre mayoritariamente en el hipocampo, y en mucha menor medida en las regiones adyacentes de la corteza y el tálamo (Figura D.4). Además, mientras que en el hipocampo de ratones ThyTAU22 la tinción AT8 se localiza principalmente en los cuerpos neuronales y en las dendritas de CA1 y giro dentado, en el modelo TAU P301S el marcaje con AT8 es más intenso y difuso, y existe mayor tinción del neuropilo (Figura D.4, 3-4, 7-8). Por tanto, estas imágenes corroboran claramente que existen niveles mayores de fosfo-Tau en el modelo TAU P301S que en el ThyTAU22, e ilustran una distribución de Tau fosforilado diferente entre ambos modelos transgénicos de patología Tau.



**Figura D.3. La expresión y fosforilación de Tau es mayor en el modelo TAU P301S que en el ThyTAU22.** Niveles de proteína, cuantificado mediante WB, de **(A)** Tau total (T46 y T12) en ratones de 9 meses TAU P301S y ThyTAU22 (n=4-6) y **(B)** Tau fosforilado (AT8, AT100, AT180) en ratones de 2-4 meses y 9-12 meses TAU P301S y ThyTAU22. La significancia estadística se ha analizado mediante el test de student, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , entre animales jóvenes y viejos de cada modelo, y entre ambos modelos para animales de la misma edad. Romero-Molina et al., 2018.



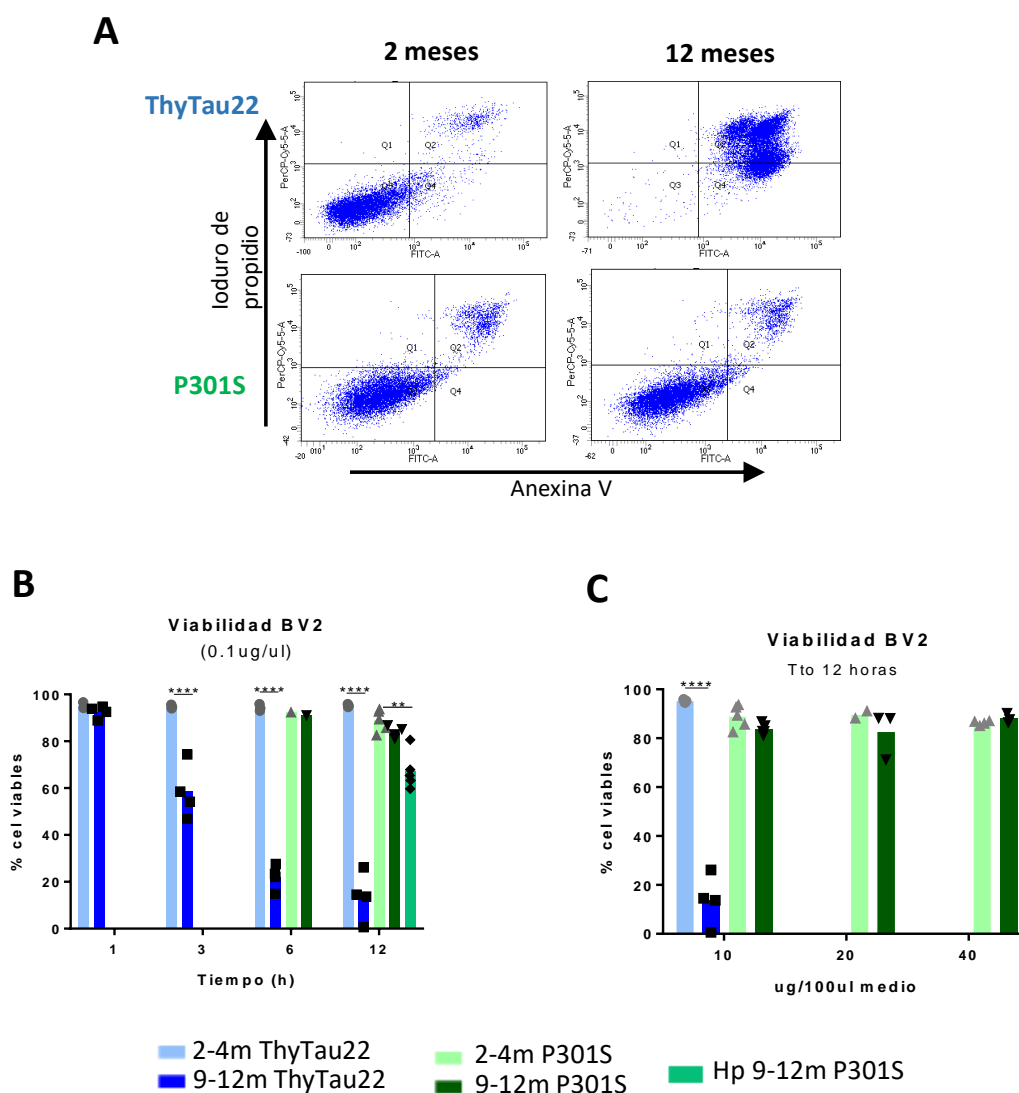
**Figura D.4. La fosforilación de Tau es superior en el modelo TAU P301S que en el ThyTAU22.** Inmunotinción representativa de Tau fosforilado (AT8) en secciones hipocámpales de ratones de 9 meses ThyTAU22 (1–4) y TAU P301S (5–8). so, stratum oriens; sp, stratum piramidale; sr, stratum radiatum. Barras de escala: (1, 2, 5, 6) 500  $\mu$ m, (3, 7) 100  $\mu$ m, (4, 8) 20  $\mu$ m. Romero-Molina et al., 2018.

### 1.3. Evaluación de la toxicidad de las especies solubles fosforiladas de Tau sobre la microglía

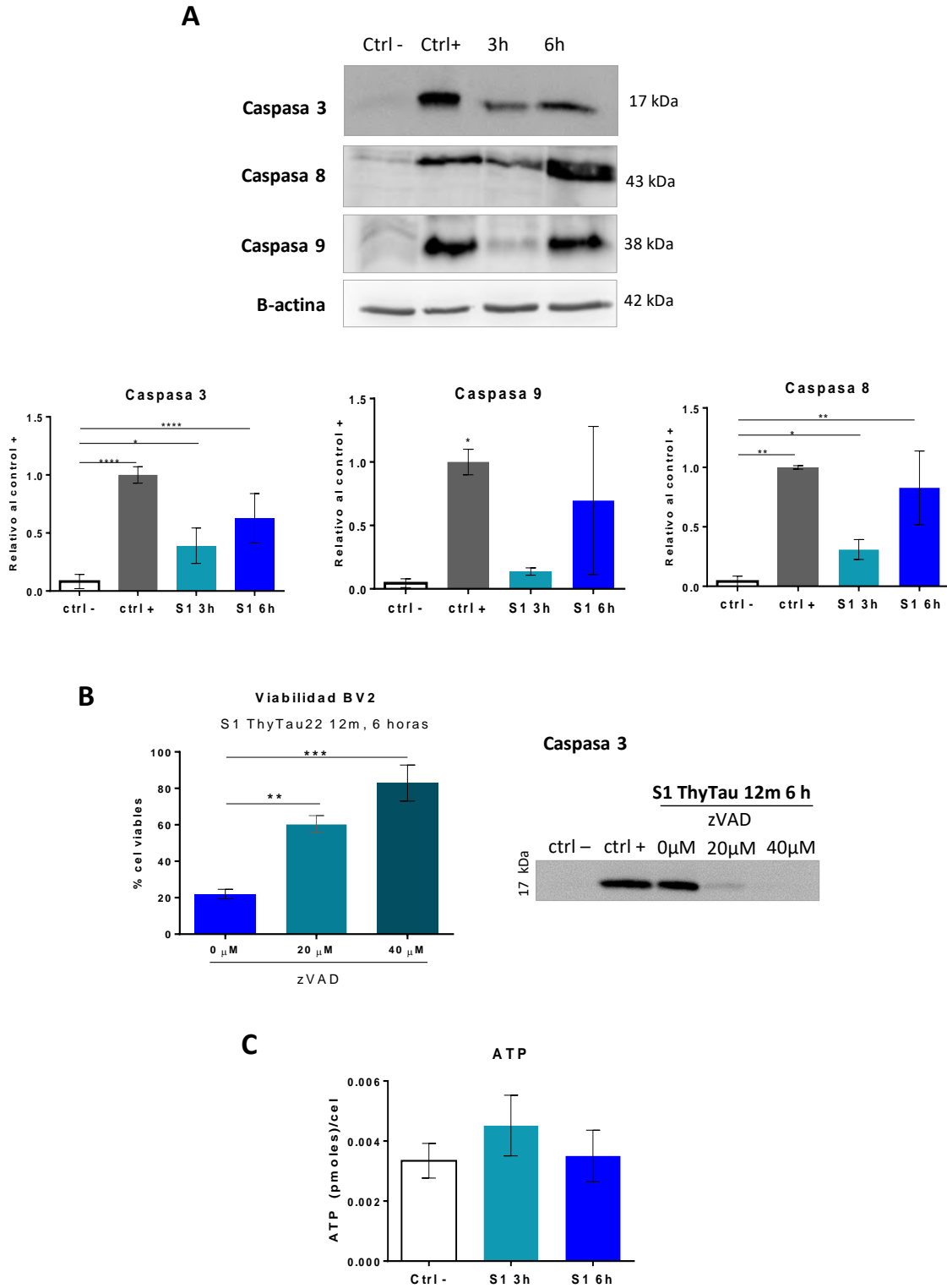
Como ya se ha comentado, nuestro grupo de investigación ha demostrado que las formas solubles de Tau procedentes del hipocampo de enfermos de EA son tóxicas sobre cultivos microgliales (Sanchez-Mejias et al., 2016). Por ello, consideramos de interés evaluar el efecto de las fracciones solubles de ratones TAU P301S y ThyTAU22 de 9-12 meses sobre cultivos de células BV2, esperando que una mayor acumulación de fosfo-Tau soluble produzca un efecto más deletéreo sobre la microglía.

En primer lugar, determinamos mediante citometría de flujo (kit Anexina/Ioduro de Propidio (IP), ver Material y Métodos, Apartado 7), la viabilidad de las células BV2 tras distintos periodos de incubación (3, 6 y 12 horas) con fracciones solubles S1 (concentración de 0.1  $\mu$ g proteína/ $\mu$ l) procedentes de la corteza de ratones ThyTAU22 de 12 meses. Como se ilustra en la Figura D.5 A y B, la viabilidad microglial disminuye progresiva y significativamente desde las 3 horas de incubación con las fracciones solubles y queda en un  $13.7 \pm 10.4\%$  a las 12 horas. El análisis detallado de los resultados de citometría de flujo tras los distintos tiempos de incubación con las fracciones S1 refleja un primer paso de las células viables (IP-/Anexina-) a apoptosis temprana (IP-/Anexina+) y finalmente a apoptosis tardía (IP+/Anexina+) (datos no mostrados). Para confirmar que el mecanismo subyacente a la muerte de las células BV2 es la apoptosis, evaluamos el procesamiento de las caspasas 3, 8 y 9 en las células recogidas tras los distintos periodos de incubación con las fracciones S1. Como se muestra en la Figura D.6 A, observamos un aumento del procesamiento, y consiguiente activación, de las caspasas 3 (fragmento escindido a 17 kDa), 8 (43 kDa) y 9 (38 kDa) tras 3 y 6 horas de tratamiento. Además, realizamos en paralelo un

tratamiento de 6 horas con las fracciones S1 de los ratones ThyTAU22 de 12 meses en presencia del inhibidor de caspasas z-VAD-FMK, y comprobamos que la viabilidad microglial asciende de un  $16 \pm 8.8\%$  a un  $83 \pm 17.1\%$  y que no se produce activación de caspasa 3 (Figura D.6 B). Por consiguiente, confirmamos que la apoptosis es el mecanismo subyacente a la muerte de las células BV2. También analizamos si la inducción de la apoptosis es debida a una depleción de las reservas de ATP en respuesta a una exacerbada activación microglial. Al medir los niveles de ATP en células BV2 tratadas con S1 de ratones ThyTAU22 durante 3 y 6 horas, no observamos cambios respecto al control (Figura D.6. C), lo que refleja que la apoptosis microglial descrita no está mediada por un desabastecimiento energético.



**Figura D.5. Las fracciones solubles procedentes de ratones ThyTAU22, a diferencia de las fracciones solubles de ratones TAU P301S, son tóxicas en cultivos de células BV2.** Citometría de flujo representativa (A) de la viabilidad microglial *in vitro* (kit Ioduro de Propidio (IP)/AnexinaV) y cuantificación (B) tras 3, 6 y 12 horas de tratamiento con fracciones solubles (S1) procedentes de corteza, a menos que se indique lo contrario, de ratones ThyTAU22 y TAU P301S de 2-4 y 9-12 meses de edad ( $n=3-5$ ). (C) Cuantificación del porcentaje de células BV2 viables, analizadas mediante citometría de flujo, tras 12 horas de tratamiento con diferentes concentraciones de S1 procedente de animales ThyTAU22 y TAU P301S de 2-4 y 9-12 meses de edad ( $n=3$ ). Hp: hipocampo. La significancia estadística se ha analizado mediante t test. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ , \*\*\*\* $p<0.0001$ . Romero-Molina et al., 2018.



**Figura D.6. Mecanismo de toxicidad de las fracciones S1 de ratones ThyTAU22. (A)** Activación de caspasas 3, 8 y 9 tras el tratamiento con S1 (0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l) de ratones ThyTAU22 de 12 meses (n=3), normalizado por el control positivo (estaurosporina 1 mM). **(B)** Viabilidad de células BV2 (citometría de flujo, kit IP/AnexinaV) y activación de caspasa 3 (WB representativo) tras 6 horas de tratamiento con fracciones S1 (0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l) de ratones ThyTAU22 de 12 meses, en presencia de distintas concentraciones (0, 20, 40  $\mu$ M) del inhibidor de caspasas zVAD. **(C)** Niveles de ATP tras el tratamiento de células BV2 durante 3 y 6 horas con S1 (0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l) de ratones ThyTAU22 de 12 meses (n=3). La significancia estadística se ha analizado mediante el test de ANOVA, seguido del Test Tukey. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001. Romero-Molina et al., 2018.

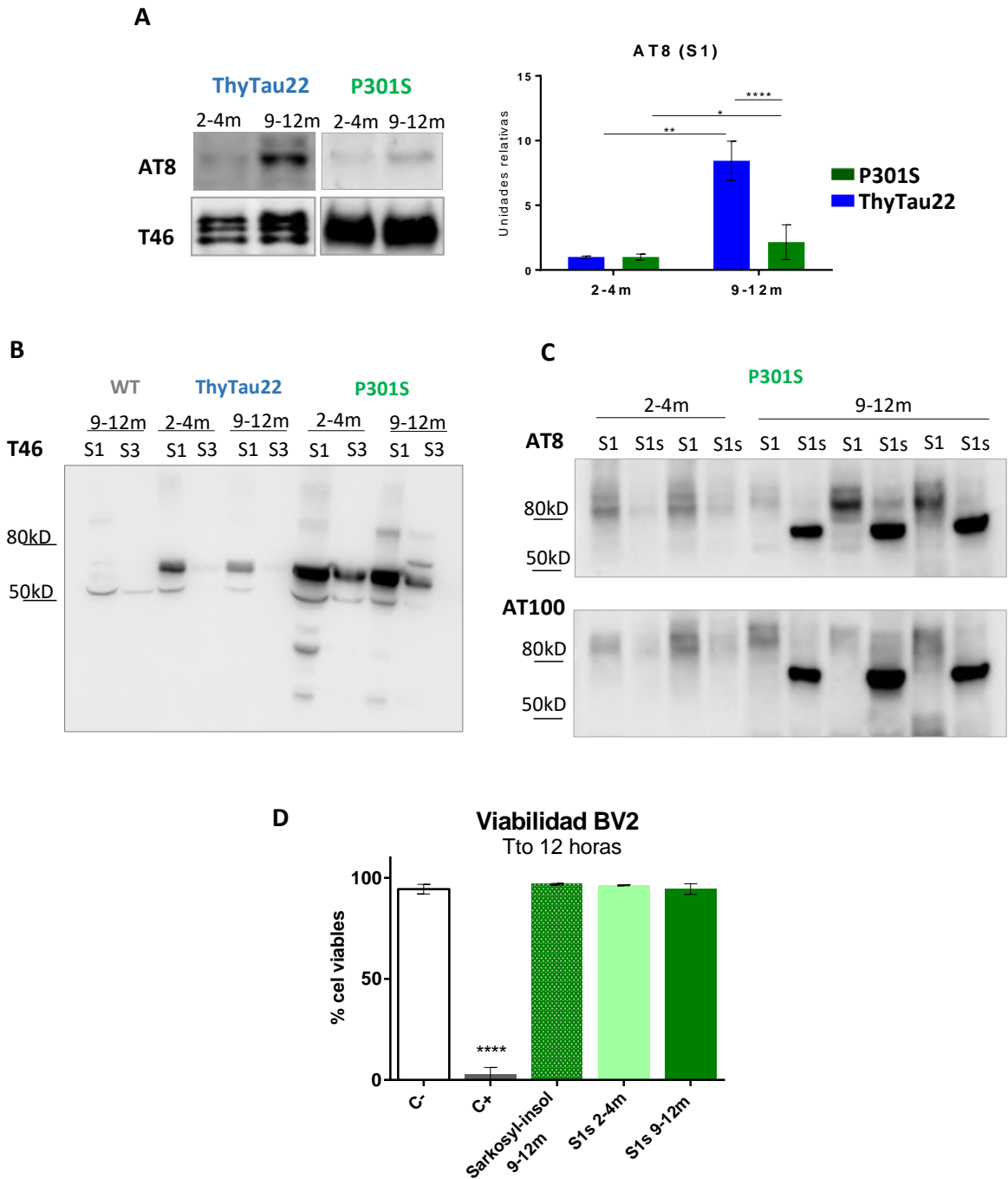


Por otro lado, evaluamos la toxicidad de fracciones solubles procedentes de ratones TAU P301S de 12 meses sobre cultivos de células BV2 (Figura D.5). Al tratarse de un modelo con mayor acumulación y fosforilación de Tau, en principio esperábamos una mayor toxicidad de sus fracciones S1 sobre la microglía. Sin embargo, la viabilidad microglial no se altera tras 12 horas de tratamiento con 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de fracciones S1 de corteza de ratones TAU P301S, ni siquiera aumentando la dosis de tratamiento (0.2 y 0.4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (Figura D.5 C). Como en este modelo la patología Tau es más pronunciada en hipocampo que en corteza cerebral, repetimos el tratamiento utilizando fracciones S1 procedentes de hipocampo de ratones TAU P301S de 12 meses de edad (Figura D.5 B). En este caso, sí se afecta la viabilidad microglial tras 12 horas de tratamiento, aunque en bastante menor medida que tras el tratamiento con fracciones S1 procedentes de la corteza de ratones ThyTAU22 de 12 meses.

#### **1.4. Caracterización de las formas agregadas de Tau en los modelos murinos de tauopatía y su toxicidad sobre la microglía**

En el modelo TAU P301S, los niveles elevados de Tau total y fosforilado correlacionan con una importante activación microglial, pero no explican la falta de toxicidad de sus fracciones solubles sobre los cultivos microgliales, más aún si se comparan con la toxicidad de las fracciones S1 del modelo ThyTAU22, con niveles considerablemente menores de las formas de Tau analizadas en el extracto total. Ante esta discrepancia, nos planteamos la posibilidad de que ambos modelos tuvieran un patrón distinto de agregación de Tau, y que el Tau acumulado y fosforilado en el modelo TAU P301S no esté en formas solubles, que son las utilizadas para los ensayos de toxicidad *in vitro*.

Para analizar nuestra hipótesis, cuantificamos con el anticuerpo AT8 las formas fosforiladas de Tau en las fracciones solubles de los ratones TAU P301S y ThyTAU22. Como se ilustra en la Figura D.7 A, las fracciones S1 de los ratones ThyTAU22 de 9-12 meses poseen mayores niveles de fosforilación de Tau que las de los ratones TAU P301S, aunque en estas últimas los niveles de Tau total analizados con T46 sean más abundantes. Sin embargo, y como hemos descrito anteriormente, en fracciones totales del modelo TAU P301S hay mayor fosforilación de Tau que en el ThyTAU22, por lo que nos planteamos que la mayoría de formas fosfo-Tau del modelo TAU P301S pudieran estar agregadas. Para esclarecer esta posibilidad, evaluamos los niveles de Tau en las fracciones S1 y S3, correspondiente a proteínas disgregables por SDS (ver Materiales y Métodos, Apartado 5). Nuestros resultados muestran, como esperábamos, que la mayoría de las formas de Tau reconocidas por el anticuerpo T46 están concentradas en la fracción S3 en el modelo TAU P301S, mientras que se localizan en la fracción S1 en el modelo ThyTAU22 (Figura D.7 B). Por tanto, la elevada agregación de Tau en el cerebro de ratones TAU P301S de 9-12 meses podría explicar la baja concentración de formas fosfo-Tau detectadas en la fracción S1 y su falta de toxicidad sobre cultivos microgliales.



**Figura D.7. La agregación de Tau es mayor en el modelo TAU P301S que en el ThyTAU22. (A)** Los niveles de fosfo-Tau (AT8) respecto a Tau total (T46) son superiores en la fracción S1 de ratones ThyTAU22 de 9-12 meses que en la correspondiente del modelo TAU P301S ( $n=3-6$ ). La significancia estadística entre animales jóvenes y viejos de cada modelo y entre animales de ambos modelos de la misma edad se ha analizado mediante el test de Student. **(B)** WB representativo de la acumulación de Tau total (T46) en las fracciones soluble (S1) y agregadas (S3) de ratones WT, ThyTAU22 y TAU P301S. **(C)** WB representativo de fosfo-Tau (AT8 y AT100) en las fracciones S1 y S1 sonicada (S1s) procedente de animales TAU P301S. **(D)** Viabilidad de células BV2 analizada por citometría de flujo (kit IP/AnnexinaV) tras 12 horas de tratamiento con las fracciones sarkosyl-insoluble y S1s de ratones TAU P301S (control positivo = estaurosporina, 1 mM) ( $n=3$ ). La significancia estadística se ha analizado mediante el test ANOVA. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Romero-Molina et al., 2018.



Para evaluar si las formas agregadas de Tau son tóxicas para la microglía, tratamos cultivos de BV2 con fracciones resistentes a Sarkosyl (ver Materiales y Métodos, Apartado 5) de animales TAU P301S de 12 meses, comprobando que la viabilidad microglial prácticamente no se afecta (es de  $96.8 \pm 0.43\%$ , Figura D.7 D). Estos resultados concuerdan con los obtenidos al tratar cultivos de microglía con fracciones insolubles de pacientes Braak V-VI (Sanchez-Mejias et al., 2016), y demuestran que las formas agregadas de Tau no son tóxicas para la microglía.

Finalmente, evaluamos si el tratamiento de células microgliales con formas disgregadas de fosfo-Tau procedentes del modelo TAU P301S reduce su viabilidad. Para ello, tras sonicar y ultracentrifugar el pellet resultante del aislamiento de la fracción S1 (P1), obtenemos un sobrenadante que constituye la fracción solubilizable por sonicación (S1s) del P1. Aunque la fracción S1s procedente de ratones TAU P301S de edades avanzadas contiene, como esperábamos, formas de Tau positivas para AT8 y AT100 (Figura D.7 C), no reduce la viabilidad de cultivos BV2 tras 12 horas de tratamiento (Figura D.7 D). La falta de toxicidad de esta fracción S1s de ratones TAU P301S es probablemente debida a que las formas de fosfo-Tau solubles resultantes del protocolo de disgregación que hemos aplicado no mantengan las estructuras asociadas a la toxicidad generada por las fracciones S1 de ratones ThyTAU22 y de pacientes de Alzheimer.

En definitiva, podemos concluir que existen diferentes patrones de acumulación, fosforilación y agregación de Tau en los ratones TAU P301S y ThyTAU22, que son responsables de las diferentes respuestas microgliales descritas en ambos modelos.

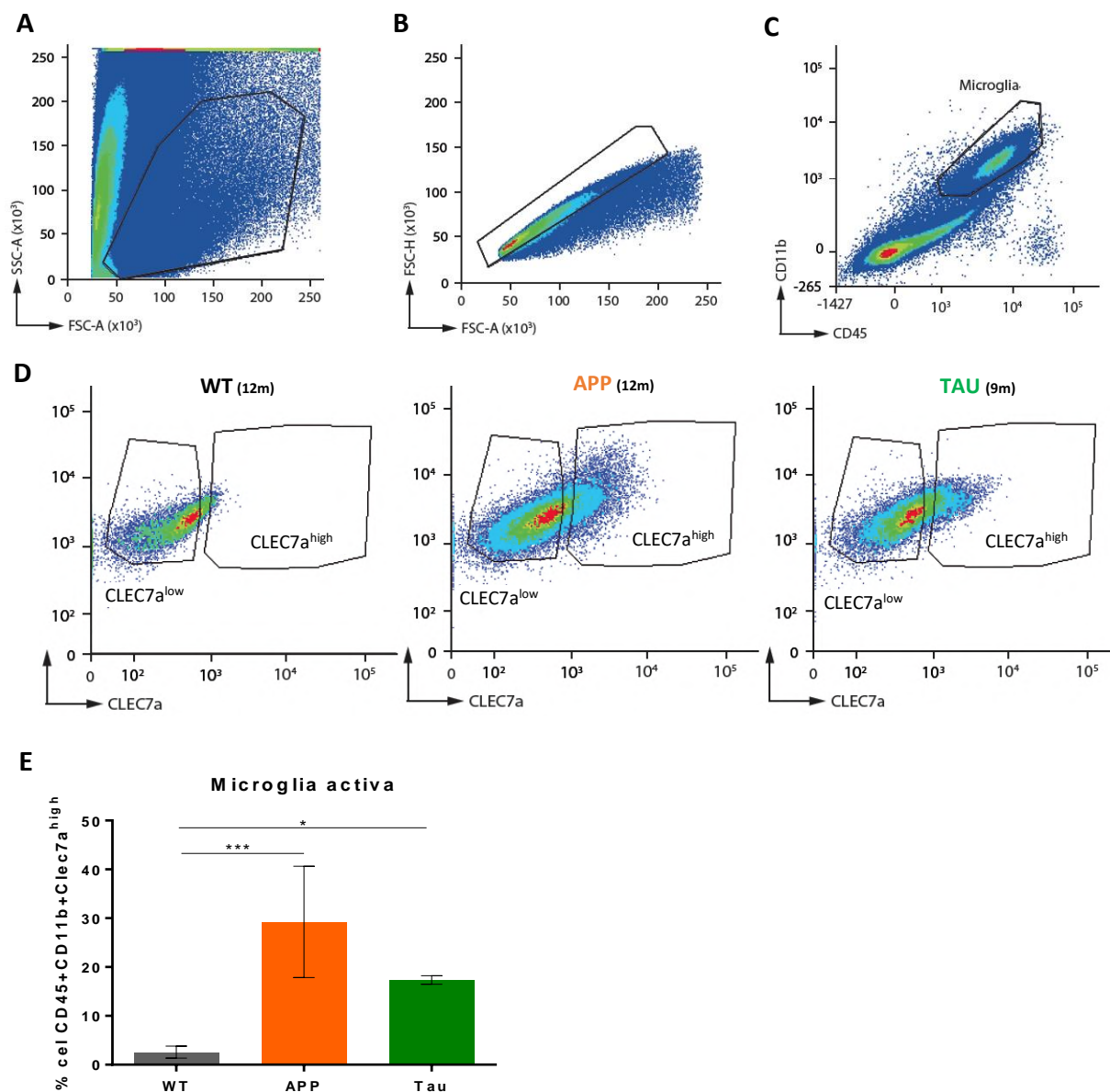
## 2. ACTIVACIÓN MICROGLIAL: PERFIL TRANSCRIPTÓMICO DE LA MICROGLÍA ACTIVA EN RESPUESTA A PATOLOGÍA ABETA Y TAU *IN VIVO*

Como previamente hemos comentado, no se conoce con exactitud el papel de la microglía en la progresión de la patología de Alzheimer. Numerosos estudios muestran una clara activación microglial en modelos de EA, e incluso en los estadios iniciales de la enfermedad en pacientes. Con el fin de esclarecer el papel de la microglía activa en el contexto de la patología de Alzheimer, en este Trabajo hemos caracterizado su perfil transcriptómico y hemos comparado las similitudes y diferencias de la activación microglial en respuesta a las patologías Abeta y Tau.

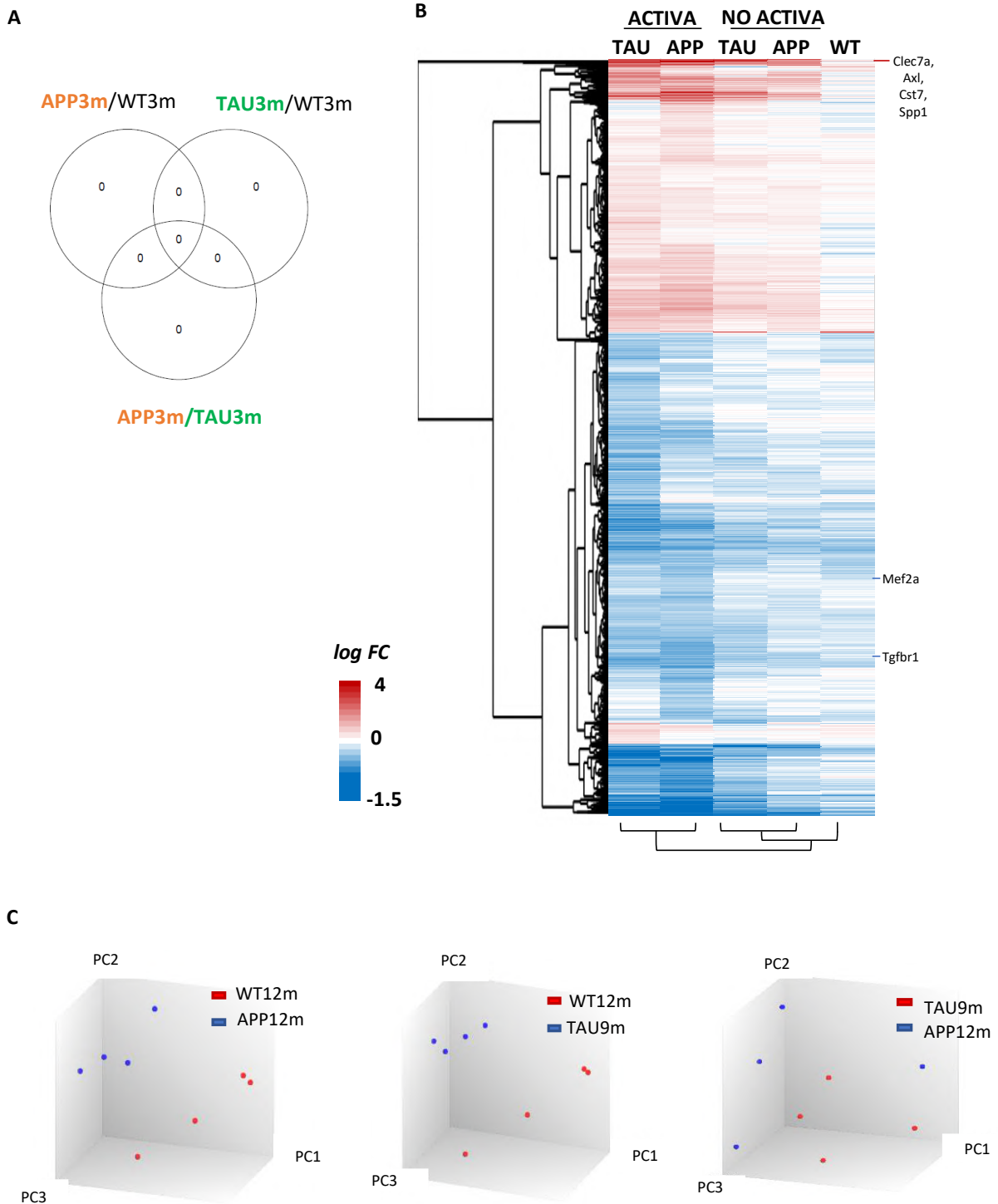
Para ello, hemos puesto a punto un método específico para aislar microglía activa (ver Materiales y Métodos, Apartado 4 y Figura D.8) y, posteriormente, hemos analizado su perfil transcriptómico mediante arrays de hibridación (ver Materiales y Métodos, Apartado 15). Hemos seleccionado como células microgliales las positivas para CD11b/CD45 y como microglía activa a las células CD11b+/CD45+/Clec7a<sup>high</sup>. Hemos utilizado ratones WT, APP y TAU P301S (al que en este Apartado nos referiremos como TAU) jóvenes (3 meses) y envejecidos (9-12 meses). En ratones jóvenes y también en WT envejecidos, hemos usado la población completa microglial ya que la microglía Clec7a<sup>high</sup> es prácticamente inexistente, mientras que en los animales APP y TAU envejecidos aislamos de forma específica la microglía Clec7a<sup>high</sup> (Figura D.8 D) para su posterior caracterización a través del array de hibridación.

### 2.1. Perfil de expresión génica durante la activación microglial

En primer lugar, caracterizamos en la microglía aislada de los ratones jóvenes (3 meses) WT, APP y TAU los genes diferencialmente expresados (DEGs, por sus siglas en inglés), y comprobamos mediante herramientas bioinformáticas que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Figura D.9 A), por lo que decidimos utilizarlos conjuntamente como condición control “jóvenes”. A continuación, obtuvimos el *heatmap* que representa los DEGs en microglía de ratones envejecidos WT (12 meses), APP (12 meses) y TAU (9 meses), tanto activa como no activa, con respecto a los ratones de 3 meses (Figura D.9 B). Como era de esperar, y como ilustra también el análisis de componentes principales (Figura D.9 C), la microglía activa (Clec7a<sup>high</sup>) de ratones TAU y APP envejecidos tiene un perfil transcriptómico similar entre sí, y diferente del WT de 12 meses. Por otro lado, la microglía no activa CD45+CD11b+Clec7a<sup>low</sup> aislada de ratones APP y TAU de 9-12 meses posee un perfil transcripcional intermedio entre el fenotipo WT y el fenotipo de microglía activa CD45+CD11b+Clec7a<sup>high</sup> de los mismos modelos, aunque guarda más similitud con el fenotipo reactivo (Figura D.9 B).



**Figura D.8. Aislamiento específico de la microglía activa de corteza cerebral e hipocampo de ratón. (A-D)** Imágenes representativas del proceso de selección de la población de interés mediante citometría de flujo con separación celular (FACS). **(A)** Representación de la complejidad frente a tamaño celular (SSC/FSC), para la eliminación de debris, restos celulares y mielina. **(B)** Representación de FSC-H/FSC-A, para seleccionar células individuales. **(C)** Selección de la población CD45<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup>, que corresponden a las células microgliales. **(D)** A partir de las células microgliales, aislamos aquellas activas (Clec7a<sup>high</sup>). **(E)** Cuantificación de la proporción de células microgliales activas en animales WT, APP y TAU de 9-12 meses de edad. La significancia se ha analizado mediante el test ANOVA, seguido del test Tuckey, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.



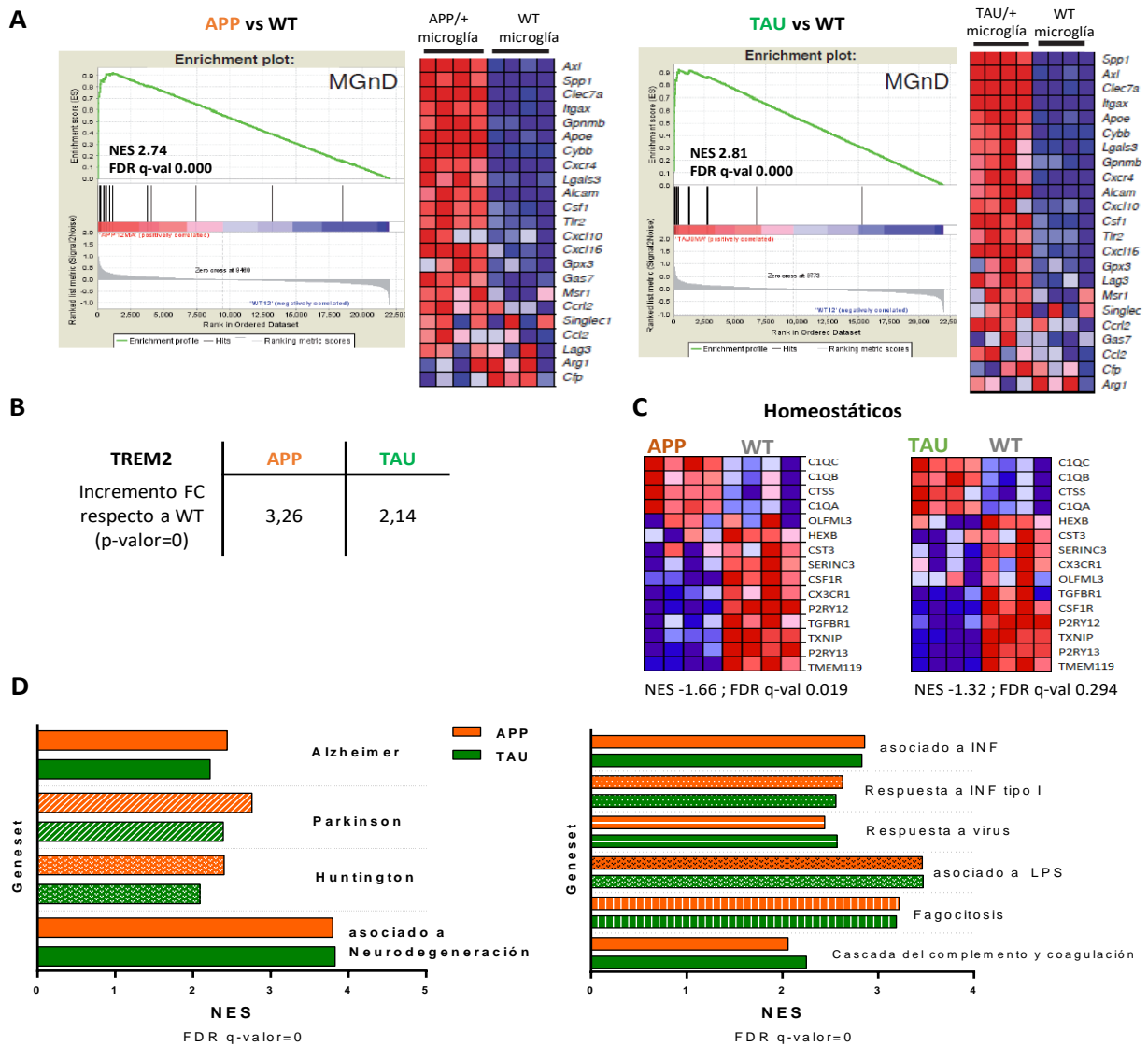
**Figura D.9. Caracterización transcriptómica de la microglía aislada del cerebro de ratones transgénicos modelos de la EA. (A)** Representación, mediante un diagrama de Venn, del número de genes diferencialmente expresados en la microglía de ratones de 3 meses WT, APP y TAU, donde se observa que no existen diferencias. **(B)** Análisis y representación, mediante *heatmap*, de los genes diferencialmente expresados, con un FDR<0,05, en la microglía (activa y no activa) aislada de ratones adultos WT (12 meses), APP (12 meses) y TAU P301S (TAU, 9 meses), con respecto al pool de animales de 3 meses (n=3-4). El código de colores muestra el valor logFC. **(C)** Representación de los componentes principales de la microglía WT frente a la microglía activa de los modelos APP y TAU. La microglía activa procedente de ambos modelos se agrupa parcialmente, y se distancia claramente de la microglía del modelo WT.

Posteriormente, nos centramos en caracterizar la microglía activa Clec7a<sup>high</sup> aislada de los ratones envejecidos con patologías Abeta y Tau mediante análisis de enriquecimiento (GSEA). Nuestros resultados muestran que, en respuesta a ambas patologías, el perfil transcriptómico de la microglía activa es diferente del de la microglía de animales WT de 12 meses, y se corresponde significativamente (FDR q-valor=0) con un fenotipo DAM y neurodegenerativo (MGnD, firma genética extraída de Krasemann et al., 2017), caracterizado por un aumento de los genes *Axl*, *Spp1*, *Clec7a*, *Itgax*, entre otros (Figura D.10 A). La expresión génica de *Trem2*, que aunque no está incluido en la firma MGnD, es esencial para la activación y funcionalidad microglial (Ulland et al., 2017), también aumenta significativamente en la microglía activa de los ratones APP y TAU envejecidos respecto a animales WT de 12 meses (Figura D.10 B). A este respecto, las imágenes de inmunohistoquímica muestran que, mientras que en el modelo APP la microglía Trem2<sup>+</sup> se localiza exclusivamente alrededor de las placas de Abeta, en el modelo TAU se distribuye homogéneamente por todo el hipocampo (Figura D.11).

Por otro lado, en concordancia con lo descrito en la literatura (Keren-Shaul et al., 2017), en la microglía activa aislada de los modelos APP y TAU disminuye la expresión, respecto a WT, del set de genes homeostáticos microgliales, que incluye genes como *Csf1r*, *P2ry12* o *Tmem119*; si bien la disminución es sólo significativa para APP (FDR<0.05) (Figura D.10 C). Además, y como se observa en la Figura D.10 D, las rutas Kegg (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) de EA, Enfermedad de Parkinson y Enfermedad de Huntington están significativamente enriquecidas en la microglía activa de los modelos APP y TAU respecto a WT, lo que confirma que, en ambos modelos, la microglía presenta un fenotipo común a enfermedades neurodegenerativas. De hecho, el módulo génico “asociado a neurodegeneración” descrito por Friedman et al. (2018) también aumenta significativamente en la microglía activa de APP y TAU. De los 134 genes incluidos en este módulo, un 75% se asocian a procesos biológicos (*GO terms*) relacionados con la membrana plasmática y el espacio extracelular, e incluye factores de transcripción como *Bhlhe40*, *Rxrg*, *Hif1a* y *Mitf*. Además, otros 10 genes (como las catepsinas *Ctsb*, *Ctsl* y *Ctsz*) se incluyen en el término ontológico “lisosoma”. También pertenecen al módulo de neurodegeneración los genes *ApoE* e *Igf1*, considerados como un posible factor neuroprotector secretado por la microglía activa (Bianchi et al., 2017). En concordancia, nuestros resultados de qPCR reflejan un aumento en la expresión de *Igf1* en tejido hipocampal completo de animales APP y TAU (Figura D.1 A).

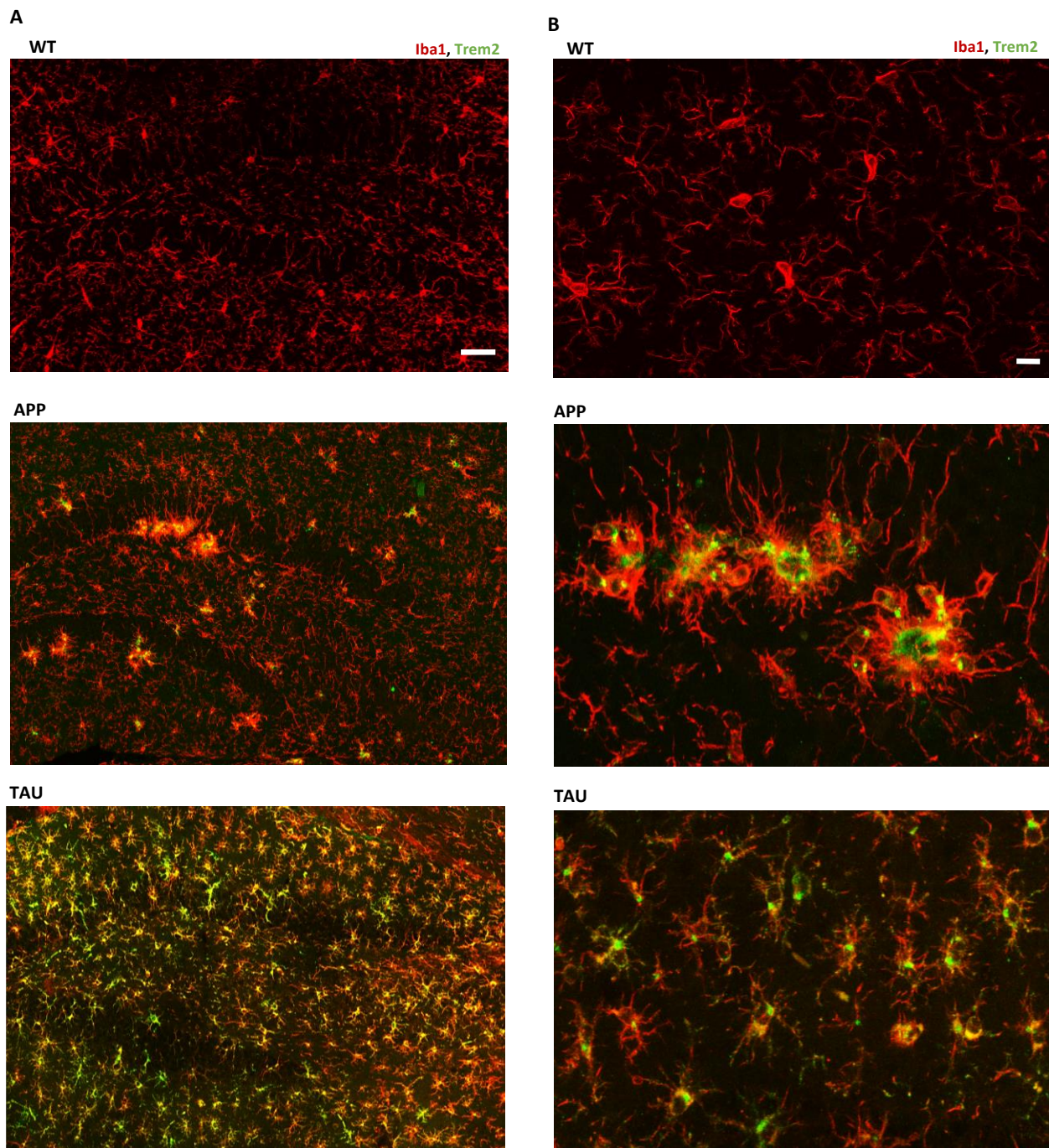
Como se ilustra en la Figura D.10 D, partiendo de diferentes firmas genéticas (*Gene sets derived from GO Biological Process Ontology*; Friedman et al., (2018); Keren-Shaul et al., (2017)), comprobamos mediante análisis de GSEA que la microglía activa aislada de los modelos APP y TAU tiene enriquecida la expresión de módulos génicos de respuesta a interferón (módulo “asociado a interferón, INF” (Friedman et al., 2018)) y a INF tipo I (*GO Biological Process Ontology*), que incluyen miembros de las

familias Oas e Ifit, así como factores de transcripción como Irf7 y Stat1. Ya que el módulo génico INF está presente en modelos de respuesta a virus (Friedman et al., 2018), es lógico que observemos también un enriquecimiento del proceso biológico “Respuesta a virus”. Además, se produce un aumento de expresión del módulo de respuesta a LPS (que incluye los genes inflamatorios Cd44, Ccl5 y Tspo, entre otros), del set génico “fagocitosis” (Krasemann et al., 2017) y del proceso biológico “cascada del complemento y coagulación” (*GO Biological Process Ontology*).



**Figura D.10. La microglía activa de los modelos APP y TAU presenta un fenotipo MGnD y una respuesta inflamatoria asociada a neurodegeneración.** Comparación de la microglía *Clec7a*<sup>high</sup> aislada de los ratones APP (12 meses) y TAU (9 meses) respecto a WT (12 meses). **(A)** Enriquecimiento y *heatmap* de los genes incluidos en la firma de activación microglial MGnD (Krasemann et al., 2017). **(B)** Fold-change (FC) de Trem2 en la microglía activa de los modelos APP y TAU respecto a WT. **(C)** *Heatmap* de los genes incluidos en la firma homeostática (Keren-Shaul et al., 2017). **(D)** Rutas enriquecidas en la microglía activa: EA, Parkinson y Huntington (*KEGG pathway database*), firma genética asociada a neurodegeneración, a INF (interferón) y a LPS (Friedman et al., 2018), módulo de fagocitosis (Krasemann et al., 2017) y procesos biológicos de respuesta a INF tipo I, a virus y de la cascada del complemento y coagulación (*GO Biological Process Ontology*). NES: factor de enriquecimiento normalizado; FDR q-val: p-valor ajustado. El rango de colores del *heatmap* muestra el rango de valores de expresión génica, donde el rojo se corresponde con la expresión máxima y el azul con la expresión mínima.





**Figura D.11. Ilustración de la microglía Trem2+ en el hipocampo de ratones APP y TAU.** Inmunohistoquímica con marcaje Iba1 (rojo), Trem2 (verde) en hipocampo de ratones WT, APP y TAU. La microglía Trem2+ se distribuye exclusivamente alrededor de las placas en el modelo APP, mientras que en el modelo TAU se distribuye de manera homogénea por todo el parénquima hipocampal. Barras de escalas: 50  $\mu\text{m}$  (A); 10  $\mu\text{m}$  (B).

## 2.2. La microglía activa presenta un metabolismo oxidativo, dependiente de Trem2

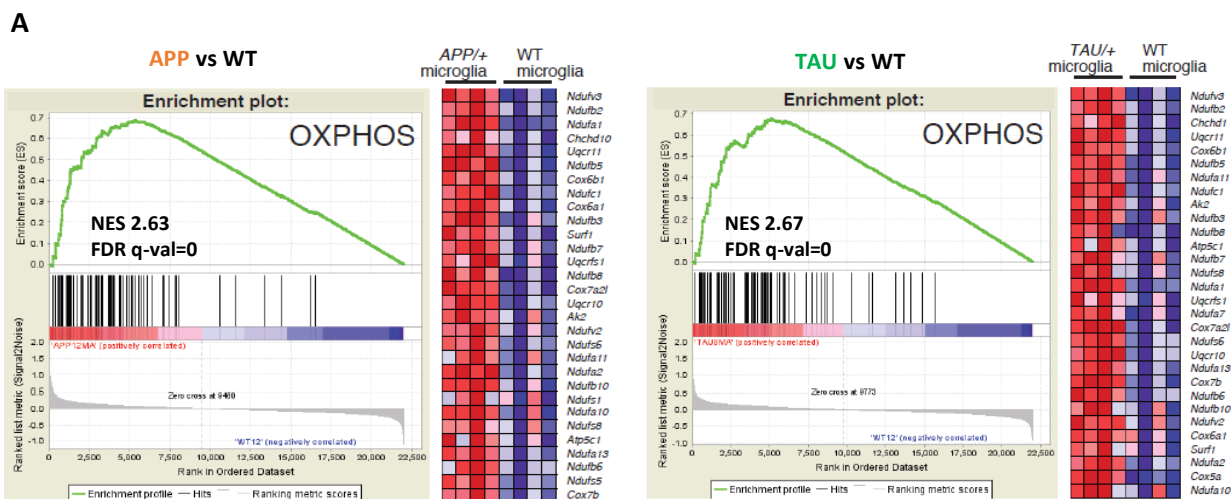
A continuación, caracterizamos el metabolismo que sustenta la activación microglial. Diversas publicaciones asocian la activación pro-inflamatoria de macrófagos a un metabolismo principalmente glucolítico (ver Introducción, Apartado 6.1.2). Sin embargo, en la microglía activa aislada de ratones APP y TAU, el proceso biológico más enriquecido respecto a WT es la fosforilación oxidativa (OXPHOS) (Figura D.12 A). Dicha microglía se caracteriza por un aumento significativo de genes que codifican proteínas de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, como *Nudfv3* (complejo I), *Sdhb* (complejo II), *Uqcrl1* (complejo III) o *Cox6a1* (complejo IV). Además, como se muestra en la Figura D.12 B, los procesos biológicos “cadena transportadora de electrones”, “respiración celular”, “ensamblaje del complejo de la cadena respiratoria mitocondrial” y “biogénesis del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial” están significativamente enriquecidos en la microglía activa de los modelos Abeta y Tau. De hecho, las firmas génicas relacionadas con la respuesta antiviral, cuyo incremento ha sido previamente descrito en modelos de EA (Friedman et al., 2018), y con la respiración aerobia constituyen el 50% de los 15 procesos biológicos más enriquecidos en la microglía reactiva respecto a WT (Figura D.12 C).

Aparte, analizando en detalle los genes incluidos en la ruta KEGG “Enfermedad de Alzheimer”, observamos que se incluyen numerosos genes implicados en la OXPHOS (Figura D.13). El hecho de que la microglía activa se caracterice por un enriquecimiento significativo de la ruta “Enfermedad de Alzheimer” (Figura D.10. D) apoya la importancia de la fosforilación oxidativa en el proceso de activación microglial.

Actualmente, los estudios de proteómica y metabolómica suponen una novedosa herramienta para corroborar estos planteamientos (Rayaprolu et al., 2020), por lo que en este Trabajo, hemos tratado de realizar un estudio metabolómico de células microgliales aisladas. Para ello, hemos testado diferentes aproximaciones con el fin de minimizar el tiempo de procesamiento del tejido y maximizar el número de células aisladas, eligiendo finalmente el protocolo desarrollado por Miltenyi Biotec (Adult Brain Dissociation Kit, ver Materiales y Métodos, Apartado 4.3) y el aislamiento por FACS. Sin embargo, la calidad de la muestra no ha sido la adecuada para obtener resultados fiables, probablemente debido a (i) cambios del estado de los metabolitos, que puede verse alterado por la citometría de flujo, y (ii) al elevado número de células requerido para la técnica (Artyomov y Bossche, 2020). Por tanto, estamos realizando nuevos esfuerzos para perfeccionar la técnica y poder obtener información concluyente sobre los metabolitos presentes en la microglía activa de ambos modelos animales.

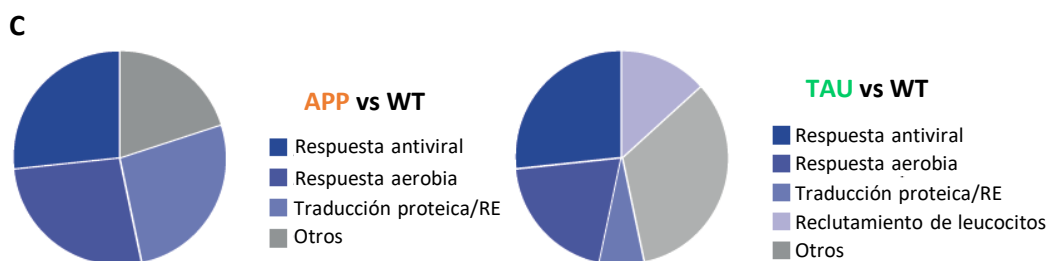


Por otro lado, con el objetivo de cuantificar la expresión proteica de los complejos mitocondriales y/o su actividad enzimática hemos puesto a punto una técnica de electroforesis capilar de gran sensibilidad (Jess, Bio-Technee) (ver Materiales y Métodos, Apartado 12). Frente al protocolo clásico de western-blot, esta tecnología permite reducir considerablemente el volumen de muestra necesario y detectar varios anticuerpos, incluso con pesos moleculares similares, simultáneamente y con elevada sensibilidad, gracias a su triple sistema de detección. Sin embargo, dado el bajo número de células microgliales Cd45+ Cd11b+ Clec7a<sup>high</sup> obtenido tras los aislamientos, no hemos sido capaces de detectar las proteínas de interés y seguimos trabajando en la optimización de la técnica.



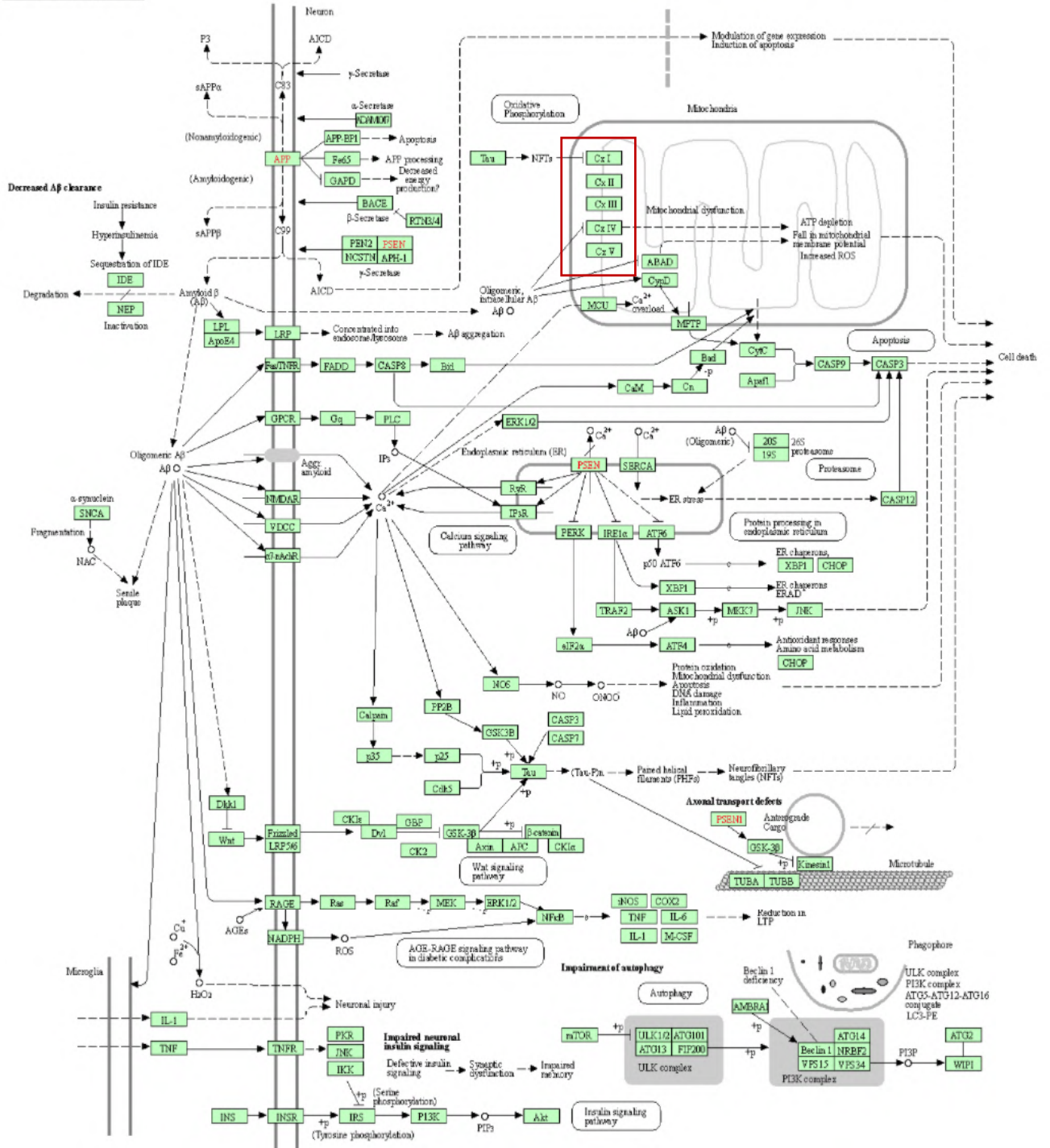
**B**

Proceso Biológico (enriquecimiento respecto a WT)	APP	TAU
	NES FDR q-val =0	
Cadena transportadora de electrones	2.51	2.52
Respiración celular	2.42	2.26
Ensamblaje del complejo de la cadena respiratoria mitocondrial	2.27	2.22
Biogénesis del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial	2.36	2.34



**Figura D.12. La microglía activa aislada de los modelos APP y TAU presenta un metabolismo oxidativo.** Comparativa de la microglía activa de ratones APP (12 meses) y TAU (9 meses) versus WT (12 meses). **(A)** Representación gráfica de enriquecimiento y *heatmap* de los genes incluidos en el proceso biológico fosforilación oxidativa (*GO Biological Process Ontology*). El rango de colores del *heatmap* muestra el rango de valores de expresión génica, donde el rojo se corresponde con la expresión máxima y el azul con la expresión mínima. **(B)** Enriquecimientos de procesos biológicos relacionados con la fase III del metabolismo. NES: factor de enriquecimiento normalizado; FDR q-value: p-valor ajustado, más restrictivo. **(C)** Diagrama de sectores de las funciones biológicas representadas en los 15 set génicos más enriquecidos en la microglía activa respecto a WT.

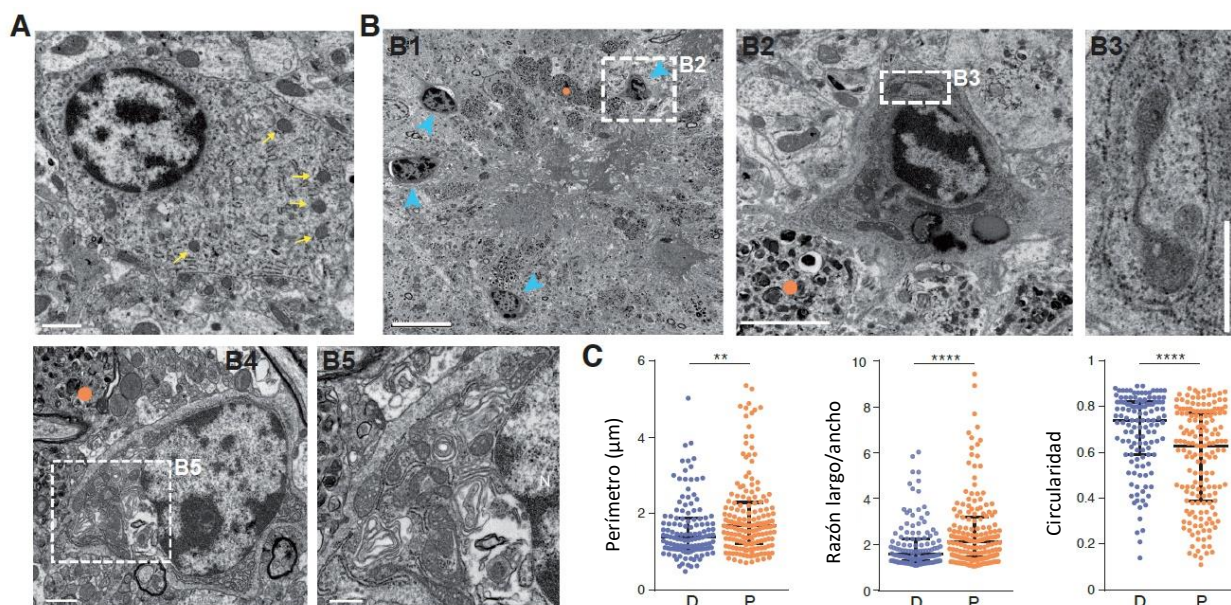
ALZHEIMER DISEASE



**Figura D.13. Diagrama de los genes incluidos en la ruta KEGG Enfermedad de Alzheimer.** Se representa esquemáticamente la función de los genes incluidos en la ruta EA. Se destacan los genes incluidos implicados en la fosforilación oxidativa. Imagen obtenida de <https://www.genome.jp/kegg/pathway/hsa/hsa05010.html>.

### 2.2.1. La microglía activa presenta elongación mitocondrial

Tras estos resultados, analizamos mediante microscopía electrónica, en colaboración con el laboratorio de la Dra. Antonia Gutiérrez, la morfología mitocondrial de la microglía cercana a placas de Abeta (microglía activa, Trem2+ y con un pronunciado metabolismo oxidativo) frente a la de la microglía no activa lejana a placas de Abeta en el modelo amiloidogénico APP/PS1 (12 meses). Como se observa en la Figura D.14 B4 y B5, la microglía próxima a las placas posee un gran número de mitocondrias asociadas a un abundante retículo endoplásmico rugoso. Además, mientras que las mitocondrias de la microglía no activa distal (D) de las placas tienen una forma redondeada típica (Figura D.14 A), las de la microglía activa próxima (P) a placas presentan morfología elongada y con un mayor perímetro (Figura D.14 B2, B3 y C). La elongación mitocondrial maximiza el funcionamiento del ciclo de Krebs para la biosíntesis y la producción de ATP (Gomes et al., 2011; Li et al., 2017). Además, dicha morfología mitocondrial contribuye al mantenimiento de la respiración aeróbica microglial bajo estrés y previene la mitofagia inducida por hipoxia o/y baja disponibilidad de recursos (Gomes et al., 2011; Rambold et al., 2011).



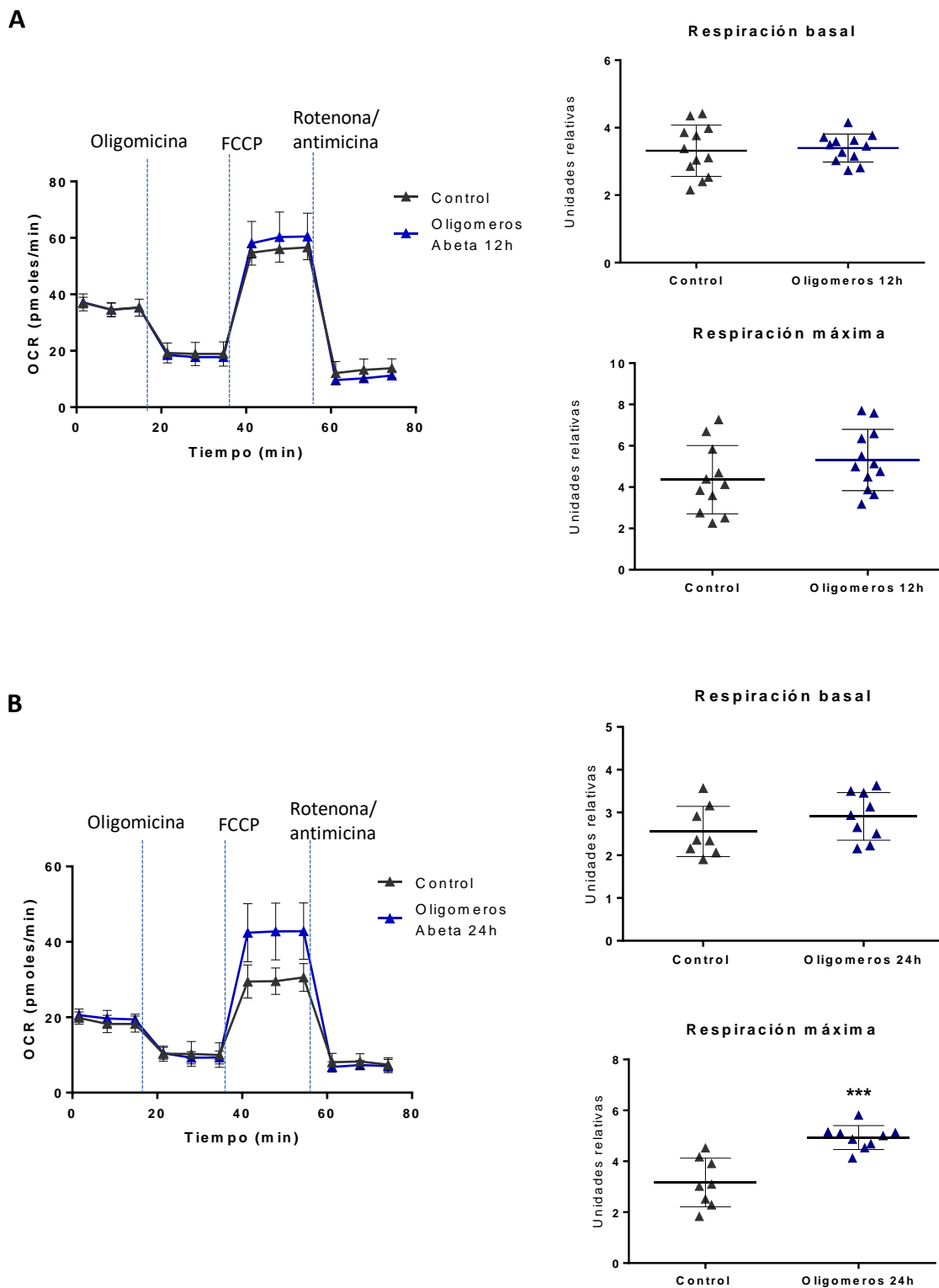
**Figura D.14. Las mitocondrias de la microglía asociada a placas de Abeta presentan morfología elongada. (A, B)** Microscopía electrónica de secciones corticales de ratones APP/PS1 con patología amiloide establecida. La microglía se distingue por su citoplasma oscurecido. Barras de escala: A: 1  $\mu\text{m}$ ; B1: 10  $\mu\text{m}$ ; B2: 2  $\mu\text{m}$ ; B3: 0,5  $\mu\text{m}$ ; B4: 1  $\mu\text{m}$  y B5: 0,5  $\mu\text{m}$ . **(A)** Corresponde a una célula de microglía homeostática distal de placas de Abeta. Las flechas amarillas señalan mitocondrias, que tienen forma redondeada típica. **(B)** Microglía próxima a placas de Abeta. Los círculos naranjas marcan neuritas distróficas localizadas en la proximidad de placas amiloides. B1: las células microgliales (marcadas por flechas azules) rodean la placa de Abeta. B4: microglía cercana a placa de Abeta. B2, B3 y B5 corresponden a ampliaciones de los rectángulos blancos. En B3, se observa una mitocondrial alargada y bilobulada. **(C)** Cuantificación del perímetro, la razón largo/ancho y la circularidad de mitocondrias de microglía distal (D) y proximal (P) a placas de Abeta (n = 128 "P" y 166 "D" mitocondrias de 25 "P" y 32 "D" células microgliales; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.0001, test Mann-Whitney).

### **2.2.2. El tratamiento *in vitro* con oligómeros de Abeta aumenta la capacidad respiratoria máxima microglial**

Tras observar, mediante estudios transcriptómicos, que en la microglía aislada de modelos murinos de EA se produce un incremento significativo del metabolismo oxidativo, nos planteamos reproducir *in vitro* este fenotipo energético. Para ello, tratamos cultivos de microglía primaria con oligómeros de Abeta (10  $\mu$ M) durante 12 o 24 horas. Hemos elegido la dosis de Abeta oligomérico capaz de inducir una producción microglial de citoquinas pro-inflamatorias tras 3 horas de tratamiento (Figura D. 17). El metabolismo microglial se determina usando el analizador de flujo extracelular Seahorse XFp (Ver Materiales y métodos, Apartado 20). Este equipo permite medir la velocidad de consumo de oxígeno (OCR, del inglés *oxygen consumption rate*) tanto en condiciones basales, como tras la administración de diferentes compuestos moduladores del metabolismo (oligomicina, FCCP, rotenona y antimicina A).

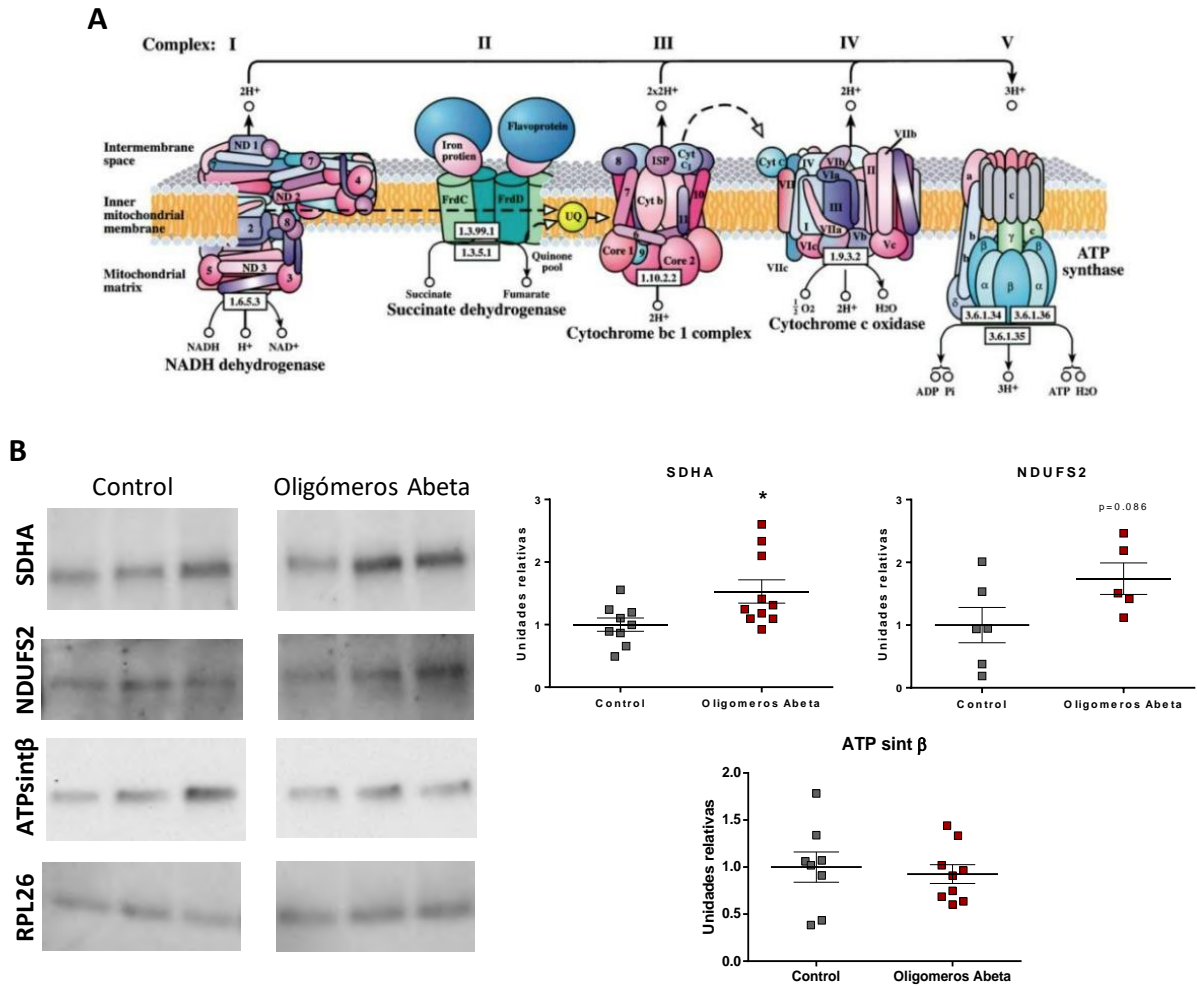
Como se muestra en la Figura D.15, tras 12 horas de tratamiento con formas oligoméricas de Abeta, no existen diferencias en la respiración basal, pero se registra una tendencia al aumento de la respiración máxima de las células microgliales. Tras 24 horas de tratamiento, este incremento en la capacidad respiratoria máxima es estadísticamente significativo, siendo el único parámetro que varía significativamente. Por tanto, se requiere una exposición prolongada a formas oligoméricas de Abeta para inducir un incremento de la capacidad respiratoria máxima. Estos resultados apoyan nuevamente que la activación crónica de la microglía por la patología amiloide produce un incremento de su capacidad respiratoria mitocondrial.

Además, mediante western-blot, hemos evaluado la expresión proteica de subunidades que componen los complejos mitocondriales de la cadena transportadora de electrones tras la exposición a oligómeros de Abeta *in vitro*. La SDHA (subunidad A del complejo succinato deshidrogenasa) es la subunidad catalítica principal del complejo II; la NDUFS2 (NADH deshidrogenasa ubiquinona hierro-sulfuro proteína 2) es una subunidad esencial del complejo I y la ATP sintasa beta es la subunidad catalítica del complejo V (Figura D.15 A). Dado que hemos observado que el tratamiento prolongado (24 horas) con Abeta oligomérico induce la síntesis de beta-actina (datos no mostrados), hemos utilizado la proteína *housekeeping* L26 ribosomal 60S (RPL26) para normalizar los resultados. Como se ilustra en la Figura D.15 B, el tratamiento de la microglía primaria con oligómeros de Abeta (10  $\mu$ M) durante 24 horas induce un aumento significativo de SDHA, una tendencia al incremento en NDUSF2 y no modifica la expresión proteica de ATP sintasa beta. Por consiguiente, estos resultados reflejan un aumento moderado de la biosíntesis de los complejos mitocondriales implicados en la fosforilación oxidativa, y concuerda con el incremento de la capacidad respiratoria máxima observado en los ensayos de Seahorse (Figura D.15 B).



**Figura D.15. El tratamiento con oligómeros de Abeta aumenta la capacidad máxima respiratoria microglial *in vitro*.** Medida del consumo de oxígeno mediante ensayos de *Seahorse* en cultivos microgliales tratados con oligómeros de Abeta (10  $\mu$ M) durante 12 (**A**) ó 24 (**B**) horas. Las líneas discontinuas señalan en qué momento se inyectaron los reactivos indicados (Oligomicina, FCCP y rotenona/antimicina). La respiración máxima ha sido calculada teniendo en cuenta el consumo de oxígeno tras el desacople mitocondrial (adición de FCCP) y tras la inhibición de los complejos I y III (adición de rotenona/antimicina). La significancia estadística ha sido analizada mediante test de Student. \*\*\*  $p < 0.001$ .





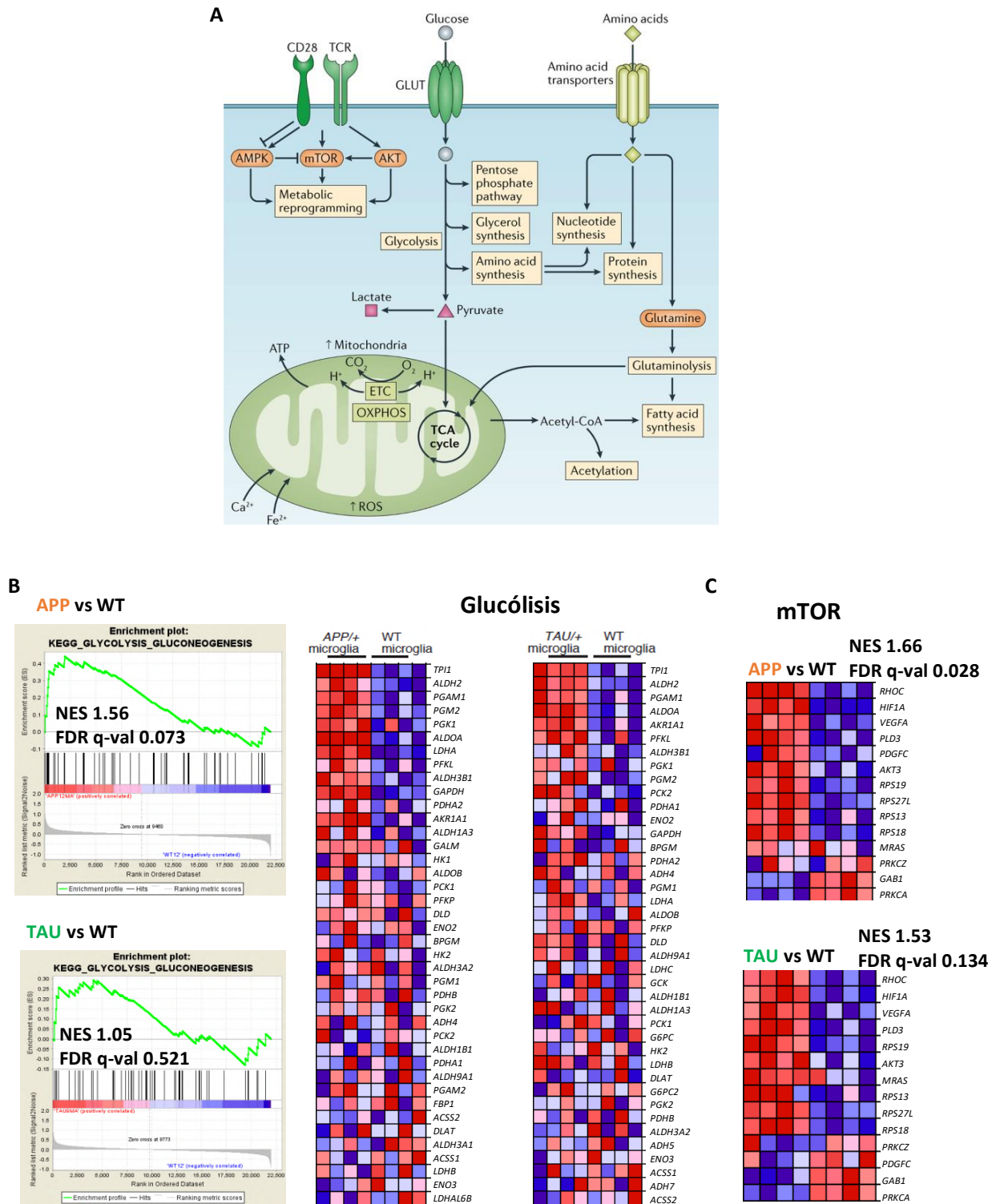
**Figura D.16. Estudio de la expresión proteica de los complejos de la cadena de transporte de electrones. (A)** Diagrama de los complejos proteicos implicados en la cadena respiratoria mitocondrial. **(B)** Western-blots representativos y cuantificación de la expresión proteica de las subunidades SDHA (complejo II, succinato deshidrogenasa), NDUFS2 (complejo I, NADH deshidrogenasa) y ATP sintasa beta (complejo V, ATP sintasa), normalizada por RPL26, en microglía primaria control o tratada con oligómeros de Abeta (10 μM) durante 24 horas. La significancia estadística se ha analizado mediante test de Student. \* p < 0.05.

### 2.2.3. El incremento del metabolismo oxidativo en la microglía activa parece estar mediado por activación de la vía Trem2-mTOR

Basándonos en los resultados anteriores, pensamos que el aumento del metabolismo oxidativo en la microglía activa de los modelos murinos de EA probablemente estuviese acompañado de un significativo incremento del flujo glucolítico. Sin embargo, en la microglía aislada de ratones APP de 12 meses, mientras que el proceso biológico OXPHOS presenta un NES = 2.63 (FDR q-val=0), la glucólisis presenta un NES = 1.56 (FDR q-val = 0.073). Además no existe aumento del proceso glucolítico en la microglía activa aislada de ratones TAU de 9 meses (NES = 1.05, FDR q-val=0.521) (Figura D.17 B). Por consiguiente, nos planteamos que el llamativo incremento de la OXPHOS podría estar impulsado por otras vías de señalización implicadas en reprogramaciones metabólicas (Figura D.16 A), como la ruta

Trem2-mTOR, esencial para el metabolismo del fenotipo DAM (Ulland et al., 2017). Nuestro análisis transcriptómico muestra que en la microglía Clec7a<sup>high</sup> de ratones envejecidos APP y TAU se produce un enriquecimiento de la ruta mTOR (firma génica descrita por Ulland et al., 2017) en comparación con WT (Figura D.17 C). Este enriquecimiento, aunque sólo es estadísticamente significativo en presencia de patología amiloide, es superior al enriquecimiento de la ruta glucolítica. Además, como se observa en la Figura D.14, las imágenes ultraestructurales de las mitocondrias de microglía asociada a placas amiloides sugieren una capacidad biosintética dependiente de mTOR (Morita et al., 2015). Por todo ello, la activación del eje Trem2-mTOR-OXPHOS podría explicar el incremento del metabolismo oxidativo en la microglía activa en ratones envejecidos APP y Tau.

Trem2 es esencial para la supervivencia y proliferación microglial (Poliani et al., 2015; Ulland et al., 2017; Yeh et al., 2017) y su interacción con ApoE resulta indispensable para la expresión génica del fenotipo microglial DAM (Krasemann et al., 2017). De hecho, la microglía activa DAM de los modelos APP y TAU de 9-12 meses aumenta su expresión de Trem2 respecto a la microglía homeostática de animales WT (Figura D.10 B). Además, numerosas publicaciones describen cómo la participación de Trem2 es fundamental para la fagocitosis de Abeta (Yeh et al., 2016; Zhao et al., 2018). Por consiguiente, en el modelo APP, el metabolismo oxidativo de la microglía activa podría estar mediado por el eje Abeta-Trem2-mTOR-OXPHOS. Sin embargo, es necesario aclarar qué formas de Abeta median la activación de Trem2 y cómo dicho proceso interviene en la activación microglial.



**Figura D.17. El metabolismo oxidativo de la microglía activa podría estar mediado vía mTOR. (A)** Diagrama de las vías implicadas en el metabolismo oxidativo; imagen tomada de Bantug et al. (2018). **(B, C).** Comparativa de la microglía activa de ratones APP (12 meses) y TAU (9 meses) versus WT (12 meses). NES: factor de enriquecimiento normalizado; FDR q-value: p-valor ajustado, más restrictivo. El rango de colores del *heatmap* muestra el rango de valores de expresión génica, donde el rojo se corresponde con la expresión máxima y el azul con la expresión mínima. **(B)** Representación gráfica de enriquecimiento y *heatmap* de los genes incluidos en la ruta glucólisis/gluconeogénesis (KEGG pathway database). **(C)** *Heatmap* de los genes incluidos en la firma génica mTOR (Ulland et al., 2017).

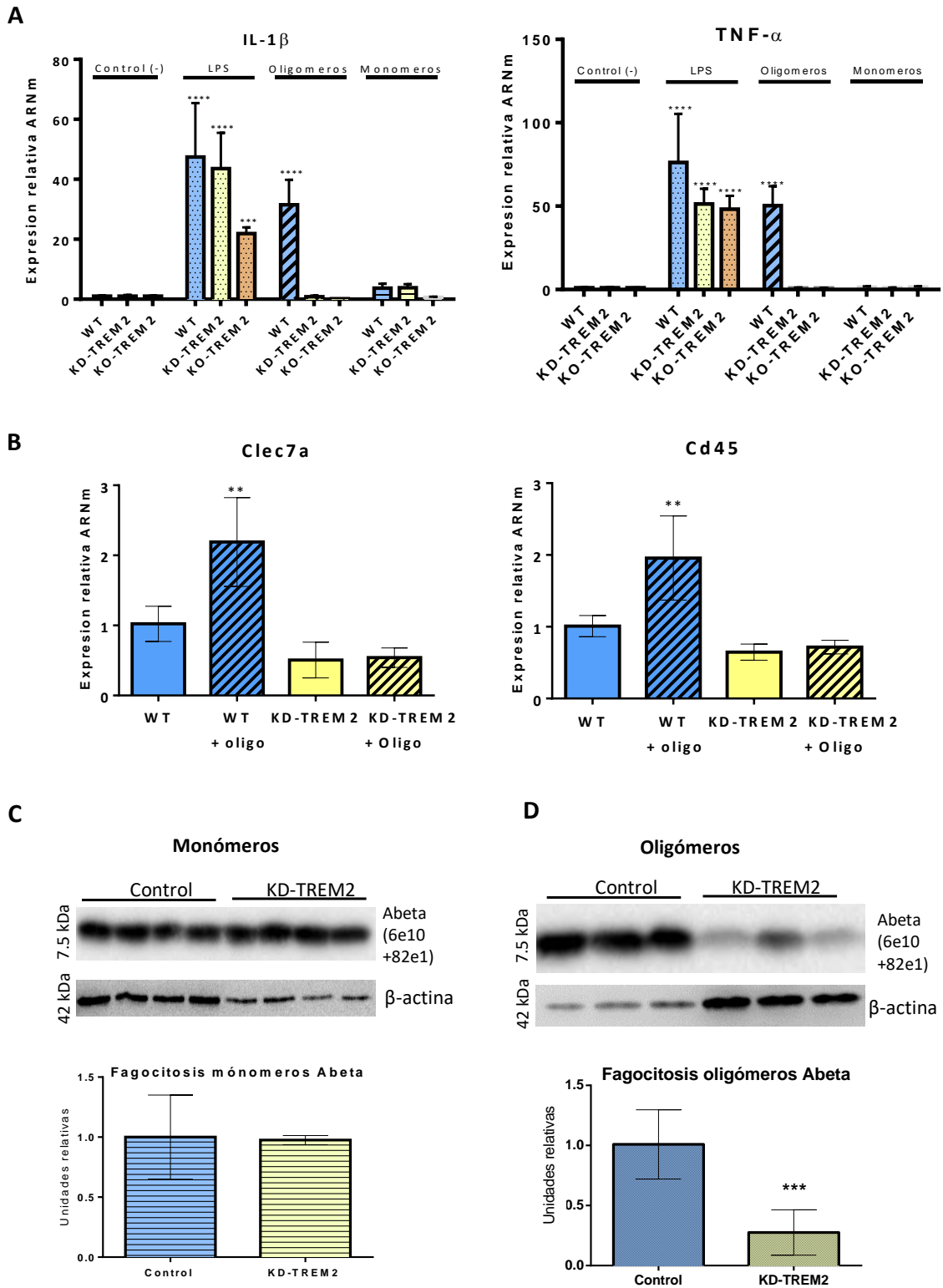


Para evaluar si Trem2 es indispensable para la activación microglial, utilizamos cultivos primarios de microglía tratados con LPS (control positivo de activación, 1 mg/ml), y con distintas formas de Abeta (10  $\mu$ M). Como se muestra en la Figura D.18, el tratamiento durante 3 horas con Abeta oligomérico, pero no con Abeta monomérico, induce la expresión de IL1 $\beta$  y TNF en un cultivo de microglía primaria de ratones WT. Es decir, las formas oligoméricas amiloides inducen una estimulación microglial *in vitro* similar, aunque ligeramente inferior, a la inducida por LPS.

Paralelamente, usamos cultivos de microglía primaria de ratones Trem2-KO, y cultivos procedentes de ratones WT a los que añadimos un RNA-interferente (*small-hairpin RNA*) para Trem2 (Trem2 knock-down, Trem2-KD). La técnica de silenciamiento reduce la expresión de Trem2, cuantificada mediante qPCR, en un 80% ( $p < 0.05$ ,  $n = 8$ ), (resultados no mostrados). Además, para comprobar que el silenciamiento de Trem2 se produce de forma específica cuantificamos, mediante qPCR, la expresión de Trem1. Como esperábamos, la expresión de Trem1 no varía tras el tratamiento con RNA-interferente para Trem2 (datos no mostrados). Tanto en el cultivo Trem2-KO, como en los cultivos Trem2-KD, la estimulación con LPS mantiene la inducción de las citoquinas pro-inflamatorias, lo que indica que el LPS interacciona con receptores microgliales diferentes a Trem2, como TLR2 y TLR4. En el caso del tratamiento con Abeta monomérico, la expresión de IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$  no se modifica, como era de esperar tras los resultados en el cultivo de microglía WT. En contraposición, el tratamiento con Abeta oligomérico no estimula la respuesta inflamatoria microglial en ausencia de Trem2, indicando que la interacción entre Abeta y Trem2 es indispensable para la activación microglial. De hecho, en cultivos de microglía primaria tratados con Abeta oligomérico aumenta la expresión de los marcadores de activación microglial Cd45 y Clec7a, pero no en los cultivos Trem2-KD (Figura D.18 B). Estos resultados apoyan la idea de que el cambio fenotípico de microglía homeostática a DAM es dependiente de la señalización mediada por Trem2.

En segundo lugar, evaluamos el papel de Trem2 en la fagocitosis de Abeta. Para ello, tratamos cultivos de microglía primaria WT y Trem2-KD con monómeros y oligómeros de Abeta (10  $\mu$ M) durante 3 horas, tiempo óptimo para la fagocitosis, pero no degradación intracelular, de Abeta. Mediante WB, estudiamos la acumulación de Abeta en el interior microglial, observando que, mientras que la fagocitosis de monómeros de Abeta es independiente de Trem2, la de oligómeros de Abeta disminuye en los cultivos microgliales con expresión deficiente de Trem2 (Figura D.18 C).

En resumen, nuestros datos demuestran que Trem2 es un receptor crucial para la inducción del fenotipo DAM a través del eje Trem2-mTOR-OXPPOS, y es indispensable para la internalización de formas oligoméricas amiloides.



**Figura D.18. Trem2 es indispensable para la activación microglial y fagocitosis de Abeta oligomérico.**

Tratamiento de cultivos de microglía primaria de ratones WT, WT con Trem2 silenciado (KD-Trem2) y KO-Trem2 tras tratamientos de 3 horas con LPS (1 mg/ml), Abeta monomérico o Abeta oligomérico (10  $\mu$ M). Expresión de **(A)** citoquinas pro-inflamatorias (n=4-6), de **(B)** genes de activación microglial (n=4). **(C, D)** Niveles de Abeta en la microglía tras la fagocitosis de (C) monómeros y (D) oligómeros, por microglía primaria control y KD-Trem2 (n=4). La significancia se ha analizado mediante t-test respecto su condición control correspondiente. \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001.

### 2.3. Diferencias transcripcionales específicas en respuesta a las patologías Abeta y Tau

Finalmente, comparamos directamente los perfiles de expresión génica de la microglía activada por las patologías Abeta y Tau. En la Figura D.19 A, se muestran los genes expresados diferencialmente (DEGs) en la microglía activa aislada de ratones envejecidos APP y TAU, respecto a la microglía de WT de 12 meses, con un  $[\log\text{FoldChange}] > 0.5$  y  $p\text{-valor} < 0.05$ . Aunque muchos de estos genes son comunes en los ratones APP y TAU de 9-12 meses, aproximadamente la mitad de los DEGs son específicos de cada patología, lo que parece indicar que existe una diferente respuesta microglial dependiente del estímulo. La comparación directa de los DEGs aumentados en la microglía activa aislada de APP respecto a TAU (Figura D.19 B y ver Anexo, Tabla Suplementaria 7), muestra un aumento en la expresión del factor de crecimiento insulínico (Igf1), de la glicoproteína NMB (Gpnmb) asociada a amiloidosis, o del factor 3 inducible por hipoxia (Egln3), entre otros. Además, analizamos mediante GSEA las rutas enriquecidas en la microglía activa de animales APP de 12 meses respecto a ratones TAU de 9 meses, y observamos un enriquecimiento estadísticamente significativo de la firma hipóxica (firma génica elaborada por el grupo de investigación del Dr. Alberto Pascual) que se manifiesta por un aumento significativo en la expresión de genes como *Ero1*, *Hif1*, *Bhlhe40* o *Prelid2*. Estos resultados indican que la microglía activa en el modelo APP, situada alrededor de las placas, está sometida a una menor disponibilidad de oxígeno. Por otro lado, en la microglía asociada a placa, en comparación con la microglía activa del modelo TAU, también observamos un enriquecimiento de procesos biosintéticos de alcoholes y esteroides, que podría reflejar la relación entre Abeta y colesterol (Barbero-Camps et al., 2018; de Dios et al., 2019; Mandrekar et al., 2009; Nugent et al., 2020).

En contraposición, al evaluar los procesos biológicos enriquecidos en la microglía activa del modelo TAU de 9 meses respecto a APP 12 meses, no encontramos ningún enriquecimiento estadísticamente significativo. Sin embargo, si utilizamos el parámetro estadístico  $p\text{-valor}$  normalizado (que es menos restrictivo), observamos en el modelo TAU respecto a APP un enriquecimiento en rutas de inflamación en respuesta a antígenos y señalización mediada por quimioquinas (Figura D.19 C), que concuerda con el aumento significativo de la expresión de genes implicados en la presentación de antígenos (*H2-Aa*, *CD74*, *H2-Ab1*, *H2-Eb1*) (Figura D.19 B y ver Anexo, Tabla Suplementaria 8).

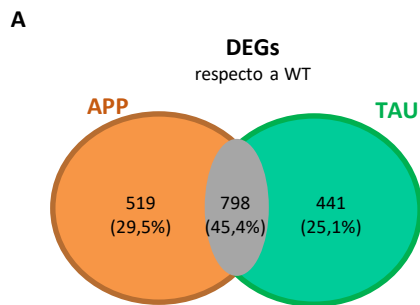
Otra ruta enriquecida en la microglía activa del modelo APP respecto a TAU es la regulación de proliferación de fibroblastos, resultado que podría reflejar una mayor proliferación general, incluida la microglial, en respuesta a la patología Abeta. Esto concuerda con el aumento de expresión de *Igf-1* en la microglía activa de APP respecto a TAU (Figura D.19 B). En esta línea, la firma genética asociada a proliferación (Friedman et al., 2018) está enriquecida en la microglía del modelo APP respecto a TAU, aunque no de forma estadísticamente significativa (Figura D.19 E). Para comprobar si existe una mayor proliferación de las células microgliales en el modelo APP, hemos realizado un ensayo específico de

proliferación microglial con el agente intercalante del ADN EdU (ver Materiales y Métodos, Apartado 19), analizando la microglía proliferativa (Cd45+EdU+) en los modelos WT, APP y TAU. Como control positivo de la técnica usamos el modelo de depleción microglial CX3CSF1R, en el que se produce una clara proliferación microglial con el fin de repoblar el parénquima depletado de microglía. Nuestros resultados indican que la proliferación microglial en los modelos APP y TAU es ligeramente superior a la del WT, aunque no existen diferencias significativas entre los 3 grupos (Figura D.19 F).

En definitiva, concluimos que la microglía activa de los modelos APP y TAU presenta un perfil genético propio de procesos neurodegenerativos, con función inflamatoria y fagocítica, y un metabolismo oxidativo. Además, existen diferencias entre la microglía activa asociada a Abeta y a Tau, aunque se requiere una caracterización más exhaustiva para entender la diferente respuesta microglial en ambos modelos.

---

**Figura D.19. Diferente perfil génico en la microglía activa en respuesta a las patologías Abeta y Tau.** NES: factor de enriquecimiento normalizado; FDR q-value: p-valor ajustado, más restrictivo; FC=fold-change. Comparativa de la microglía activa en animales APP (12 meses) y TAU (9 meses). El rango de colores del *heatmap* muestra el rango de valores de expresión génica, donde el rojo se corresponde con la expresión máxima y el azul con la expresión mínima. **(A)** Diagrama de Venn representando los genes diferencialmente expresados (DEGs) en APP y TAU versus WT (12 meses) con un  $[\log FC] > 0,5$  y  $p\text{-valor} < 0,05$ . **(B)** Comparativa de los genes que aumentan su expresión en APP versus TAU y viceversa. Adj.p.value: p-valor ajustado. **(C)** Procesos biológicos (*GO Biological Process Ontogeny*) enriquecidos en APP versus TAU y viceversa. NOM p-val: p-valor normalizado **(D)** Representación gráfica de enriquecimiento (valores NES y FDR q-valor) y *heatmap* de los genes incluidos en la firma hipóxica (elaborada por el laboratorio del Dr. Alberto Pascual) comparando la microglía activa de los ratones APP versus TAU. **(E)** Representación gráfica de enriquecimiento (valores NES y FDR q-valor) y *heatmap* de los genes incluidos en la firma asociada a proliferación (Friedman et al., 2018). **(F)** Proliferación microglial en animales WT, APP, TAU y CX3CSF1R (control positivo, 5 días de repoblación tras un tratamiento agudo de depleción), analizado mediante citometría de flujo con el kit EdU (n=2-3). La significancia estadística ha sido analizada mediante el test ANOVA, seguido del test Tukey.



**B**

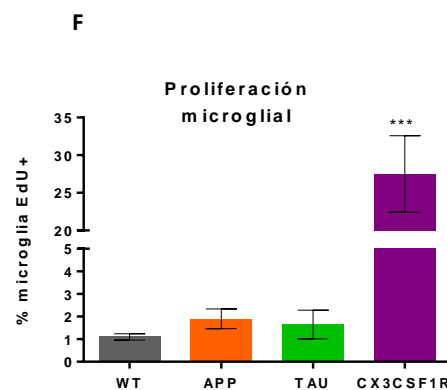
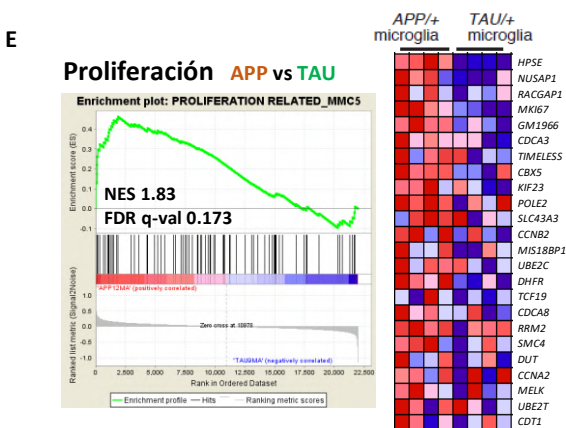
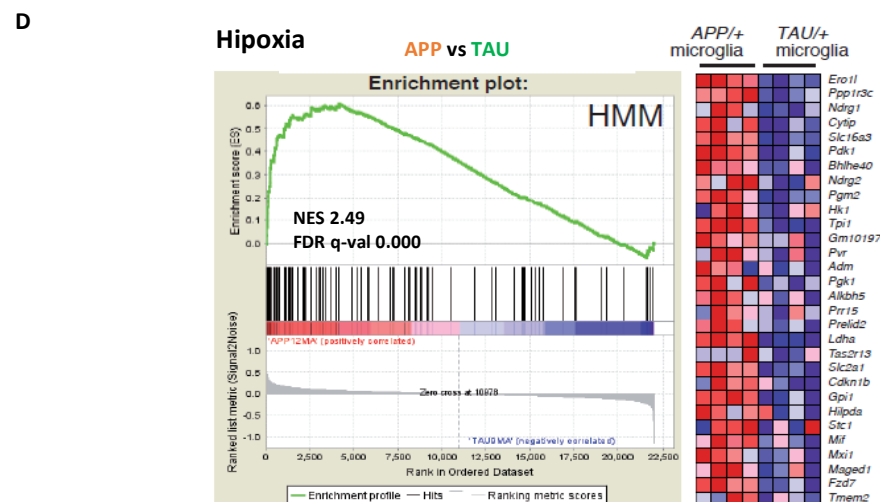
APP vs TAU			TAU vs APP		
Gen	FC	adj.P.Val	Gen	FC	adj.P.Val
Igf1	18.06	0.0006	Klrb1a	4.98	0.0021
Egln3	12.61	4.16E-05	Siglecf	5.26	0.0016
Gpnmb	11.98	0.0299	Klk8	5.35	0.0007
Mamdc2	9.84	4.16E-05	H2-Aa	6.03	0.0021
Etl4	9.26	5.70E-05	Postn	7.89	0.0006
Adarb1	7.42	0.0016	Cd74	8.12	2.48E-05
Gm1673	6.83	0.05	Cfb	9.07	0.0076
Lgi2	6.29	0.0016	H2-Ab1	9.1	2.48E-05
Fabp3	6.17	0.0026	Olr1	19.48	0.0076
Gcnt2	6.13	0.0064	H2-Eb1	21.09	2.48E-05

**C**

APP vs TAU		
Proceso biológico enriquecido	NES	FDR q-val
HMM	2.48	0
Proceso biosintético de alcoholes	2.34	0
Proceso biosintético de esteroides	2.25	0.0011
Regulación positiva de la proliferación de fibroblastos	2.10	0.0169

TAU vs APP			
Proceso biológico enriquecido	NES	NOM p-val	FDR q-val
Regulación de la respuesta inflamatoria a estímulos antigénicos	1.94	0.004	0.4955
Regulación de macrófagos derivados de la diferenciación de células espumosas	1.90	0.004	0.4023
Vías de señalización mediadas por quimiocinas	1.87	0	0.3711
Activación del complemento	1.87	0.002	0.2955

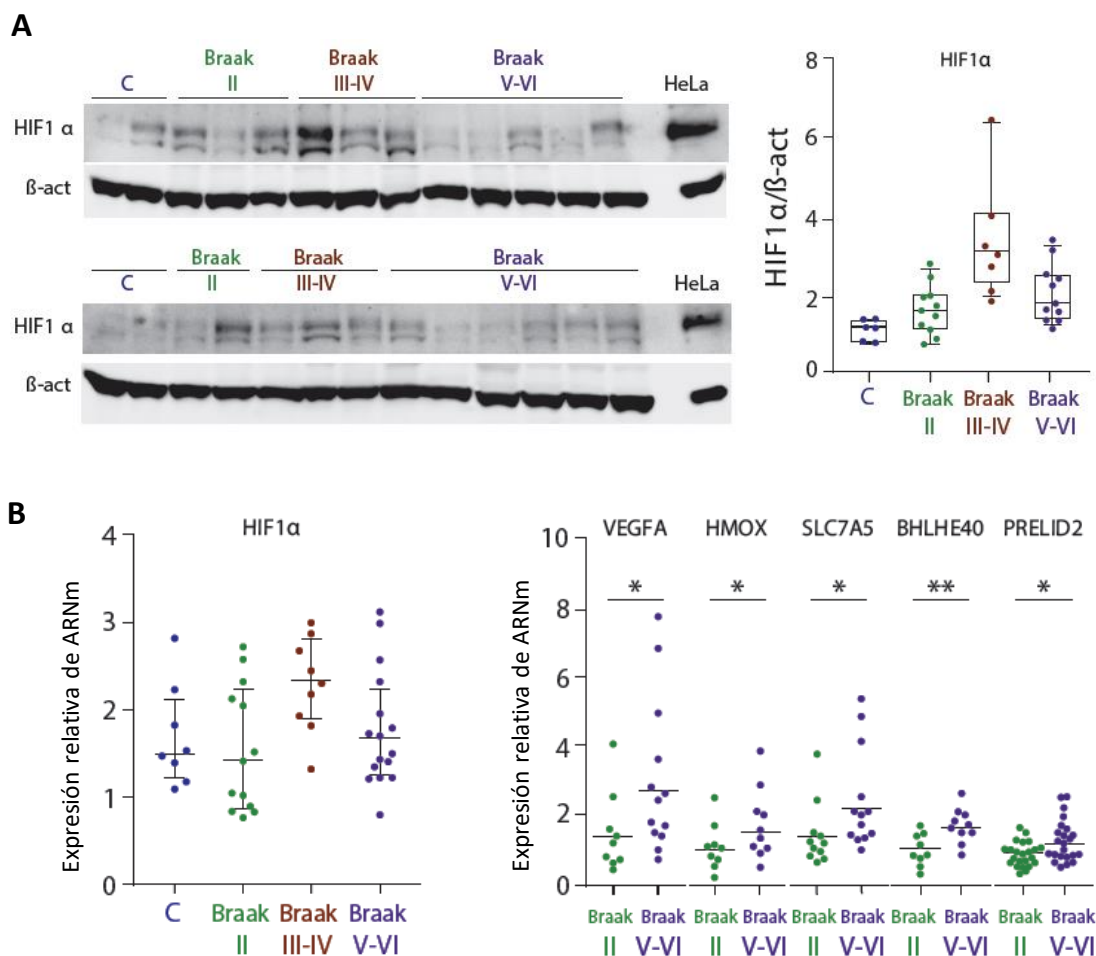


### 3. DISFUNCIONALIDAD MICROGLIAL POR DISMINUCIÓN DE LA DISPONIBILIDAD DE OXÍGENO

Los resultados expuestos en el Apartado anterior demuestran que la alteración o pérdida de Trem2 impide la activación microglial frente a Abeta y sugieren que deficiencias en Trem2 pueden incapacitar a la microglía para responder a la patología presente en los cerebros de pacientes de EA. De hecho, existen numerosas mutaciones en genes relacionados con la función microglial, como Trem2 o CD33, asociadas a un mayor riesgo de padecer EA (Colonna y Wang, 2016; Griuc et al., 2013). Nuestros resultados también demuestran que la microglía activa presenta un metabolismo oxidativo, y que en los modelos murinos APP, la patología Abeta genera una clara respuesta hipóxica en la microglía. Aunque la formación de placas *per se* no disminuye la disponibilidad de oxígeno hasta niveles que impidan la activación microglial, es posible que los problemas vasculares, muy frecuentes en el cerebro de pacientes de Alzheimer, disminuyan la disponibilidad de oxígeno en el parénquima cerebral hasta niveles que dificulten la activación microglial y medien su disfunción.

#### 3.1. En el hipocampo de pacientes con EA, incrementa la expresión de marcadores de respuesta a hipoxia

Para estudiar la posible relación de la hipoxia con la disfunción microglial en enfermos de Alzheimer, hemos evaluado la expresión de genes incluidos en la firma hipóxica (establecida por el grupo del Dr. Alberto Pascual) en individuos control y en pacientes en diferentes estadios Braak de la EA. Como se observa en la Figura D.20 A y B, la expresión de Hif1 $\alpha$ , principal gen implicado en la respuesta a hipoxia, tiende a aumentar en el hipocampo de enfermos de Alzheimer. De hecho, los análisis de western-blot reflejan un aumento de esta proteína en el hipocampo de individuos Braak III-IV, que posteriormente desciende en pacientes con estadio Braak V-VI. Sin embargo, en el hipocampo de los individuos Braak V-VI, aumenta significativamente la expresión de genes regulados por Hif1 $\alpha$ , como Vegfa, Hmox, Slc7a5, Bhlhe40 y Preld2 al comparar con los niveles en estadio Braak II (Figura D.20 B). Parece pues que el aumento de Hif1 $\alpha$  en estadios III-IV produce un aumento de la expresión de sus genes diana conforme avanza la patología.

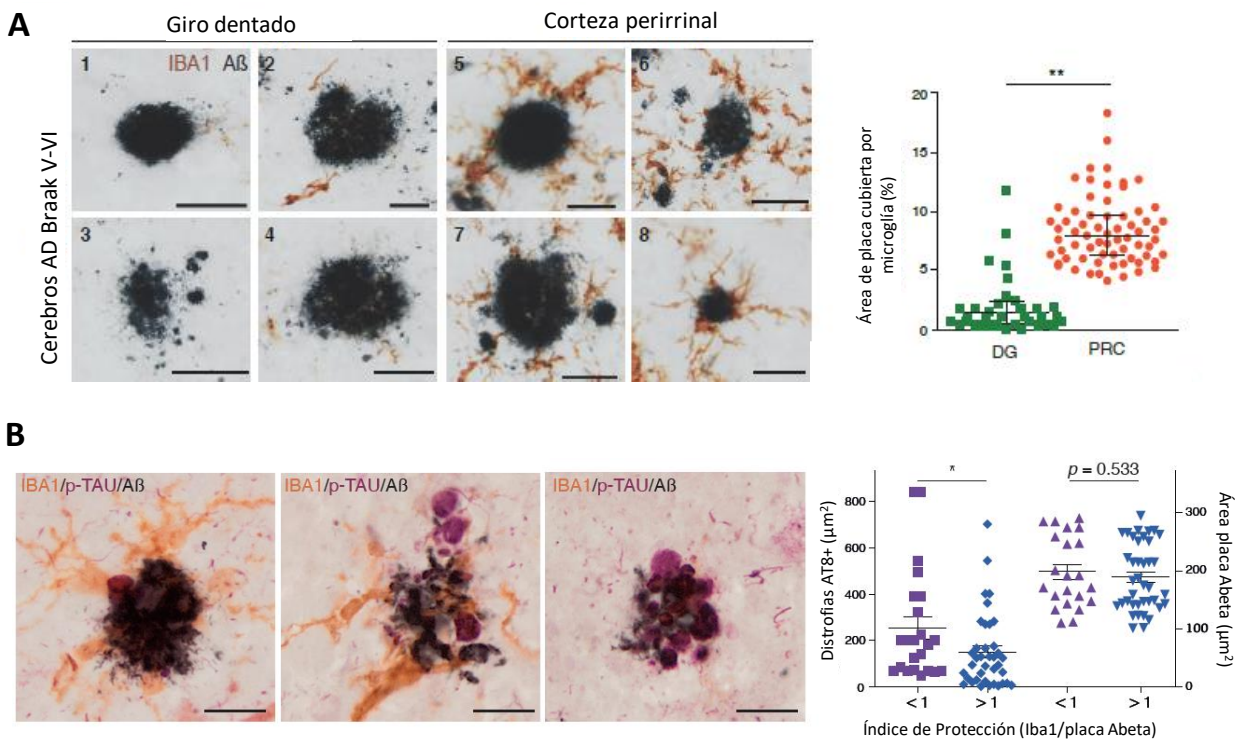


**Figura D.20. En el hipocampo de pacientes con EA aumenta la expresión de marcadores de respuesta a hipoxia. A)** Western-blots representativos y cuantificaciones de los niveles proteicos de HIF1 $\alpha$  en muestras de hipocampo humano. Como control positivo, se incluye un extracto proteico de células HeLa expuestas a hipoxia (1% O<sub>2</sub> durante 4 horas). n=35 muestras, F=15.78; \*p=0.0013 Kruskal-Wallis' test. **(B)** Niveles de expresión, mediante qPCR, de HIF1 $\alpha$ , VEGFA, HMOX, SLC7A5, BHLHE40 y PRELID2 en extractos de hipocampo humano. Mann-Whitney U test; VEGFA: n=9 Braak II y 13 Braak V-VI, F=32, p=0.032; HMOX: n=9 Braak II y 10 Braak V-VI, F=28, p=0.028; SLC7A5: n=11 Braak II y 13 Braak V-VI, F=45, p=0.044; BHLHE40: n=12 Braak II y 12 Braak V-VI, F=20, p=0.0018 y PRELID2: n=23 Braak II y 23 Braak V-VI, F=173, p=0.0446.

Por otro lado, hemos analizado la respuesta microglial en zonas con diferente disponibilidad de oxígeno de un mismo individuo, con el fin de evitar la elevada variabilidad interindividual asociada al uso de muestras humanas. Para ello, en colaboración con el grupo de la Dra. Antonia Gutiérrez, analizamos mediante inmunohistoquímica la microglía asociada a placas en el giro dentado, región hipóxica, y en la corteza perirrinal, que usamos como región control no hipóxica. Como se ilustra en la Figura D.21 A, en la capa molecular del giro dentado de los pacientes Braak V-VI, la población microglial asociada a placa es muy limitada, y la que está presente tiene morfología distrófica. En cambio, en la corteza perirrinal de los mismos individuos, la microglía asociada a placas es abundante y presenta características típicas de activación. Por tanto, podemos concluir que la hipoperfusión local induce la disfunción de la microglía asociada a placa, generando placas de Abeta prácticamente desnudas.



Además, para evaluar la relación de la respuesta microglial con la patología neurítica, examinamos si las placas desnudas de microglía están enriquecidas en neuritas distróficas. Para ello, en colaboración con el grupo de la Dra. Antonia Gutiérrez, cuantificamos, mediante inmunohistoquímica triple para fosfo-TAU (AT8), microglía (Iba1) y placas de Abeta (4G8), la presencia de neuritas distróficas en las placas. Determinamos el índice de protección para cada placa de Abeta, dividiendo el área cubierta por microglía (células Iba1+) por el área de cada placa. Como se muestra en la Figura D.21 B, las placas con un índice de protección  $< 1$ , es decir, las placas con una menor presencia de microglía, tienen un aumento significativo de neuritas distróficas (AT8+), en comparación con las placas rodeadas de más células microgliales (índice de protección  $> 1$ ). Como control, comprobamos que ambos grupos de placas (con índice de protección  $> 1$  ó  $< 1$ ), presentan la misma distribución de tamaño de placa (Figura D. 20 B). En definitiva, nuestros resultados muestran que en las placas desnudas de microglía del cerebro de pacientes de Alzheimer se produce un aumento local de la patología neurítica.

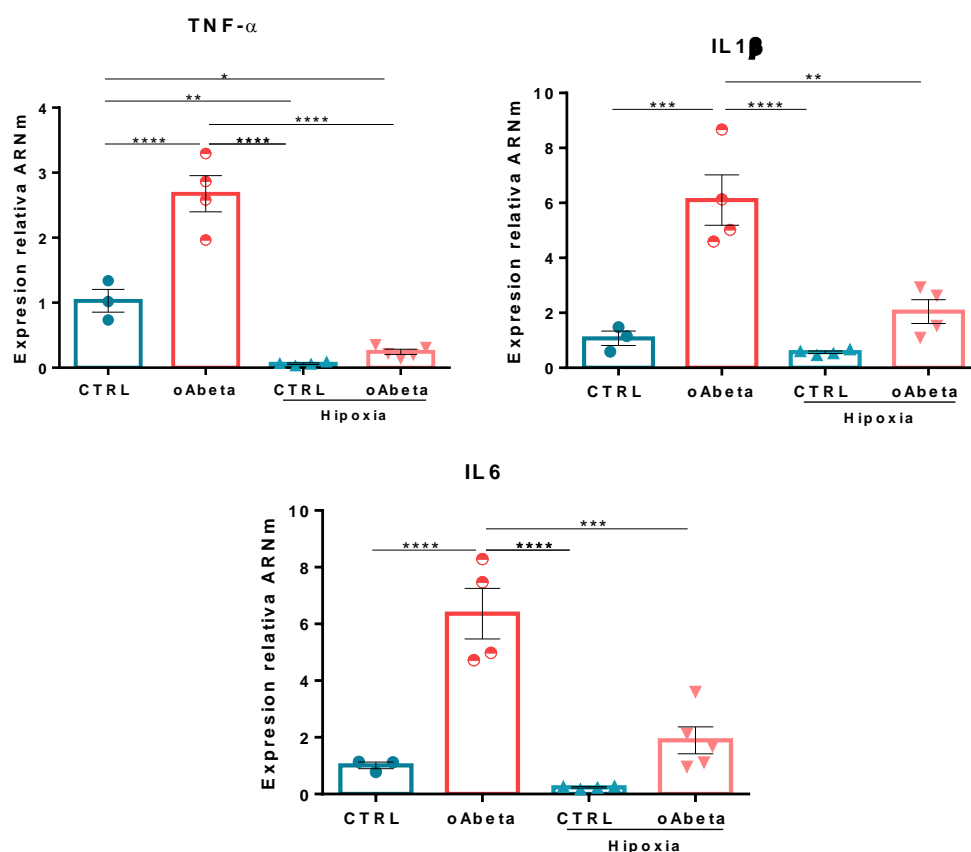


**Figura D.21. Las regiones con baja disponibilidad de oxígeno en el cerebro de paciente con EA presentan placas amiloides desnudas de microglía, con un incremento de las neuritas distróficas.** Resultados en colaboración con la Dra. Gutiérrez. **(A)** A la izquierda, inmunohistoquímica de células microgliales (Iba1, marrón) y placas de Abeta (4G8, azul oscuro) en el giro dentado (un área susceptible de hipoxia, 1-4) y en la corteza perirrinal (un área control, 5-8) de pacientes con EA (Braak V-VI). Barras de escala: 1-4: 50 μm, 5 y 6: 20 μm, y 7 y 8: 50 μm. A la derecha, cuantificación del porcentaje de placa cubierta por células microgliales Iba1+ (DG=giro dentado, n=36 placas; PRC=corteza perirrinal, n=69 placas; de 3 individuos diferentes; Mann-Whitney U's test  $**p < 0.01$ ). **(B)** A la izquierda, inmunohistoquímica triple de células microgliales (Iba1, marrón), placas de Abeta (4G8, azul oscuro) y neuritas distróficas fosfo-Tau+ (AT8, magenta) en el giro dentado de pacientes Braak V-VI. Barra de escala: 20 μm. A la derecha, cuantificación de las distrofias axonales AT8+ (eje izq) y del área de las placas de Abeta (eje dcho) en placas con un índice de protección (ratio células Iba1+/placa de Abeta) menor (morado) o mayor (azul) a 1. n=61 placas de Abeta (22 con índice de protección  $< 1$  y 39  $> 1$ ); Mann-Whitney U's test  $*p < 0.05$ .



### 3.2. La baja disponibilidad de oxígeno impide la activación microglial *in vitro*

Con los resultados anteriormente expuestos, postulamos que la activación, proliferación y/o migración de la microglía a las placas de Abeta depende de su metabolismo oxidativo y, por tanto, la hipoxia compromete este metabolismo y, consecuentemente, la respuesta microglial. Con el objetivo de comprobar que el metabolismo oxidativo es esencial para la activación microglial, tratamos cultivos de microglía primaria con oligómeros de Abeta (10  $\mu$ M) durante 24 horas en normoxia (21% O<sub>2</sub>) e hipoxia (1% O<sub>2</sub>). Como se muestra en la Figura D.22, y al igual que hemos descrito para tratamientos agudos (3 horas) (Figura D. 18 A), el tratamiento con Abeta oligomérico induce la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6). Sin embargo, en condiciones de hipoxia, el mismo tratamiento reduce significativamente la expresión de estas citoquinas en concordancia con una escasa o casi nula activación microglial. Por consiguiente, concluimos que el metabolismo oxidativo es esencial para la activación microglial *in vitro*.

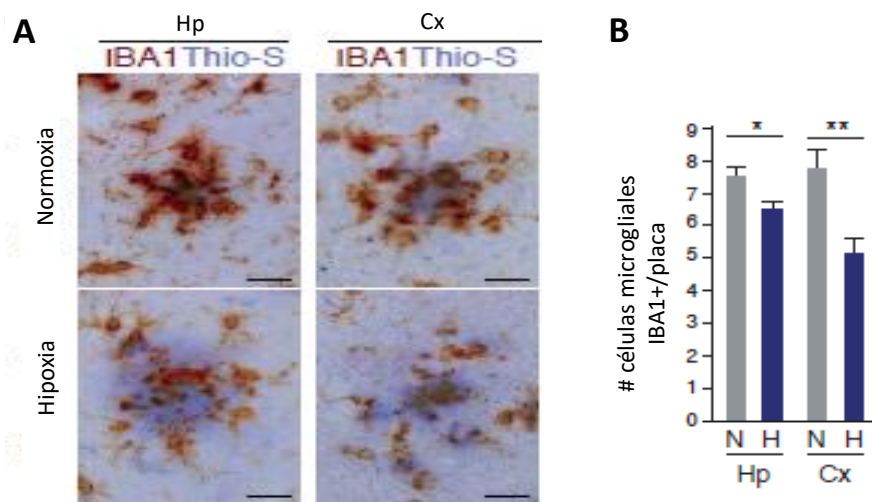


**Figura D.22. La respuesta inflamatoria microglial a oligómeros de Abeta se ve comprometida en hipoxia.** Expresión de citoquinas pro-inflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6), medidas mediante qPCR y normalizadas por Gapdh, en cultivos de microglía primaria control y tras tratamientos con Abeta oligomérico (oAbeta, 10  $\mu$ M) durante 24 horas, en normoxia (21% O<sub>2</sub>) e hipoxia (1% O<sub>2</sub>). La significancia estadística se ha analizado mediante test ANOVA, seguido del post-test Tukey \* $p$ <0,05, \*\* $p$ <0,01, \*\*\* $p$ <0,001.

### 3.3. La baja disponibilidad de oxígeno disminuye la microglía asociada a placa *in vivo*

Como se ha descrito anteriormente, en el modelo APP, la microglía activa presenta un metabolismo oxidativo, a la vez que aumenta la expresión de genes de respuesta a hipoxia, como HIF1 $\alpha$ . La coexistencia de estas dos vías opuestas podría inducir estrés metabólico y desencadenar daño o muerte microglial. Sin embargo, y al contrario de lo que ocurre en el hipocampo de enfermos de Alzheimer, en los modelos animales de patología amiloide no observamos degeneración microglial. Para explicar este hecho podemos pensar que, (i) o se produce proliferación de células microgliales lejanas a las placas que sustituyen a la microglía degenerada, o bien, (ii) en estos modelos amiloideos la disponibilidad de oxígeno no es tan baja como la que se produce en el cerebro de pacientes con EA y alteraciones vasculares, y la microglía no degenera.

Para intentar reproducir la disfuncionalidad de la microglía asociada a placa en ambientes hipóxicos observada en el hipocampo de enfermos de Alzheimer, realizamos un estudio en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Alberto Pascual, en el que sometimos a ratones transgénicos de 14 meses con patología Abeta (APP/PS1) a condiciones de hipoxia (9% O<sub>2</sub>) o normoxia (21% O<sub>2</sub>) crónica (21 días). Como se muestra en la Figura D.23, el número de células de microglía Iba1+ asociada a placa disminuye significativamente tanto en hipocampo como en corteza de los ratones APP/PS1 tras 21 días de hipoxia. Además, mientras que en condiciones de normoxia la microglía Iba1+ presenta una morfología típica de activación, en condiciones hipóxicas, la microglía Iba1+ tiene una morfología degenerativa. Por tanto, la disrupción del equilibrio metabólico HIF1/OXPHOS en los modelos amiloideos origina una microglía disfuncional incapaz de compactar los depósitos de Abeta y reproduce los resultados obtenidos en el giro dentado hipocampal de pacientes de EA. En consecuencia, podemos postular que en enfermos de Alzheimer las comorbilidades sistémicas que alteran el sistema vascular podrían producir una disfunción microglial inducida por hipoxia/hipoperfusión.

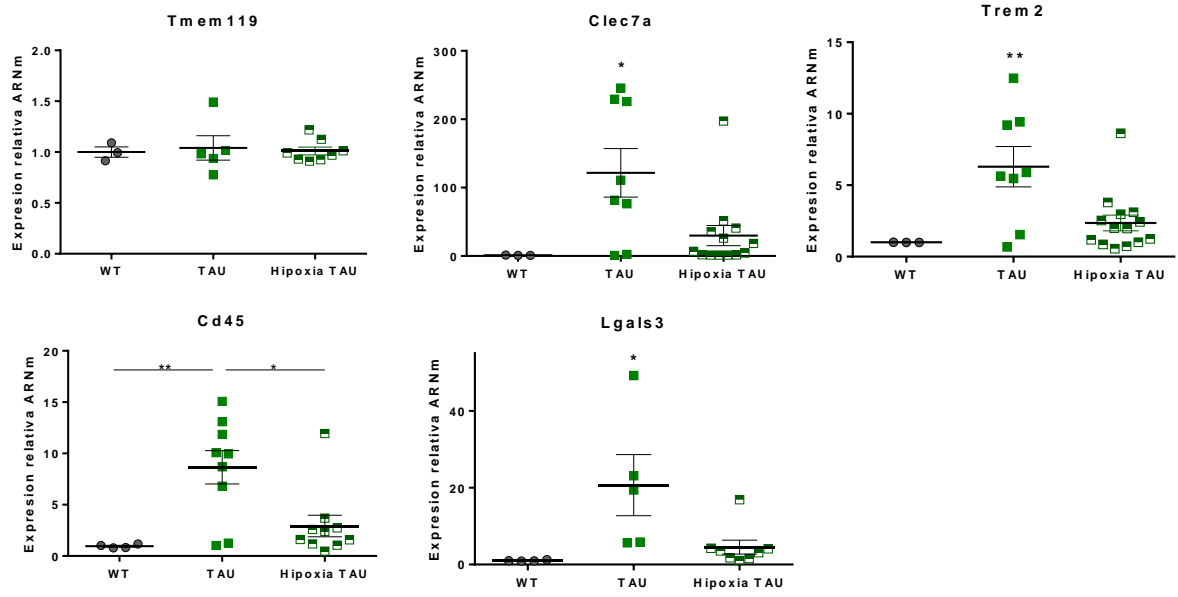


**Figura D.23. La hipoxia crónica disminuye el clustering de microglía asociada a placa.** Los ratones APP/PS1 de 14 meses de edad fueron expuestos a normoxia (21% O<sub>2</sub>) o hipoxia (9% O<sub>2</sub>) durante 21 días. **(A)** Secciones hipocampales (Hp) y corticales (Cx) inmunoteñidas con Iba1+ (células microgliales) y ThioS (placas amiloides). Barras de escala: 20 μm. **(B)** Cuantificación del número de células microgliales por placa (n=4 ratones por grupo). N: normoxia, H: hipoxia. La significancia estadística se ha analizado mediante test de Student. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

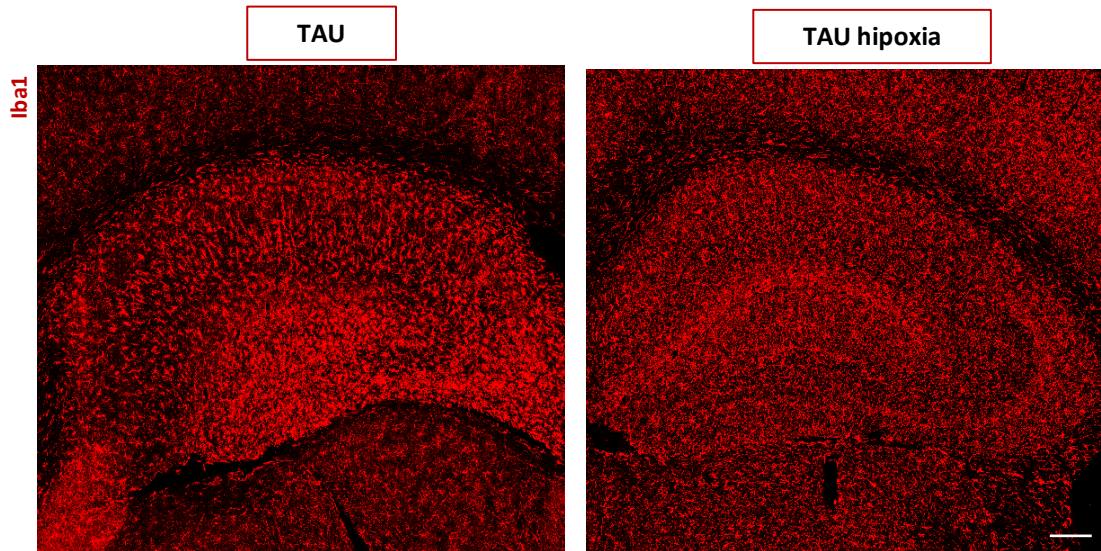
### 3.4. La baja disponibilidad de oxígeno mejora la patología Tau *in vivo*

Tras comprobar que en el modelo APP la hipoxia media la reducción del número de microglía asociada a la placa, nos preguntamos qué efecto tendrá la hipoxia en el modelo TAU. Para responder a esta cuestión sometimos a los ratones TAU P301S (en adelante, TAU) de 9-12 meses a 21 días de hipoxia (9% O<sub>2</sub>) y analizamos la respuesta microglial en comparación con la de los ratones TAU en normoxia. Cabe recordar que, como se refleja en la Figura D.24 A, los ratones TAU muestran una importante activación microglial a los 9-12 meses de edad, que se refleja con un aumento significativo en la expresión de Clec7a, Trem2, Cd45 y Lgals3 con respecto a los animales WT de la misma edad. Sin embargo, cuando estos animales se someten a hipoxia durante 21 días, la activación microglial disminuye drásticamente, como reflejan los valores de los marcadores de activación (Clec7a, Trem2, Cd45 y Lgals3), que pasan a ser ligeramente superiores a los de los animales WT, pero sin significancia estadística. Dado que el marcador microglial homeostático Tmem119 no varía, podemos afirmar que la microglía no se muere como consecuencia de la hipoxia, simplemente se activa menos. Además, hemos corroborado estos resultados mediante estudios de inmunohistoquímica con el anticuerpo Iba1. Como se observa en la Figura D.24 B, en el hipocampo de animales TAU envejecidos, la microglía posee una morfología reactiva con engrosamiento del cuerpo celular y acortamiento de las prolongaciones, mientras que en los ratones TAU de la misma edad sometidos a hipoxia, la microglía tiene un aspecto menos reactivo, con un cuerpo celular menos engrosado y ramificaciones más largas y delgadas. Estos resultados, similares a los reportados para el modelo amiloideo (March-Diaz et al., aceptado en Nature Aging), corroboran nuevamente la importancia del metabolismo oxidativo en el proceso de activación crónica microglial.

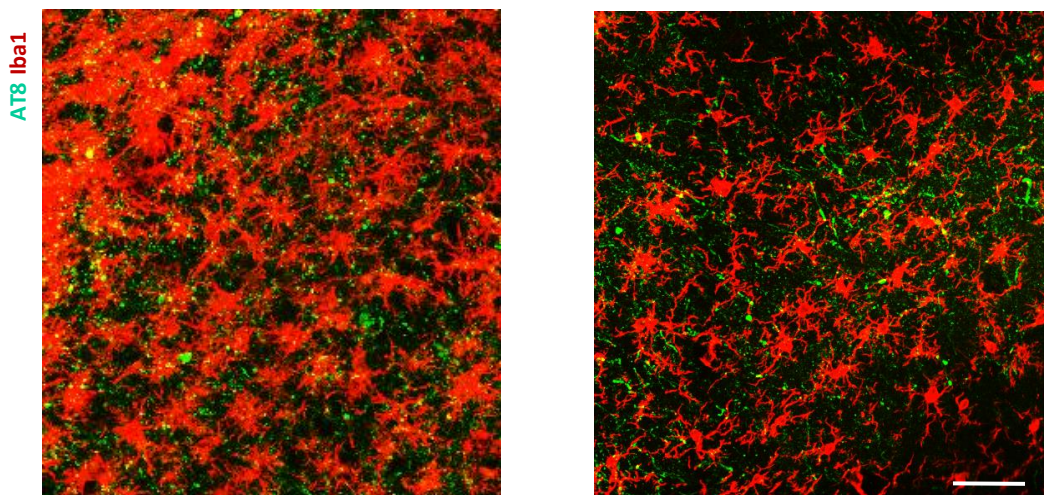
A



B

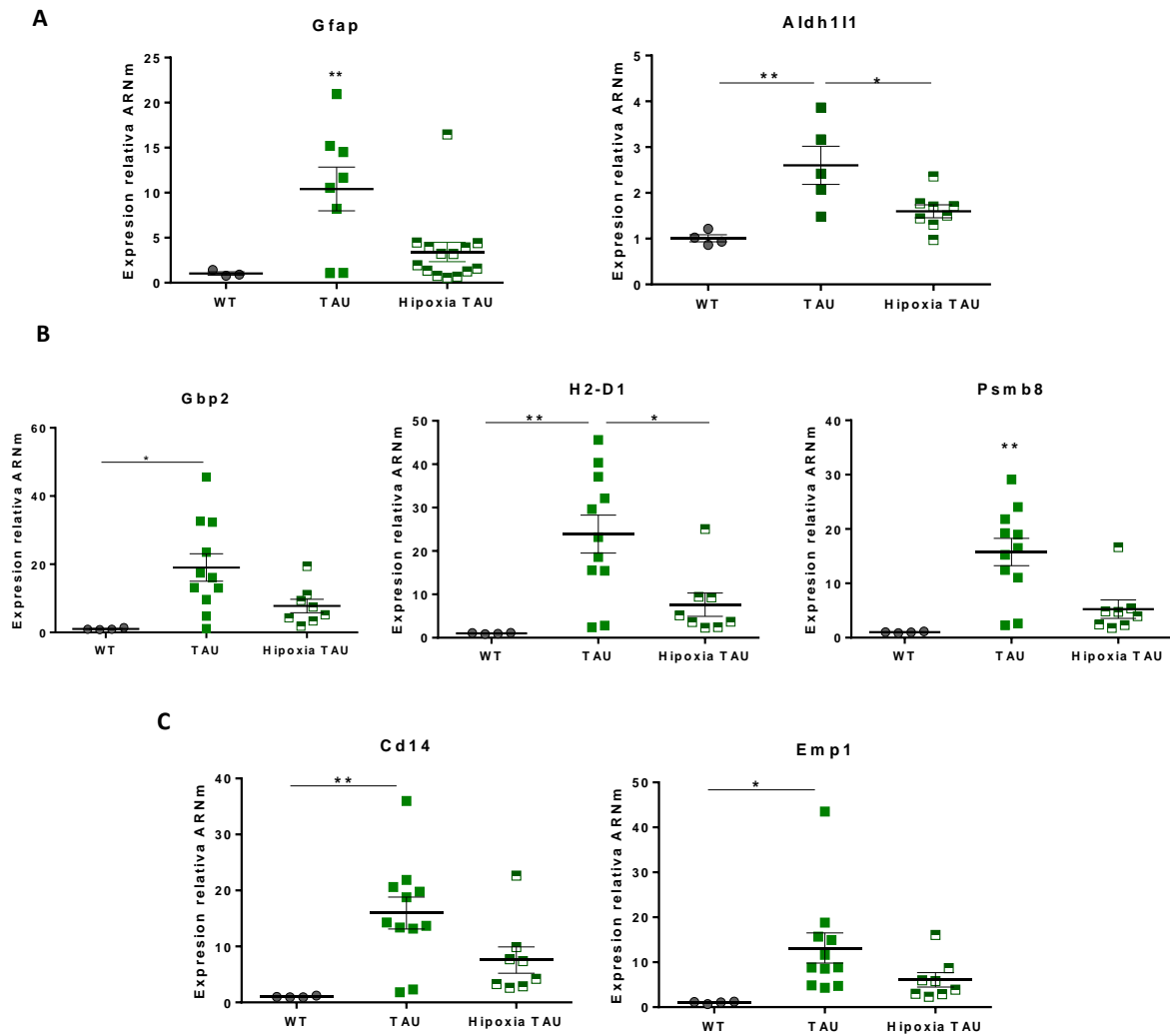


C



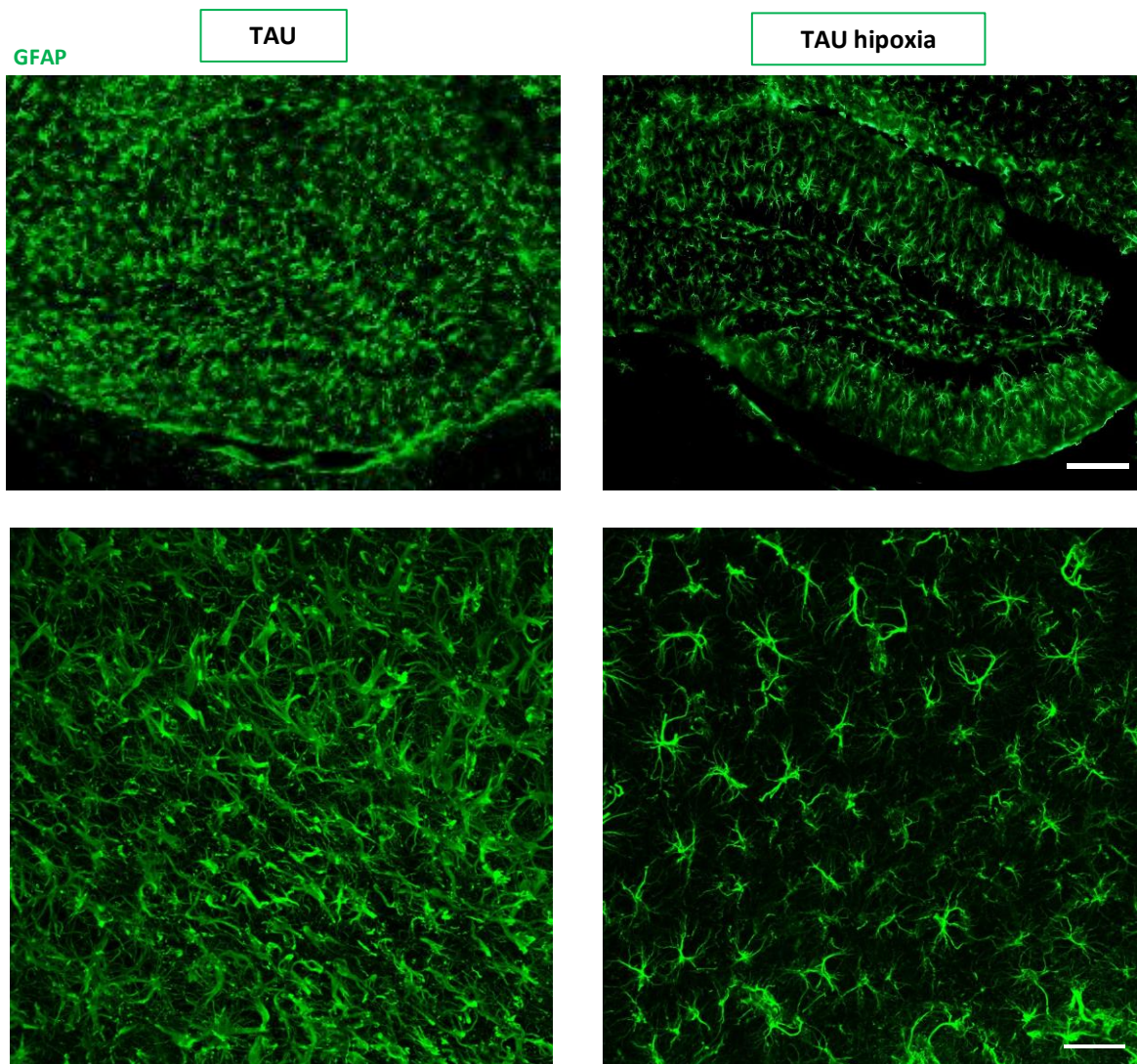
**Figura D.24. La hipoxia disminuye la activación microglial en el modelo TAU P301S. (A)** Expresión de ARNm del marcador homeostático microglial Tmem119 y de marcadores de activación microglial (Clec7a, Trem2, Cd45 y Lgals3), medida por qPCR y normalizada por Gapdh, en ratones WT, TAU y TAU sometidos a hipoxia, de 9-12 meses. La significancia estadística se ha analizado mediante test ANOVA, seguido del post-test Tukey \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Imágenes representativas del marcaje Iba1 (células microgliales) **(B)** e Iba1/AT8 **(C)** en el hipocampo de ratones TAU de 9 meses en normoxia e hipoxia. Barra de escala: (B) 200  $\mu\text{m}$ ; (C) 50  $\mu\text{m}$ .

Dado que existe una clara interacción entre microglía y astrocitos (Vainchtein y Molofsky, 2020), evaluamos la respuesta astrogliar en ratones TAU de 9-12 meses en condiciones de normoxia e hipoxia. Como se observa en la Figura D.25, los ratones TAU de 9-12 meses de edad presentan activación astrocitaria, que se manifiesta por un aumento significativo en la expresión de los marcadores de reactividad astrogliar general (Gfap, Aldh1l1) así como de marcadores de las respuestas A1 (Gbp2, H2-D1, Psmb8) y A2 (Cd14, Emp1) respecto a los valores correspondientes de animales WT de la misma edad. La respuesta A1 se caracteriza por un perfil inflamatorio neurotóxico mientras que el fenotipo A2 está asociado a un incremento en la expresión de factores neurotróficos y de la reparación de sinapsis (ver Introducción, Apartado 6.2). Por tanto, en los ratones TAU con patología establecida, los astrocitos adoptan ambos fenotipos reactivos. Sin embargo, tras la hipoxia, nuestros resultados muestran una disminución significativa en la astrogliosis general (Figura D.25 A), que afecta tanto a la respuesta A1 (Figura D.25 B) como A2 (Figura D.25 C). De hecho, para la mayoría de los marcadores, la respuesta astrogliar en los animales TAU sometidos a hipoxia no es significativamente diferente a la respuesta astrocítica de los ratones WT de la misma edad. Además, hemos corroborado estos resultados mediante inmunohistoquímica, con el marcador de astrocitos Gfap. Como se ilustra en la Figura D.26, se observa una reducción de la reactividad astrocítica en el hipocampo de los animales TAU P301S sometidos a una baja disponibilidad de oxígeno. La menor activación astrogliar en ratones TAU hipóxicos podría deberse a un efecto directo de la hipoxia sobre los astrocitos y/o a la menor activación microglial.



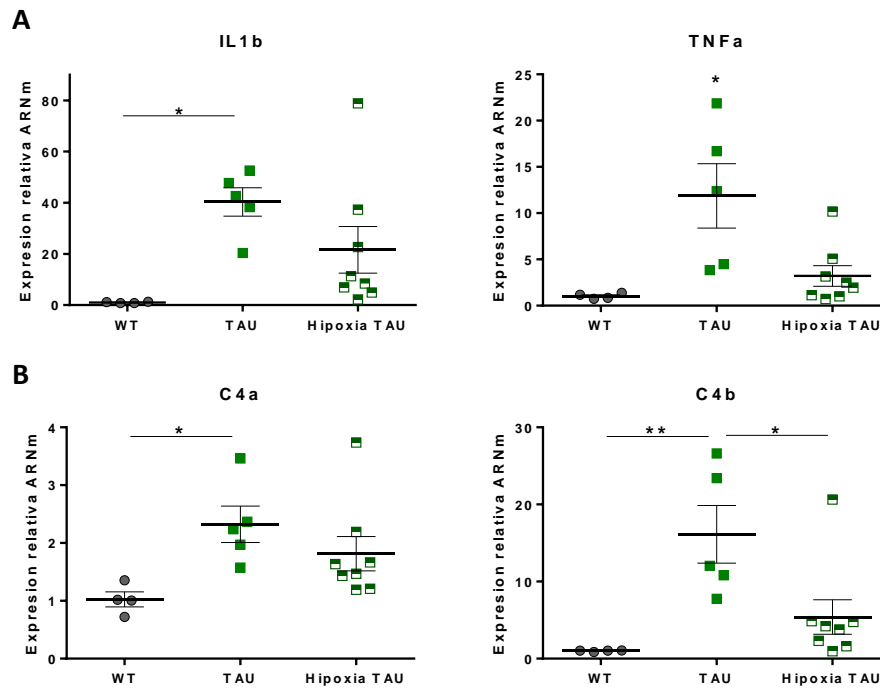
**Figura D.25. La hipoxia disminuye la activación astrogliar en el modelo TAU P301S.** Expresión relativa de ARNm, medida por qPCR y normalizada por Gapdh, en ratones WT, TAU y TAU sometidos a hipoxia, de 9-12 meses, de marcadores de activación general astrogliar (A), de respuesta A1 (B) y respuesta A2 (C). La significancia estadística se ha analizado mediante test de ANOVA, seguido del test Tukey \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .





**Figura D.26. Inmunohistoquímica de la activación astrocítica en animales TAU P301S en normoxia e hipoxia.** Imágenes representativas del marcaje Gfap (células astrogliales) en el hipocampo de ratones TAU P301S de 9 meses en normoxia e hipoxia. Barra de escala: (A) 200  $\mu\text{m}$ ; (B) 50  $\mu\text{m}$ .

Además, para confirmar la disminución general de la neuroinflamación en los animales TAU sometidos a hipoxia, evaluamos la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias IL1 $\beta$  y TNF $\alpha$  así como de los componentes del sistema del complemento C4a y C4b. Como se muestra en la Figura D.27, existe un aumento significativo de la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias y una activación del sistema del complemento en los ratones TAU de 9-12 meses de edad respecto a WT. Sin embargo, bajo una disminución de la disponibilidad de oxígeno, la expresión de IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , C4a y C4b se reduce, aproximándose a valores más similares al WT.

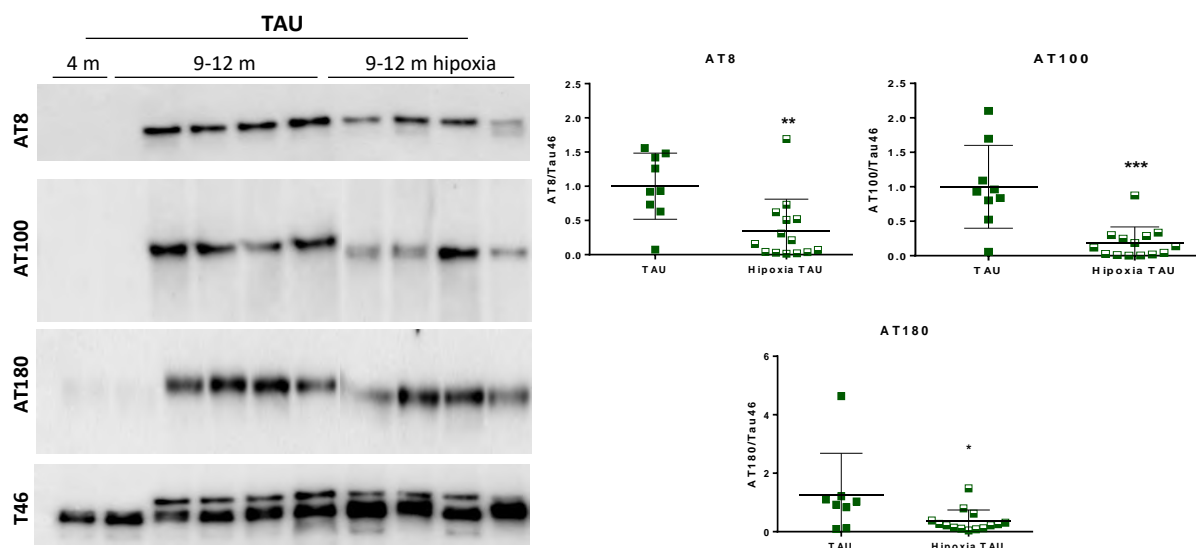


**Figura D.27. La hipoxia disminuye la inflamación y activación del complemento en el modelo TAU P301S.**

Expresión relativa de ARNm, medida por qPCR y normalizada por Gapdh, en ratones WT, TAU y TAU sometidos a hipoxia, de 9-12 meses, de **(A)** citoquinas inflamatorias, y **(B)** de componentes del sistema del complemento. La significancia estadística se ha analizado mediante test de ANOVA, seguido del test Tukey \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

Aunque en el modelo APP la disfunción microglial por baja disponibilidad de oxígeno supone una menor compactación de las placas (este Trabajo) y un empeoramiento de la patología (March-Diaz et al., aceptado en Nature Aging), aún no está descrito el efecto de la disfunción microglial sobre la progresión de la patología Tau. Por consiguiente, evaluamos los niveles de fosfo-Tau en los transgénicos TAU P301S de 9-12 meses en condiciones de normoxia e hipoxia. Como se observa en la Figura D.28 y como se ha descrito previamente en este Trabajo, los ratones TAU de 9-12 meses poseen niveles elevados de Tau fosforilado (epítomos AT8, AT100, AT180). Sin embargo, tras la hipoxia, los niveles de fosfo-Tau para estos mismos marcadores disminuyen significativamente (Figura D.28), lo que indica que en condiciones de hipoxia se revierte la patología neurofibrilar.

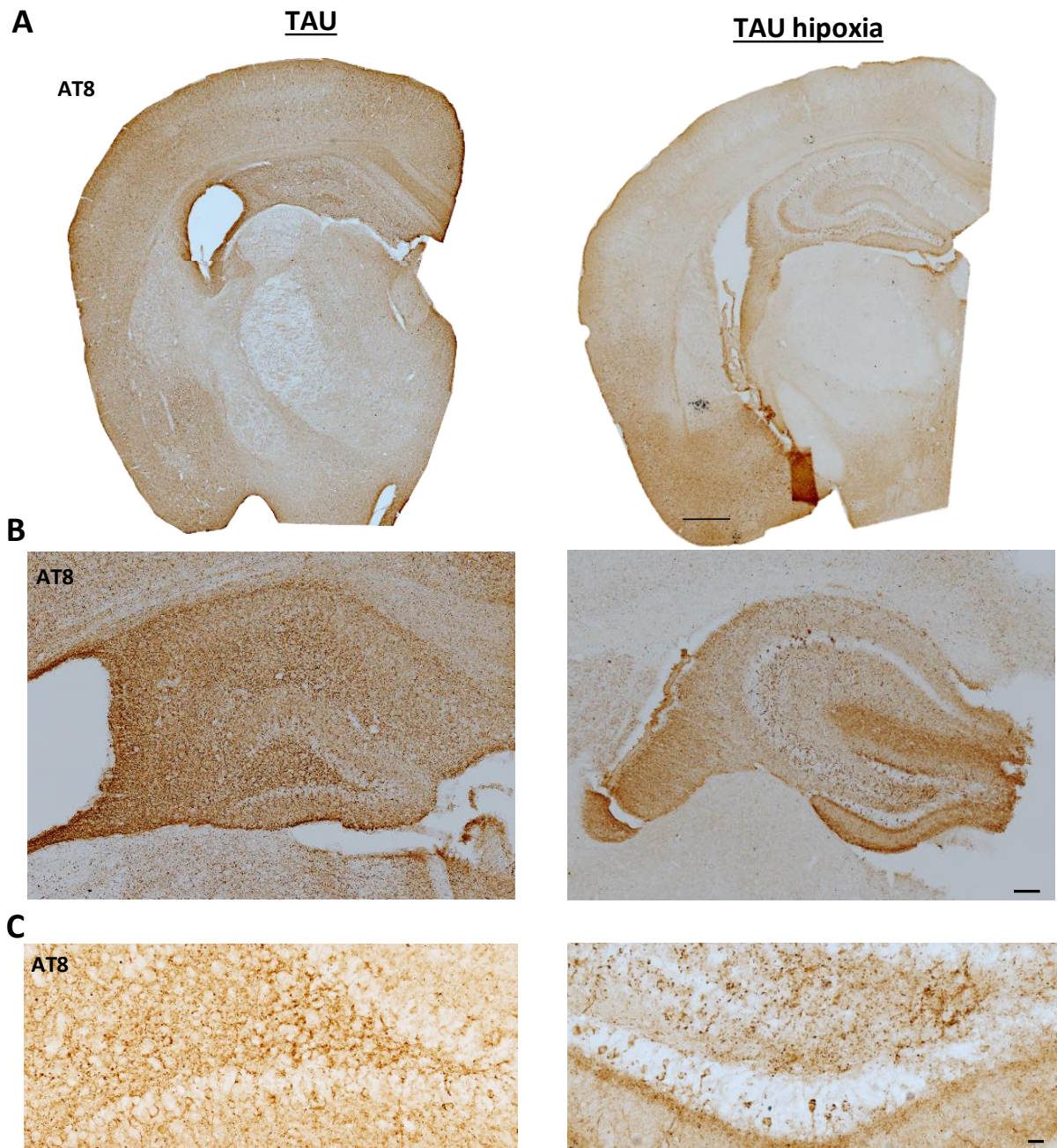




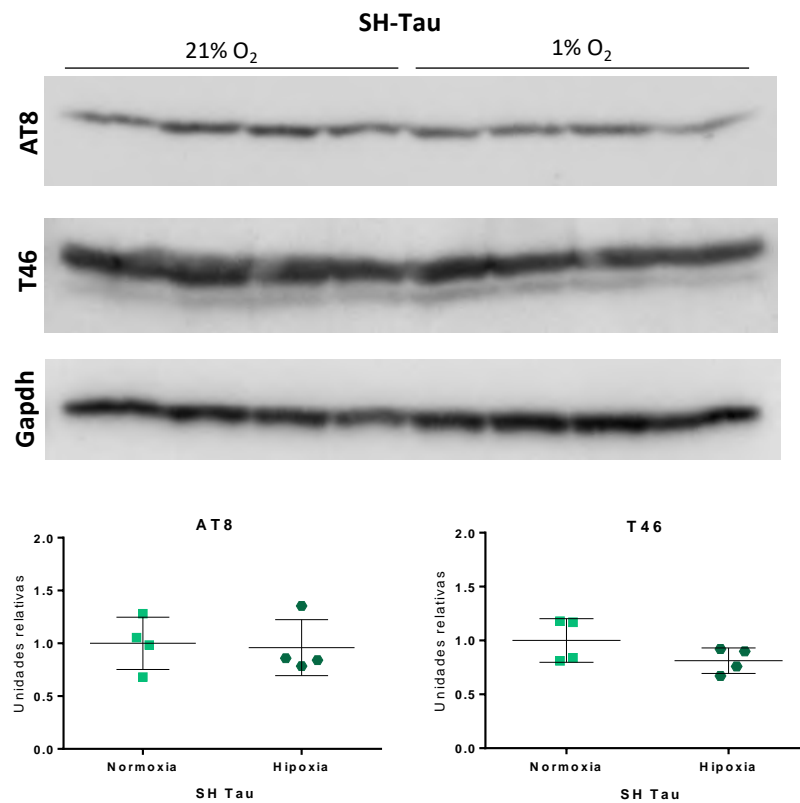
**Figura D.28. La hipoxia disminuye la patología Tau en el modelo TAU P301S.** Western-blots representativos y cuantificaciones de fosfo-Tau (AT8, AT100 y AT180) referido a Tau total (T46) en ratones TAU P301S de 4 meses y de 9-12 meses en normoxia o hipoxia. La significancia estadística se ha analizado mediante t-test de Student. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

Además, las imágenes de inmunohistoquímica con el anticuerpo AT8 (Figura D.29) ilustran la reducción de la fosforilación de Tau, especialmente en hipocampo y corteza entorrinal, regiones donde se acumula preferentemente fosfo-Tau en este modelo. Como se ilustra en la Figura D.29 C, las imágenes a mayor aumento muestran que, mientras que en los ratones TAU en normoxia la tinción de AT8 es homogénea en todo el parénquima hipocampal, en los ratones TAU sometidos a hipoxia, el marcaje de fosfo-Tau está más focalizado en el stratum radiatum de CA2 y CA3 y en determinadas neuronas de la capa polimórfica del giro dentado. Actualmente, estamos completando estos estudios para obtener imágenes más detalladas y concluyentes.

Con el objetivo de evaluar si la hipoxia *per se*, y no una reducción de la neuroinflamación, es la responsable de la disminución de la fosforilación de Tau, hemos sometido a hipoxia (1% O<sub>2</sub>) a cultivos celulares de la línea SH-Tau. Esta línea celular derivada de neuroblastoma humano y sobreexpresa la isoforma 3R de la proteína Tau humana, presentando elevados niveles de fosfo-Tau. Como se ilustra en la Figura D.30, tras 24 horas en condiciones de hipoxia, no observamos cambios en los niveles de fosfo-Tau (anticuerpo AT8) ni en los niveles de Tau total (anticuerpo T46) en la línea celular. Aunque podrían ensayarse nuevas condiciones, estos resultados parecen indicar que la hipoxia *per se* no induce cambios en la tauopatía.

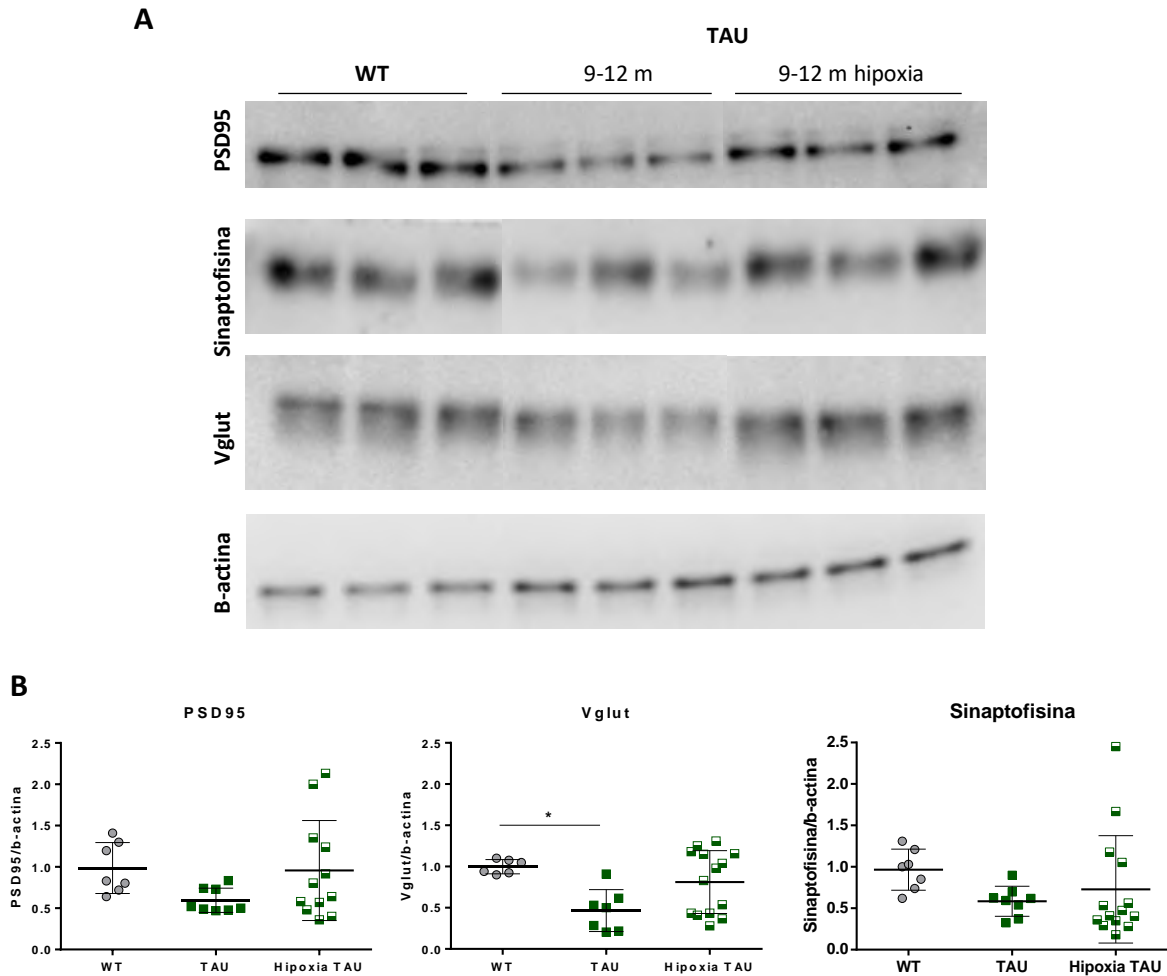


**Figura D.29. La hipoxia disminuye la patología Tau en el modelo TAU P301S.** Marcaje inmuno-histoquímico para AT8 en secciones de ratones TAU de 9-12 meses de edad en normoxia e hipoxia. Barras de escala: (A) 500  $\mu\text{m}$ ; (B) 100  $\mu\text{m}$ . (C) 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura D.30. La hipoxia *per se* no induce cambios en la fosforilación ni en los niveles totales de Tau en la línea neuronal SH-Tau.** Western-blot representativos y cuantificaciones de la expresión proteica de fosfo-Tau (AT8) y Tau total (T46), normalizados por Gapdh, en la línea celular SH-Tau en condiciones de normoxia (21% O<sub>2</sub>) e hipoxia (1% O<sub>2</sub>). La significancia estadística se ha analizado mediante t-test de Student.

Con estos resultados, nos planteamos si este tratamiento de hipoxia, que implica menor activación microglial y mejora la tauopatía, afectaría a la patología sináptica en los ratones TAU P301S. Como se muestra en la Figura D.31, en los ratones TAU de 9-12 meses se produce un leve descenso de la expresión de los marcadores sinápticos PSD95, Vglut y Sinaptofisina respecto a los valores de los ratones WT de la misma edad, lo que refleja una afectación parcial de las sinapsis en dicho modelo. Sin embargo, aunque los cambios no son estadísticamente significativos, en condiciones hipóxicas se produce cierta recuperación de estos marcadores sinápticos.



**Figura D.31. Estudio de la patología sináptica en animales TAU P301S sometidos a hipoxia.** Western-blot representativos **(A)** y cuantificaciones **(B)** de los marcadores sinápticos PSD95, Vglut y Sinaptofisina en ratones WT, y TAU de 9-12 meses en normoxia o hipoxia. La significancia estadística se ha analizado mediante el test ANOVA, seguido del Test Tukey, \* $p < 0,05$ .

En resumen, una menor activación microglial en condiciones de hipoxia, mediada por la alteración de su metabolismo oxidativo, podría tener efectos contrarios frente a las patologías Abeta y Tau. En el modelo amiloide, donde la microglía reactiva está focalizada alrededor de las placas, una disminución de la microgliosis conlleva un menor empaquetamiento de los depósitos de Abeta y un empeoramiento de la patología. En contraste, en el modelo TAU, dado que la reactividad microglial es exacerbada y generalizada por todo el parénquima, la disminución de la activación microglial parece mejorar la tauopatía, al menos disminuyendo la fosforilación de TAU, y probablemente disminuyendo los daños sinápticos.

## 4. DISFUNCIONALIDAD MICROGLIAL POR ABLACIÓN GENÉTICA DE CSF1R

Como hemos comentado anteriormente, en el hipocampo de pacientes con EA la reactividad microglial es muy limitada y se produce un proceso de degeneración microglial (Gutierrez y Vitorica, 2018; Navarro et al., 2018, Sanchez-Mejias et al., 2016). Además, en Apartados anteriores hemos demostrado que la respuesta microglial en los distintos modelos murinos asociados a EA es diferente. Por un lado, en el modelo ThyTAU22, con niveles moderados de Tau fosforilado y/o agregado, no se produce una clara activación microglial y las formas solubles de Tau aisladas de dicho modelo inducen la degeneración microglial *in vitro*. Por otro lado, en situaciones de baja disponibilidad de oxígeno, disminuye la activación microglial en el modelo amiloidogénico APP/PS1 y en el modelo TAU P301S. Aparte, hemos descrito cómo alteraciones de Trem2 impiden la activación microglial *in vitro*. Por tanto, existen numerosos condicionantes que pueden mermar el proceso de activación microglial. De igual forma, en pacientes con EA, las especies fosfo-Tau solubles, la patología vascular y/o las mutaciones/alteraciones de Trem2 parecen contribuir a la disfuncionalidad microglial observada (Karanfilian et al., 2020; Sanchez-Mejias et al., 2016; Sweeney et al., 2019).

Para profundizar sobre los mecanismos moleculares asociados a la patología de Alzheimer en un contexto de disfunción microglial, hemos desarrollado un modelo de depleción genética microglial. Dado que las herramientas para la ablación microglial han sido desarrolladas recientemente, la caracterización de estos modelos de depleción microglial está en estadios iniciales. Nuestro objetivo principal ha sido la generación y caracterización de un modelo doble transgénico CX3CR1/CSF1R, que permite la ablación temporal de CSF1R, esencial para la supervivencia microglial, en un sistema controlado y reversible dependiente de tamoxifeno (ver Materiales y Métodos, Apartado 2.3.1). En este modelo, la enzima Cre se expresa específicamente en células CX3CR1+, que corresponden principalmente a células microgliales. Dado que el gen CSF1R está floxeado, la activación de la enzima Cre por tamoxifeno da lugar a una secuencia génica disfuncional de CSF1R, lo que impide la correcta expresión proteica de CSF1R y conlleva la muerte microglial. En primer lugar, evaluaremos en el modelo las consecuencias de la depleción microglial en cerebros sin patología. Posteriormente cruzaremos los ratones CX3CSF1R con ratones APP y TAU P301S con el fin de evaluar la influencia de la microglía en la progresión de las patologías Abeta y Tau.

### 4.1. Modelos de depleción microglial aguda y capacidad de repoblación

Dado que los ratones CX3CSF1R se obtienen del cruce de ratones transgénicos Cx3Cr1<sup>CreER</sup> y CSF1r<sup>flox/flox</sup>, en primer lugar, comprobamos si el sistema Cre funciona de manera correcta y específica. Para poner a punto el sistema de depleción microglial aguda, hemos testado distintas dosis y tiempos de



tratamiento, consistente en una inyección intraperitoneal diaria de tamoxifeno. Aunque no mostramos los datos de estas pruebas, concluimos que un tratamiento de 7 días con inyecciones diarias de 75 mg de tamoxifeno / kg de peso del animal consigue una depleción microglial óptima. Por tanto, confirmamos el funcionamiento del sistema Cre y la capacidad de depleción microglial en nuestro sistema doble transgénico. Por convenio, hemos considerado el final del tratamiento como el punto “día 0 de repoblación”. Aunque no hemos registrado comportamientos anómalos ni pérdida de peso en los animales tratados, el tamoxifeno inyectado durante 7 días ha producido una mortalidad de un 18.4% de los ratones.

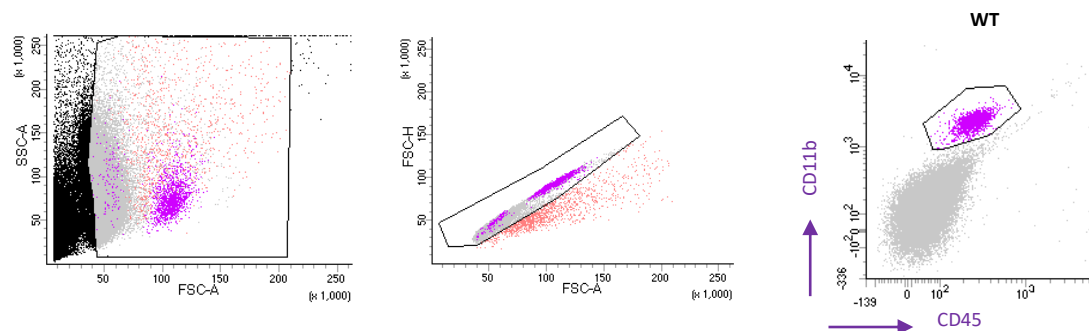
Posteriormente, para valorar si la depleción microglial se mantiene en el tiempo al cesar el tratamiento con tamoxifeno o si existe repoblación y/o proliferación de la microglía, cuantificamos mediante citometría de flujo el porcentaje de células microgliales en el tejido cortical a los 7, 14 o 21 días después de terminar el tratamiento agudo. Por otro lado, usamos el hipocampo de los mismos ratones para evaluar si como consecuencia de la depleción se produce activación glial, midiendo mediante qPCR la expresión de los marcadores de reactividad microglial *Clec7a*, *Lgals3*, *Cd45* y *Trem2*, y de los genes de activación astroglial *Gfap* y *Aldh1l1*. Dado que *Clec7a* se considera un marcador muy específico de activación microglial (Keren-Shaul et al., 2017; Krasemann et al., 2017), las conclusiones de activación microglial se basan principalmente en los resultados observados en dicho marcador. Además, evaluamos la posible infiltración de células inmunes periféricas, para lo que cuantificamos mediante qPCR los marcadores *Cd163*, *Ccr2*, *Ly6c* y *Cd3*. Los resultados expuestos corresponden indistintamente a animales machos y hembras, ya que el análisis por separado no condujo a ninguna asociación con el sexo.

#### **4.1.1. Depleción y repoblación microglial en animales jóvenes**

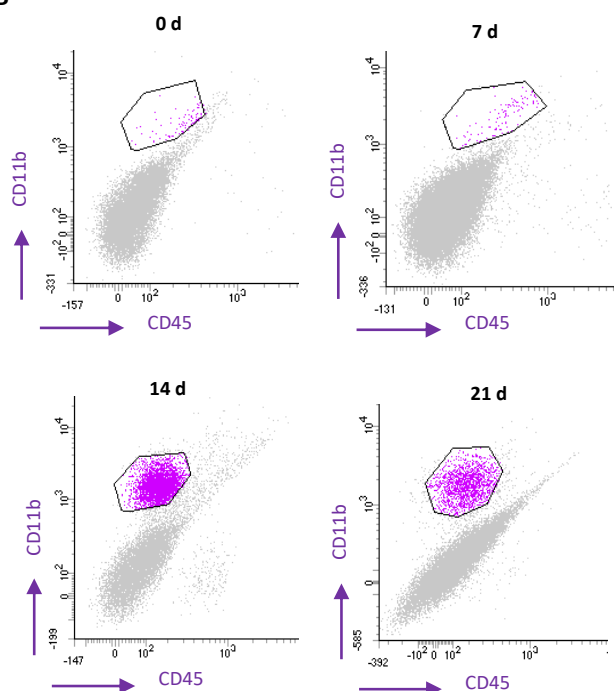
Para la puesta a punto inicial del modelo, utilizamos ratones CX3CSF1R de 2 meses de edad, a los que administramos un tratamiento de 7 días con tamoxifeno inyectado. En primer lugar, analizamos el porcentaje de células microgliales mediante citometría de flujo. Como se muestra en la Figura D.32 A, descartamos en un primer paso los debris y posteriormente las células no individualizadas. A continuación, seleccionamos como microglía las células *CD11b<sup>+</sup>/ CD45<sup>+</sup>*. Como esperábamos, la población microglial remanente al finalizar el tratamiento de depleción aguda (día 0) es muy baja (un  $6.8 \pm 5.4\%$  respecto a la condición WT, en la que no hemos realizado tratamiento) (Figuras D.32 B y C). Por tanto, mediante tratamientos agudos, con nuestro modelo doble transgénico logramos una ablación microglial superior al 90%, que corroboramos mediante tinciones inmunohistoquímicas con el marcador *Iba1+* (Figura D.33). Los niveles de microglía se mantienen igualmente bajos tras 7 días de recuperación, pero aumentan significativamente tras 14 días, alcanzándose valores incluso superiores a los del animal WT, aunque existe alta variabilidad en los resultados individuales (Figura D.32 B). En el último punto analizado, 21 días de recuperación, la población microglial se reestablece a niveles similares a la

condición WT. Por tanto, la depleción microglial es seguida por un pico de repoblación, y posteriormente se reestablece hasta niveles fisiológicos.

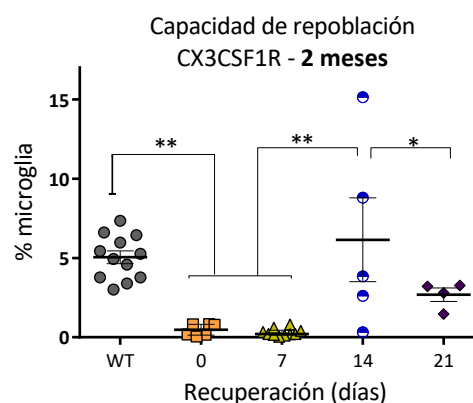
**A**



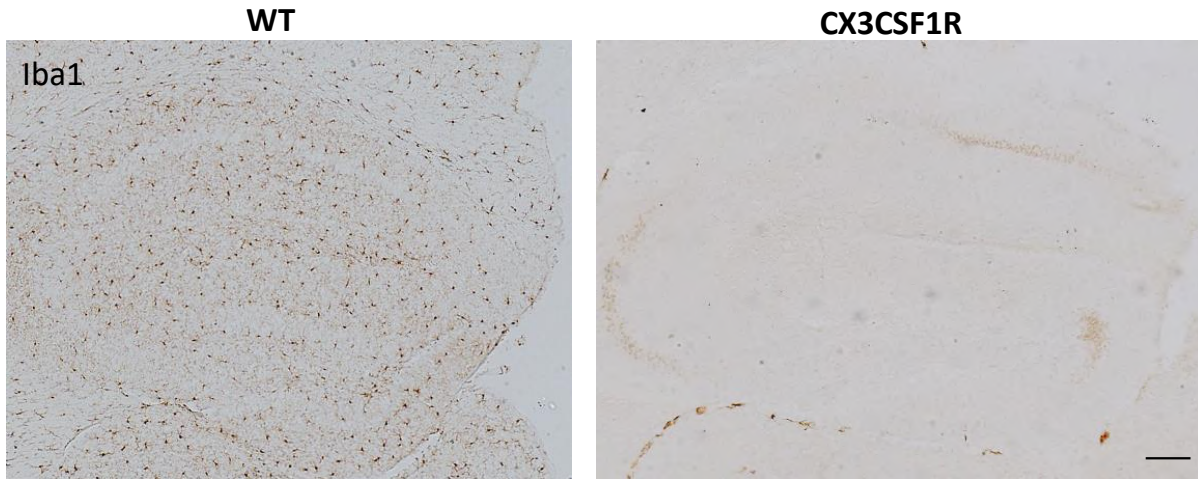
**B**



**C**



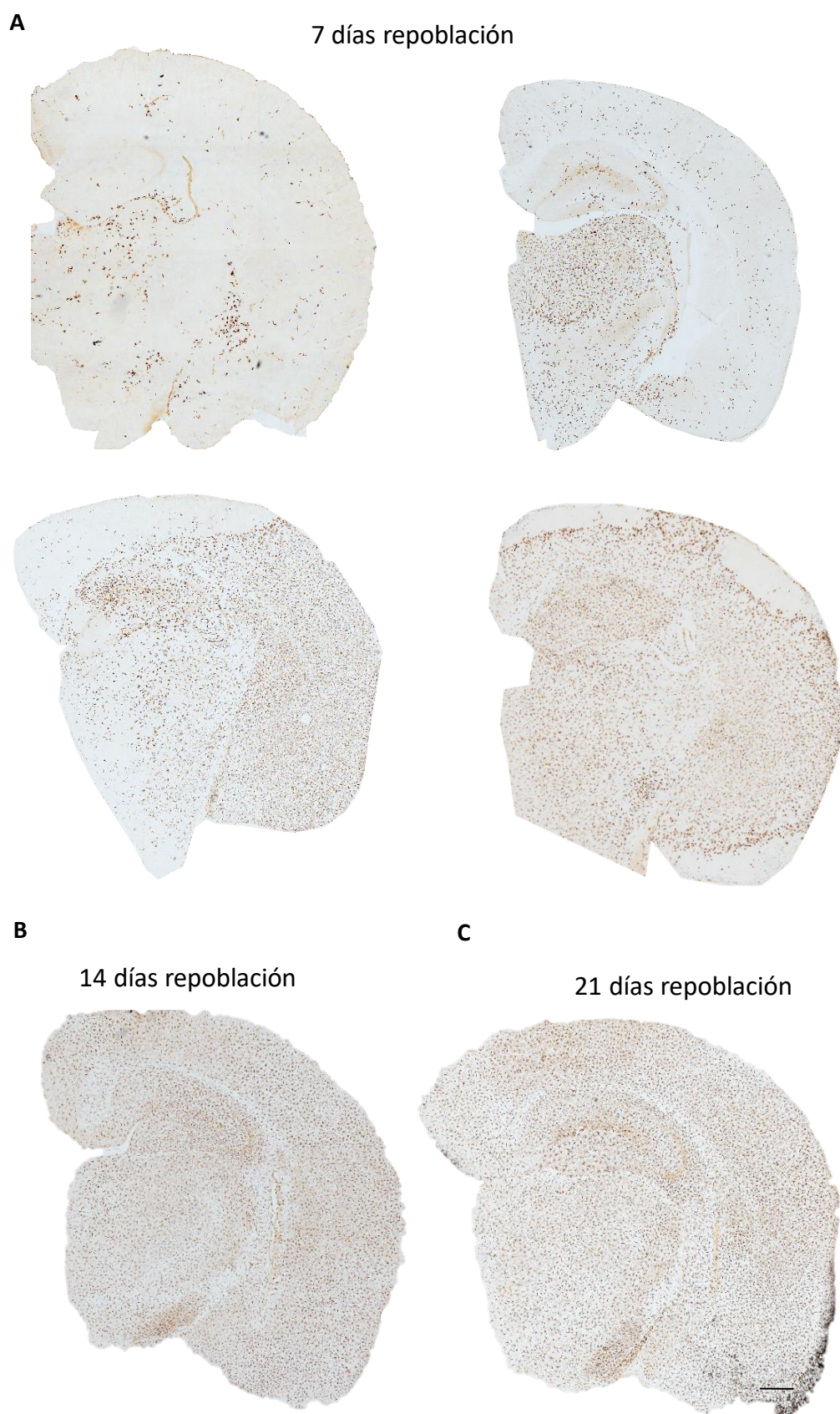
**Figura D.32. La depleción microglial producida tras 7 días de inyecciones con tamoxifeno en ratones CX3CSF1R de 2 meses está seguida de una rápida repoblación. A)** Estrategia de identificación de microglía por citometría de flujo: a1) selección de partículas con volumen (FSC) y complejidad (SSC) adecuadas, descartando los debris; a2) selección de células individuales; a3) selección de microglía en función de los marcadores CD45 y CD11b. **B)** Imágenes representativas de citometría de flujo para la identificación de la población microglial (CD45+CD11b+) en la corteza de ratones CX3CSF1R tras el tratamiento de depleción agudo, seguido de 0, 7, 14 o 21 días de recuperación. **C)** Cuantificación del porcentaje de microglía obtenido mediante citometría de flujo (n=4-12). La significancia estadística se ha analizado mediante el test ANOVA, seguido del test Fisher LSD. \*\*p<0,01.



**Figura D.33. El tratamiento agudo con tamoxifeno en ratones CX3CSF1R de 2 meses produce elevados niveles de depleción microglial.** Inmunohistoquímica representativa del marcador microglial Iba1 en animales de 2 meses WT y CX3CSF1R tras el tratamiento agudo con tamoxifeno y 0 días de repoblación. Barra de escala: 200  $\mu$ m.

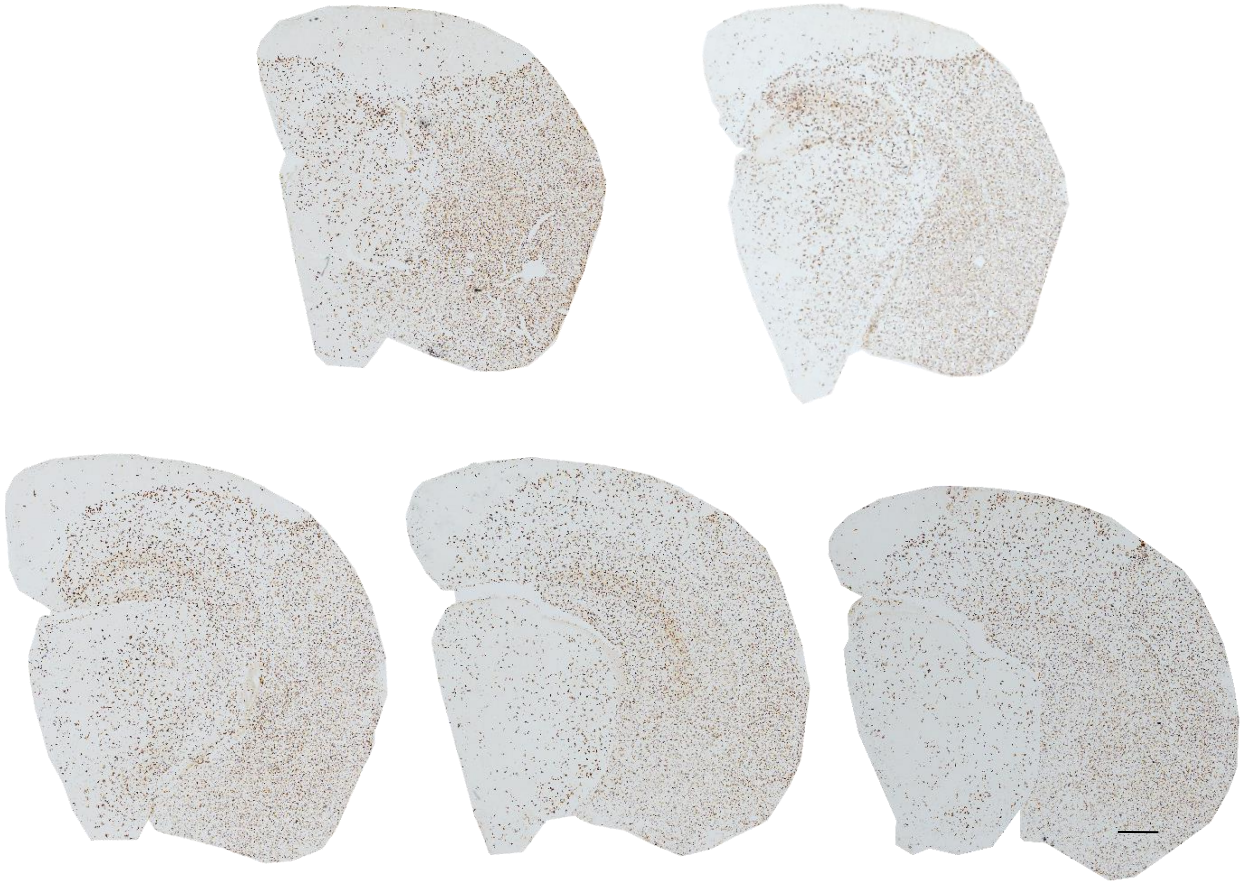
Como se muestra en la Figura D.34, la caracterización inmunohistoquímica con el marcador microglial Iba1 corrobora, aunque no completamente, este patrón temporal de repoblación. A 14 días, la repoblación es muy intensa, y disminuye a los 21 días de recuperación, coincidiendo con los resultados de citometría. A falta de estudios cuantitativos, tanto a los 14 como a los 21 días la repoblación parece ser homogénea en las distintas regiones cerebrales. Sin embargo, a los 7 días post-tratamiento los resultados obtenidos mediante citometría de flujo indican que la repoblación es prácticamente inexistente, mientras que las imágenes de inmunohistoquímica con Iba1 reflejan que existen animales con distinto nivel de repoblación, e incluso una repoblación heterogénea en las distintas regiones cerebrales del mismo animal. En la Figura D.35, podemos observar distinto nivel de repoblación en las regiones corticales en secciones secuenciales rostro-caudales del mismo animal. En general, las regiones corticales con menos repoblación (o más depletadas) suelen aparecer en secciones más rostrales, y disminuyen en zonas corticales más caudales. Los mecanismos subyacentes a esta diferente distribución regional de repoblación deberán ser estudiados en futuros experimentos.





**Figura D.34. Depleción y repoblación microglial en animales CX3CSF1R de 2 meses.** Imágenes ilustrativas de la población microglial (Iba1+) en ratones CX3CSF1R de 2 meses tras un tratamiento de depleción aguda, seguido de 7 (n=4 ratones), 14 o 21 días de recuperación. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

## 7 días repoblación



**Figura D.35. Población microglial (Iba1+) en cortes secuenciales de un mismo animal CX3CSF1R** de 2 meses tras un tratamiento de depleción aguda, seguido de 7 días de repoblación. Barra de escala: 50mm.

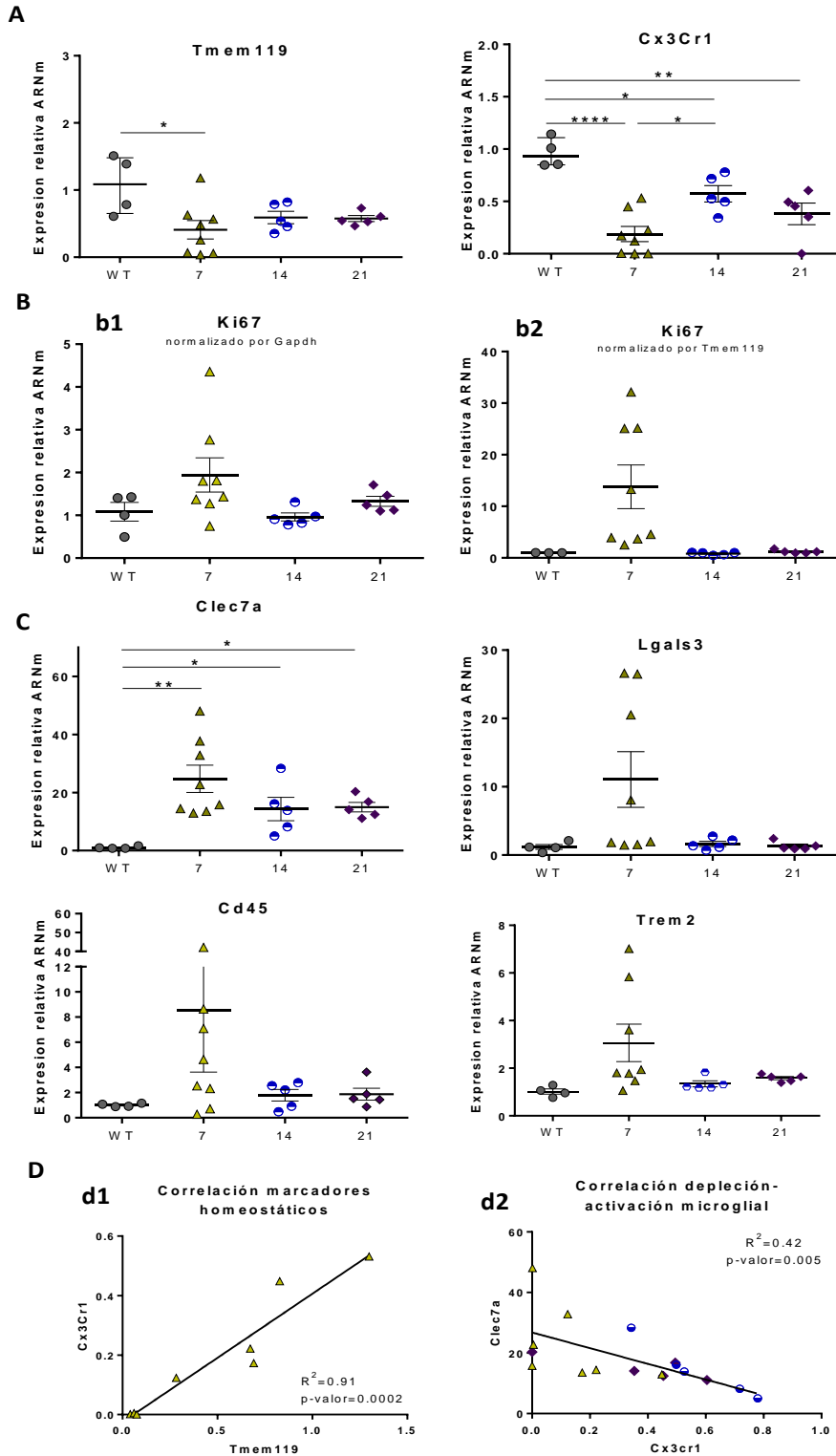
En segundo lugar, evaluamos el fenotipo de las células microgliales remanentes y/o emergentes. Debido a que la microglía no está marcada antes del tratamiento con tamoxifeno, en estos estudios no podemos distinguir la microglía que sobrevive al tratamiento de la que ha proliferado tras el mismo. Sin embargo, la disminución de los marcadores homeostáticos microgliales Tmem119 y Cx3Cr1 a los 7 días de repoblación, y el posterior aumento significativo de Cx3Cr1 a los 14 días de repoblación (Figura D.36 A), sugieren que la población microglial evaluada durante el proceso de repoblación corresponde a células emergentes. Esta proliferación se corrobora por el ligero aumento en el marcador de proliferación Ki67 (Figura D.36 B b1). Dado que el marcador Ki67 no es específico de células microgliales (<https://www.brainrnaseq.org/>), no hemos referido su expresión a ningún marcador microglial, lo que puede subestimar su expresión específica en la población microglial total, disminuida considerablemente a los 7 días de repoblación. De hecho, en el análisis de Ki67 referido a Tmem119 tras 7 días de repoblación, el aumento en su expresión es mayor, aunque sigue sin ser estadísticamente significativo, debido a la gran variabilidad de los datos individuales (Figura D.36 B b2).

Por otro lado, cabe comentar que el porcentaje de células microgliales respecto a WT, obtenido mediante citometría de flujo, tras 7 días de repoblación es relativamente inferior y presenta menor

variabilidad que los resultados de expresión de los marcadores homeostáticos microgliales Tmem119 y Cx3Cr1 medidos por qPCR. Si bien, a pesar de la variabilidad intragrupal en las medidas de Tmem119 y Cx3Cr1, ambos marcadores correlacionan significativamente entre sí (Figura D.36 D d1). Las diferencias obtenidas entre las dos técnicas experimentales podrían deberse a que utilizamos diferentes marcadores para el marcaje de la microglía: CD11b/CD45 para las medidas de citometría de flujo, y Tmem119 y Cx3Cr1 para la cuantificación por qPCR. Sin embargo, las tinciones con Iba1 en los estudios de inmunohistoquímica (Figura D.34) también muestran, aunque de forma cualitativa, unos niveles de microglía variables entre individuos y más similares a las cuantificaciones por qPCR, que a la cuantificación mediante citometría de flujo. Por tanto, es posible que mediante citometría de flujo estemos subestimando los niveles de células microgliales presentes. En cualquier caso, las distintas técnicas muestran un descenso significativo de la población microglial tras 7 días de repoblación en comparación con WT.

Para evaluar el fenotipo de la microglía que repuebla, medimos mediante qPCR la expresión de los marcadores típicos de activación microglial Clec7a, Lgals3, Cd45 y Trem2, y los referimos al marcador homeostático Tmem119 (Figura D.36 C). Referir los marcadores de reactividad respecto a un marcador homeostático nos permite asegurar que si se detectan cambios en la activación no se deban a una variación del número de células microgliales. Nuestros resultados, aunque son muy variables, muestran un aumento de los marcadores de activación tras 7 días de repoblación. Sin embargo, después de 14 y 21 días de recuperación, los niveles de marcadores de activación descienden, aunque en general son ligeramente superiores a los de WT para algunos marcadores, y estadísticamente significativos para la expresión de Clec7a. Por tanto, la microglía que repuebla presenta un fenotipo reactivo. Además, mediante el estudio de correlación entre los marcadores Cx3Cr1 y Clec7a confirmamos que, cuanto mayor es la depleción, mayor es la activación microglial (Figura D.36 D d2).

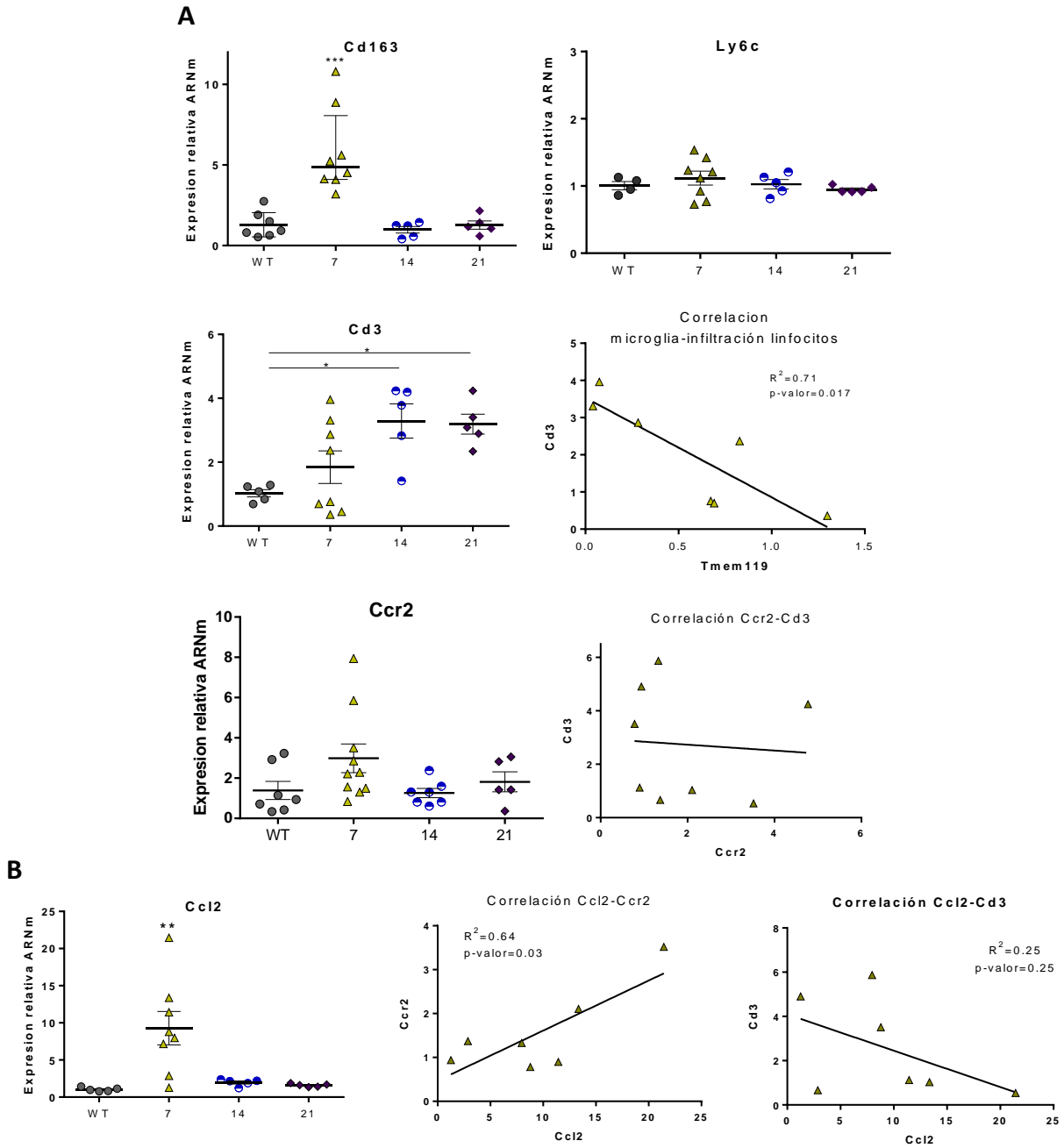




**Figura D.36. El inicio de la repoblación se caracteriza por activación microglial en animales de 2 meses.** Expresión de los marcadores microgliales homeostáticos Tmem119 y Cx3Cr1 (**A**), del marcador de proliferación Ki67 (**B**) y de los marcadores de activación microglial (Clec7a, Lgals3, Cd45, Trem2) (**C**), medidos por qPCR y normalizados por Gapdh (A, b1) o por Tmem119 (b2, C), en ratones WT y CX3CSF1R tras 7, 14 y 21 días de recuperación del tratamiento de depleción aguda. La significancia estadística se ha analizado mediante test ANOVA, seguido del test Fisher LSD. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ . (**D**) Correlaciones entre (**d1**) los marcadores homeostáticos Cx3Cr1 y Tmem119 para los animales CX3CSF1R tras 7 días de repoblación y (**d2**) entre los marcadores Cx3Cr1 (normalizado por Gapdh) y Clec7a (normalizado por Tmem119) para los animales CX3CSF1R tras 7, 14 y 21 días de repoblación, con un análisis de regresión lineal.

En tercer lugar, medimos la expresión de genes asociados a células inmunes periféricas (Figura D.37). El hecho de que los macrófagos asociados al SNC, las células derivadas de monocitos y la microglía presenten marcadores generales de macrófagos dificulta el estudio diferencial de estas tres poblaciones celulares. Aunque en el tejido *post mortem* de humanos con EA (manuscrito en preparación; Muñoz-Castro, 2021) y en modelos animales (Miyazaki et al., 2020; Rajan et al., 2020), el marcador Cd163 parece estar asociado a infiltración de macrófagos/células derivadas de monocitos, en los modelos murinos APP y TAU P301S usados en nuestro laboratorio no hemos encontrado células Cd163+ infiltradas en el parénquima cerebral (Muñoz-Castro, 2021). De hecho, otros autores postulan que ciertas subpoblaciones microgliales pueden expresar Cd163 (Nguyen et al., 2020; Swanson et al., 2020). Por tanto, el aumento significativo de Cd163 que observamos tras 7 días de repoblación podría asociarse a una infiltración de células inmunes periféricas o a un subgrupo de células microgliales que expresan Cd163. El hecho de que la expresión del marcador monocítico Ly6c no aumente y no correlacione con el marcador Cd163 sugiere que es más probable que el incremento de expresión de Cd163 provenga de células microgliales.

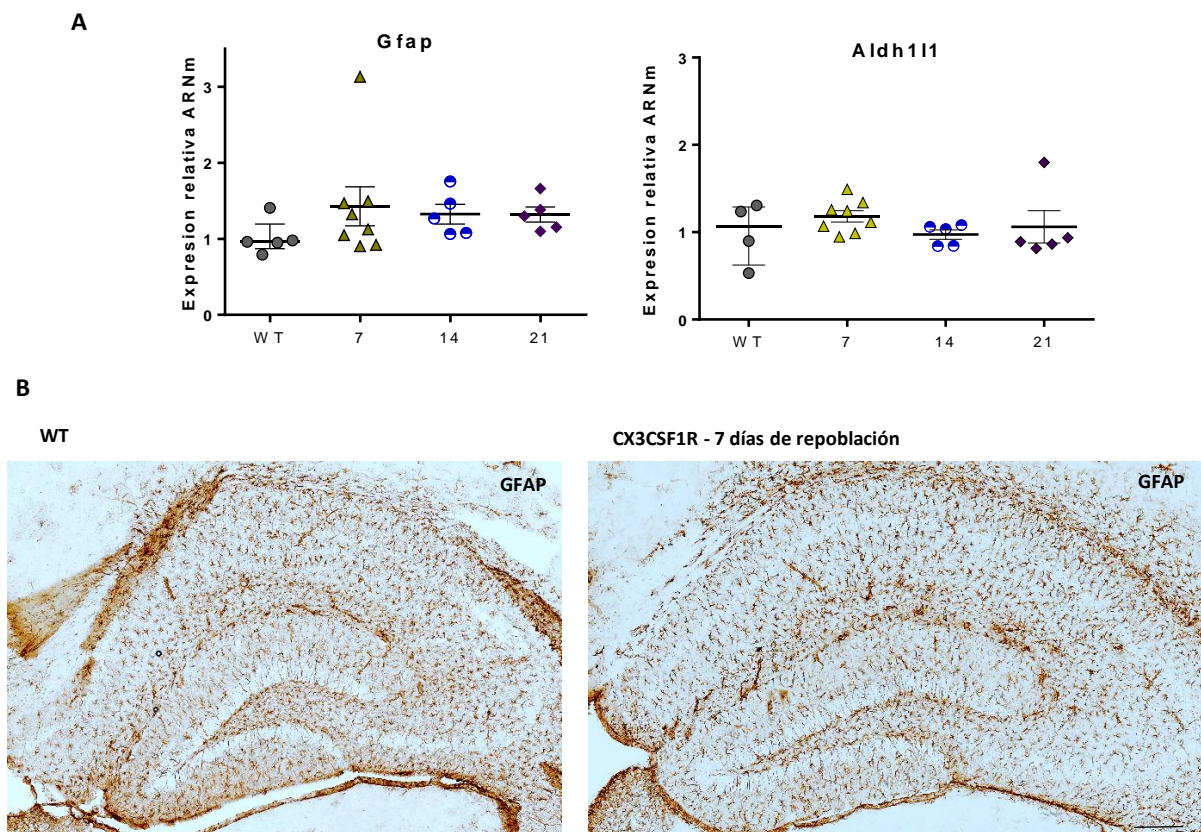
Sin embargo, el aumento significativo de Cd3 refleja una clara infiltración de linfocitos, que se correlaciona con la disminución de microglía. Es decir, a mayor depleción, mayor infiltración de linfocitos. Además, el incremento de Cd3 a los 7 días de repoblación concuerda con el aumento de expresión de Ccr2, que también se expresa en linfocitos, aunque no existe buena correlación entre ambos marcadores. Teniendo en cuenta que Ccr2 se expresa además en monocitos circulantes, el aumento de Ccr2 a los 7 días de recuperación podría reflejar infiltración de células derivadas de monocitos Cd163+/Ccr2+/Ly6c-. En este punto, observamos también un aumento significativo de la expresión de la quimioquina atrayente Ccl2, que correlaciona positivamente con la expresión de Ccr2, pero no con la expresión de Cd3. Esto sugiere que en algunos animales se produce un aumento de Ccl2 que conlleva la atracción de células Ccr2+ Cd3-. En cualquier caso, es necesario ampliar los marcadores medidos y complementarlo con otras técnicas inmunohistoquímicas para confirmar si definitivamente existe infiltración de células inmunes periféricas y caracterizar su fenotipo.



**Figura D.37. Estudio de marcadores de infiltración de células inmunes tras el tratamiento agudo de depleción en animales de 2 meses.** Expresión de marcadores de (A) células mieloides (Cd163, Ly6c, Ccr2, Cd3) y (B) de la quimioquina de atracción Ccl2, medidos mediante qPCR y normalizados por Gapdh, en ratones WT y CX3CSF1R tras 7, 14 y 21 días de repoblación. Se muestran también los análisis de correlaciones entre los distintos marcadores. La significancia estadística se ha analizado mediante test ANOVA, seguido del test Fisher LSD. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

Por otro lado, dado que se ha descrito una clara interacción entre células microgliales y astrogiales, evaluamos si la depleción microglial afecta a los astrocitos. El estudio de los marcadores Gfap y Ald1h1 (Figura D.38 A) muestra que no existe activación astrocítica significativa durante el proceso de repoblación microglial. De hecho, como se muestra en la Figura D.38 B, las imágenes de inmunohistoquímicas para Gfap en el hipocampo de ratones WT y CX3CSF1R a los 7 días de repoblación

no muestran cambios en la morfología, distribución o activación de los astrocitos tras la depleción microglial.



**Figura D.38. Estudio de la reactividad astrocítica tras el tratamiento de depleción aguda en animales de 2 meses. (A)** Expresión relativa de ARNm de marcadores de activación astrocítica (Gfap y Aldh111), medida mediante qPCR y normalizada por Gapdh, en ratones WT y CX3CSF1R de 2 meses tras 7, 14 y 21 días de recuperación tras el tratamiento de depleción aguda. La significancia estadística se ha analizado mediante el test de ANOVA. **(B)** Imágenes representativas de la tinción Gfap en animales WT y CX3CSF1R de 2 meses de edad 7 días después del tratamiento de depleción aguda de microglía. Barra de escala: 200  $\mu$ m.

En resumen, con nuestro modelo CX3CSF1R hemos conseguido una depleción microglial aguda superior a un 90%, que origina, tras el cese del tratamiento, una contundente repoblación y conlleva un aumento de la reactividad microglial y una infiltración de linfocitos, pero no induce astrogliosis.

#### 4.1.2. Depleción y repoblación microglial en animales envejecidos

Con el objetivo de comprobar si la capacidad de repoblación se afecta con la edad, realizamos un estudio de depleción microglial aguda idéntico al realizado en animales CX3CSF1R de 2 meses, en ratones de 12 meses. Cabe destacar que el tratamiento con tamoxifeno produce la misma letalidad en los animales de 12 meses que en el grupo de animales jóvenes.

Nuestros resultados de citometría de flujo reflejan que tanto en la situación control como tras los distintos tiempos post-tratamiento analizados en ratones CX3CSF1R de 12 meses, los valores obtenidos



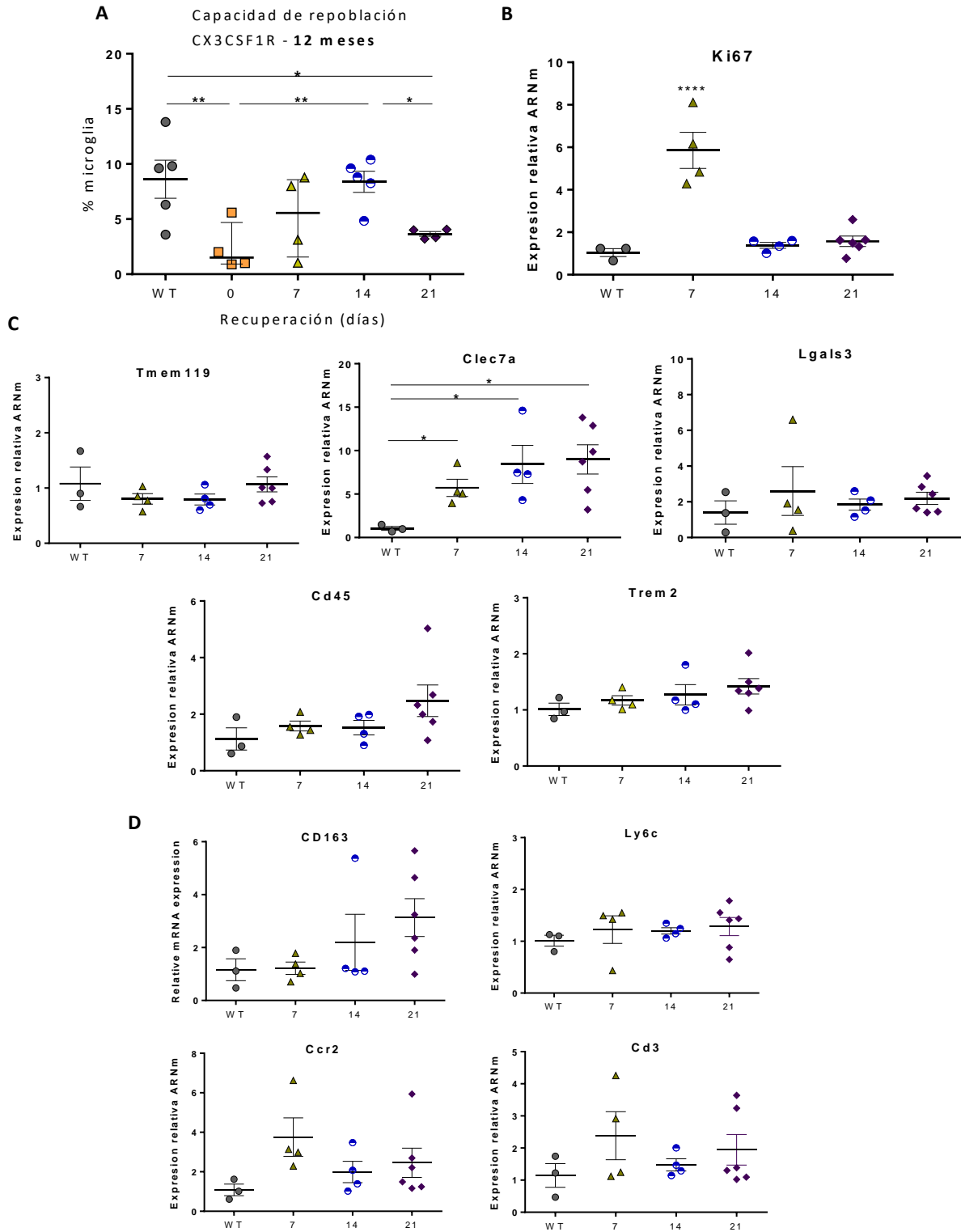
son más dispersos que en los ratones jóvenes (Figura D.39 A). Es posible que el incremento de mielina asociado al envejecimiento afecte al método de aislamiento de células microgliales y contribuya a la variabilidad. Además, observamos que el mismo tratamiento produce una menor depleción microglial que en animales de 2 meses, que podría achacarse a una menor disponibilidad del tamoxifeno en el tejido cerebral. A pesar de que hemos ajustado la dosis de tamoxifeno al peso de los animales, el aumento de la proporción de grasa corporal asociado a la edad podría dificultar la absorción inicial del compuesto. El tamoxifeno es un compuesto esteroideo y lipofílico que podría quedar retenido en el tejido adiposo y tener un acceso más restringido al SNC en animales envejecidos. Tras 7 días post-tratamiento, el porcentaje de células microgliales en animales de 12 meses es cinco veces superior que en animales de 2 meses (Figuras D.32 y D.36). Aunque en principio no podemos afirmar si estos datos reflejan una mayor tasa de repoblación y/o se deben a que partimos de una menor depleción al terminar el tratamiento, el aumento significativo de Ki67+ a los 7 días de repoblación demuestra que existe una significativa proliferación microglial en los animales de 12 meses depletados (Figura D.39 B). A los 14 días de recuperación, observamos un pico de repoblación, que desciende a los 21 días. Por tanto, el patrón de repoblación es similar en los grupos de animales de 2 y 12 meses, lo que indica que la capacidad de repoblación microglial no se modifica con la edad.

Además, observamos que en animales de 12 meses las células microgliales que repueblan el parénquima presentan un fenotipo reactivo ya que aumenta significativamente la expresión de Clec7a y el resto de marcadores tienden a aumentar (Figura D.39 C). Si bien, tras 7 días de repoblación, el incremento de expresión de Clec7a es de  $5,8 \pm 2,0$  veces, mientras que en los ratones de 2 meses era de  $27,8 \pm 13,3$  veces (Figura D.36 C). Este resultado podría reflejar una menor capacidad de activación microglial asociada al envejecimiento, aunque también puede asociarse a la menor depleción microglial en los animales de 12 meses. De hecho, tras 14 y 21 días de repoblación, cuando los niveles de microglía ascienden, el incremento de expresión de Clec7a es similar en los dos grupos ( $7,6 \pm 3,5$  veces tras 14 días y  $8,6 \pm 2,3$  veces tras 21 días de repoblación en los animales de 2 meses; y  $6,5 \pm 3,1$  veces tras 14 días y  $9,1 \pm 4,0$  veces tras 21 días de recuperación, en los animales de 12 meses). Por consiguiente, tras 7 días de repoblación, la microgliosis más pronunciada en el grupo de animales jóvenes se debe probablemente a una depleción superior más que a una disminución de la capacidad de reactividad microglial asociada a la edad.

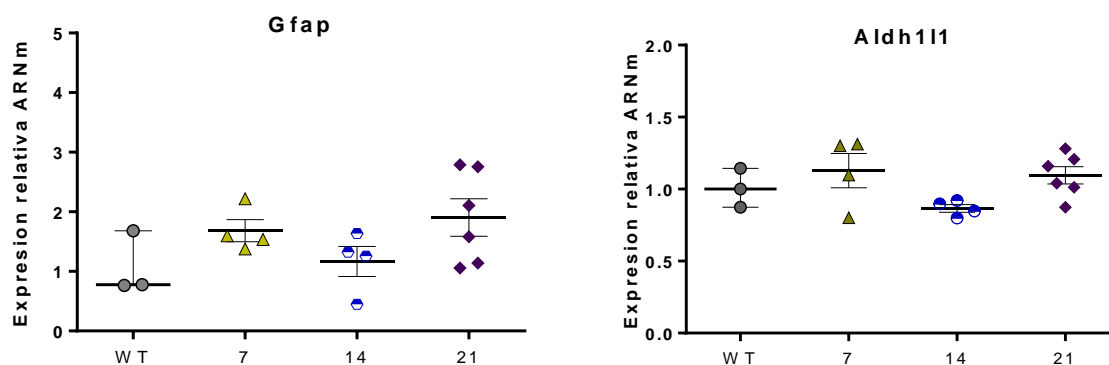
Por otro lado, el análisis de marcadores de células mieloides para evaluar si existe una infiltración de células inmunes periféricas no lleva a conclusiones claras (Figura D.39 D). En ratones envejecidos, y en contraste con lo observado en el grupo de animales de 2 meses (Figura D.37), no existe un incremento de la expresión de Cd163 tras 7 días de repoblación. En este punto, aunque existe un aumento no significativo de la expresión de Ccr2, tampoco existen cambios en el marcador Ly6c, de manera que no hay un indicio claro de infiltración de células derivadas de monocitos. En paralelo, observamos un ligero

aumento, con elevada variabilidad, de la expresión de Cd3, lo que podría ser subsecuente a una limitada infiltración de linfocitos en la primera semana de repoblación. En definitiva, en ratones envejecidos la depleción microglial es menor y existen indicios menos claros de una posible infiltración de células mieloides periféricas. Se necesita una caracterización más amplia, incluyendo estudios inmunohistoquímicos, para sacar conclusiones sólidas.

Al igual que en los animales jóvenes, tampoco observamos cambios significativos en la expresión de los marcadores de astrogliosis Gfap y Aldh1l1 (Figura D.40) en los animales de 12 meses tras el tratamiento agudo con tamoxifeno, corroborando que la depleción microglial tampoco induce una activación astrocítica en animales envejecidos.



**Figura D.39. La depleción aguda microglial es menos eficaz en animales de 12 meses y es seguida por una rápida repoblación.** **A)** Cuantificación del porcentaje de microglía (células CD11b+CD45+), obtenido por citometría de flujo, en la corteza de ratones WT y CX3CSF1R de 12 meses tras el tratamiento de depleción agudo, seguido de 0, 7, 14 o 21 días de recuperación (n=4-5). Expresión de marcadores, medidos mediante qPCR, de **(B)** proliferación (Ki67), referido a Gapdh, de **(C)** activación microglial (Clec7a, Lgals3, Cd45, Trem2), referidos al marcador microglial Tmem119 y **(D)** de infiltración de células mieloides (Cd163, Ccr2, Ly6c, Cd3), referidos a Gapdh, en hipocampo de ratones WT y CX3CSF1R tras 7, 14 y 21 días de recuperación. La significancia estadística se ha analizado mediante test ANOVA, seguido del test Fisher LSD, \*p<0,05, \*\*p<0,01 \*\*\*\*p<0,0001.

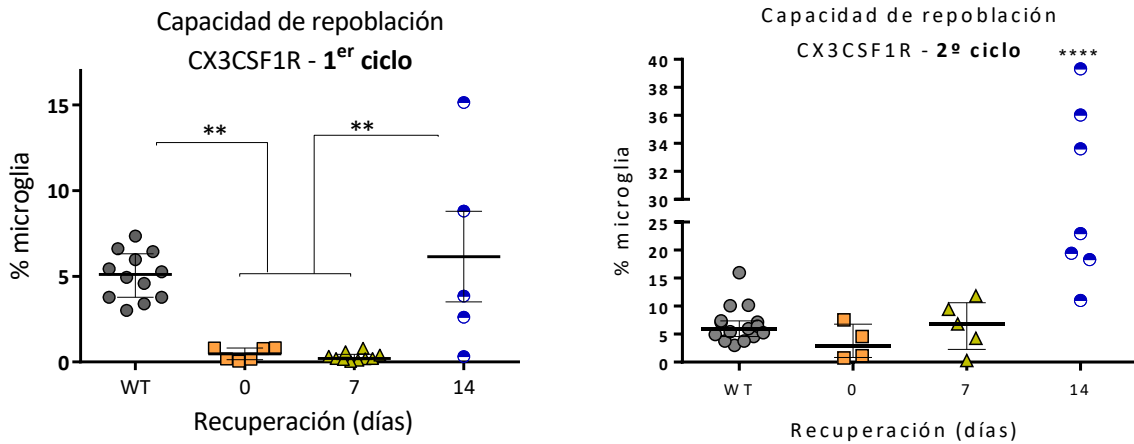


**Figura D.40. Estudio de la reactividad astrocítica tras el tratamiento de depleción aguda en animales de 12 meses.** Expresión relativa de ARNm de marcadores de activación astrocítica (Gfap y Aldh1l1), medida mediante qPCR y normalizada por Gapdh, en ratones WT y CX3CSF1R de 12 meses tras 7, 14 y 21 días de recuperación. La significancia estadística se ha analizado mediante test ANOVA.

#### 4.1.3. Estudio de la depleción y repoblación tras varios ciclos de tratamientos

Una vez confirmada la eficacia del modelo, nos planteamos realizar diferentes ciclos de inyecciones con tamoxifeno con el fin de agotar la capacidad de repoblación y alcanzar niveles reducidos de microglía de forma mantenida.

Para ello evaluamos la capacidad de repoblación en animales jóvenes (2 meses) después de un segundo ciclo de tratamiento agudo con tamoxifeno. Tras finalizar el primer ciclo de inyecciones, esperamos 14 días de recuperación e inyectamos nuevamente tamoxifeno durante 7 días. La cuantificación mediante citometría de flujo de las células microgliales al finalizar el segundo ciclo de tratamiento indica que la depleción microglial es menor que la que se produce en el primer ciclo (Figura D.41). Esto puede deberse o bien a que partimos de un porcentaje mayor de células microgliales (el porcentaje en el día 14 de recuperación tras primer ciclo es superior a la condición WT), o/y a la proliferación de una población microglial independiente de la señalización mediada por CSF1R. A los 14 días de repoblación del segundo ciclo de tratamiento, observamos nuevamente un pico de repoblación, siendo más pronunciado que tras el primer ciclo de tratamiento. Por consiguiente, un segundo tratamiento de depleción no agota la capacidad proliferativa microglial. Dado que la inyección de un segundo ciclo de tamoxifeno aumenta la letalidad a un 28%, no ha sido posible evaluar si la capacidad de repoblación microglial disminuye tras un tercer ciclo de tratamiento ya que decidimos no continuar con esta aproximación.



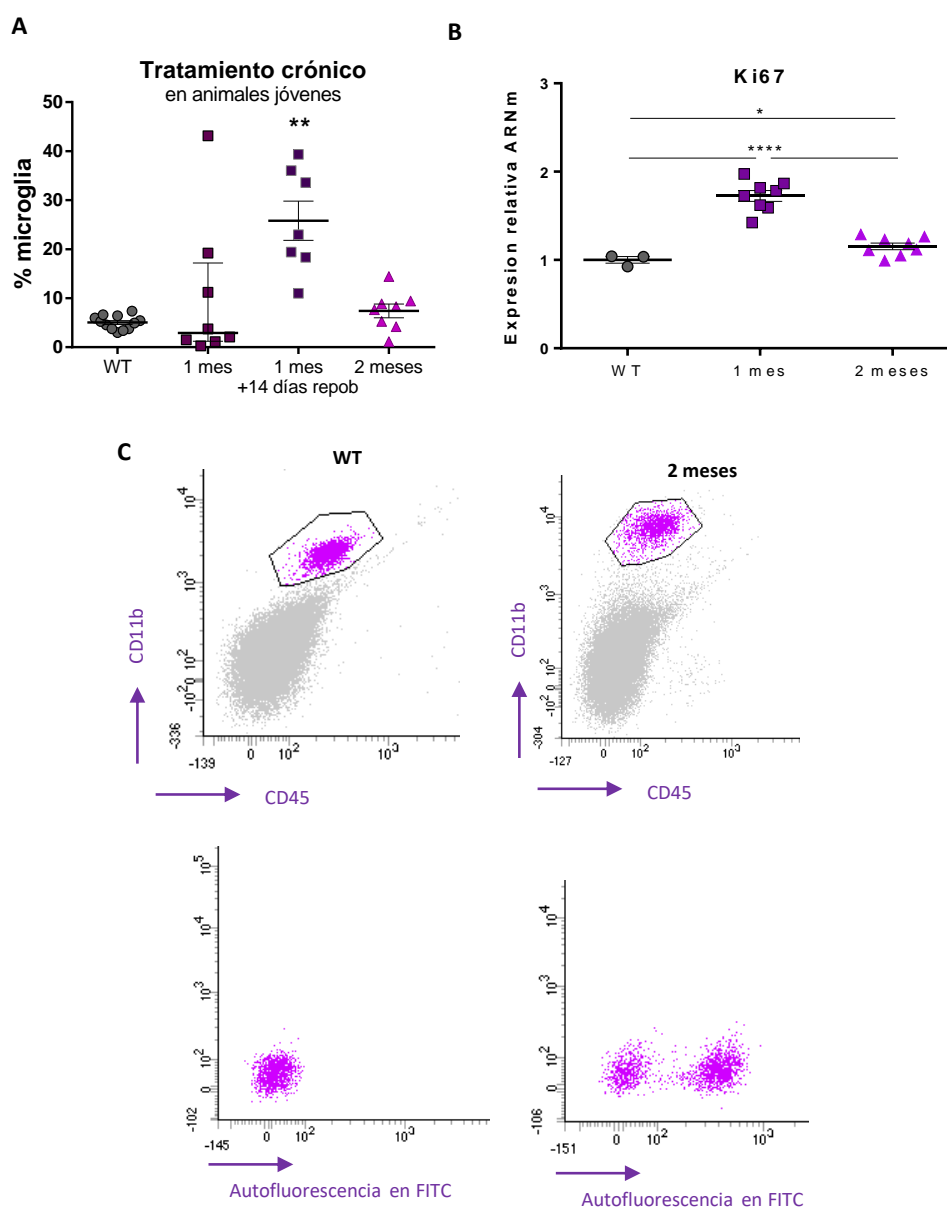
**Figura D.41. Un 2º ciclo de depleción aguda no logra una depleción completa y conlleva una super-repoblación microglial 14 días post-tratamiento en animales de 2 meses.** Cuantificación del porcentaje de microglía (células CD11b+CD45+), obtenido por citometría de flujo, en la corteza de ratones WT y CX3CSF1R de 2 meses tras el primer y el segundo ciclo de tratamientos de depleción aguda, seguido de 0, 7 o 14 días de recuperación (n=4-14). La significancia estadística se ha analizado mediante el test ANOVA, seguido del test Tukey. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

#### 4.2. Modelos de depleción microglial crónica

Los experimentos de depleción aguda microglial anteriormente descritos probablemente no mimeticen lo que realmente ocurra en el cerebro de los pacientes de EA donde, a pesar de que en ciertas regiones se produce daño en células microgliales, la proliferación de estas células parece ser muy escasa. Además, es probable que, en los enfermos, los estímulos nocivos inductores de la disfunción microglial actúen de manera crónica y, como consecuencia, los daños en estas células se mantengan en el tiempo. Por consiguiente, para evaluar con más traslacionalidad las consecuencias de niveles disminuidos de microglía diseñamos tratamientos crónicos en el modelo CX3CSF1R. Dada la elevada tasa de mortalidad que se produce con ciclos repetidos de inyecciones de tamoxifeno, decidimos realizar la depleción crónica microglial mediante la administración *ad libitum* de una dieta oral de tamoxifeno, con un consumo estimado de 40 mg de tamoxifeno/kg animal/día. En este caso, al igual que para los experimentos agudos, evaluamos el porcentaje de depleción microglial, así como los marcadores de activación microglial y de infiltración de células inmunes periféricas tras 1, 2 o 4 meses de tratamiento con dieta de tamoxifeno. En este caso, todos los parámetros han sido evaluados al finalizar el tratamiento, y no contemplamos días de repoblación.

Realizamos la puesta a punto de los tratamientos crónicos en animales jóvenes que empiezan la dieta con tamoxifeno a los 2 meses de edad. Como observamos en la Figura D.42 A, tras 1 mes de tratamiento oral, el porcentaje de células microgliales es muy variable: mientras que en algunos ratones la depleción microglial es muy pronunciada, en otros el porcentaje de células de microglía supera el que existe en los ratones control. De forma puntual, también hemos analizado el porcentaje de células microgliales

tras 14 días de repoblación, una vez finalizada la dieta de 1 mes de tamoxifeno. En este caso, observamos que se produce, al igual que para tras los tratamientos agudos, una contundente repoblación, alcanzándose niveles microgliales superiores a la condición control. Por otro lado, tras 2 meses de tratamiento, los niveles de microglía se mantienen en valores similares al WT, lo que parece indicar que existe un recambio continuo de microglía a pesar del tratamiento crónico de tamoxifeno. Estos datos se corroboran con la expresión de Tmem119 medida por qPCR para los distintos grupos (Figura D.44 A).

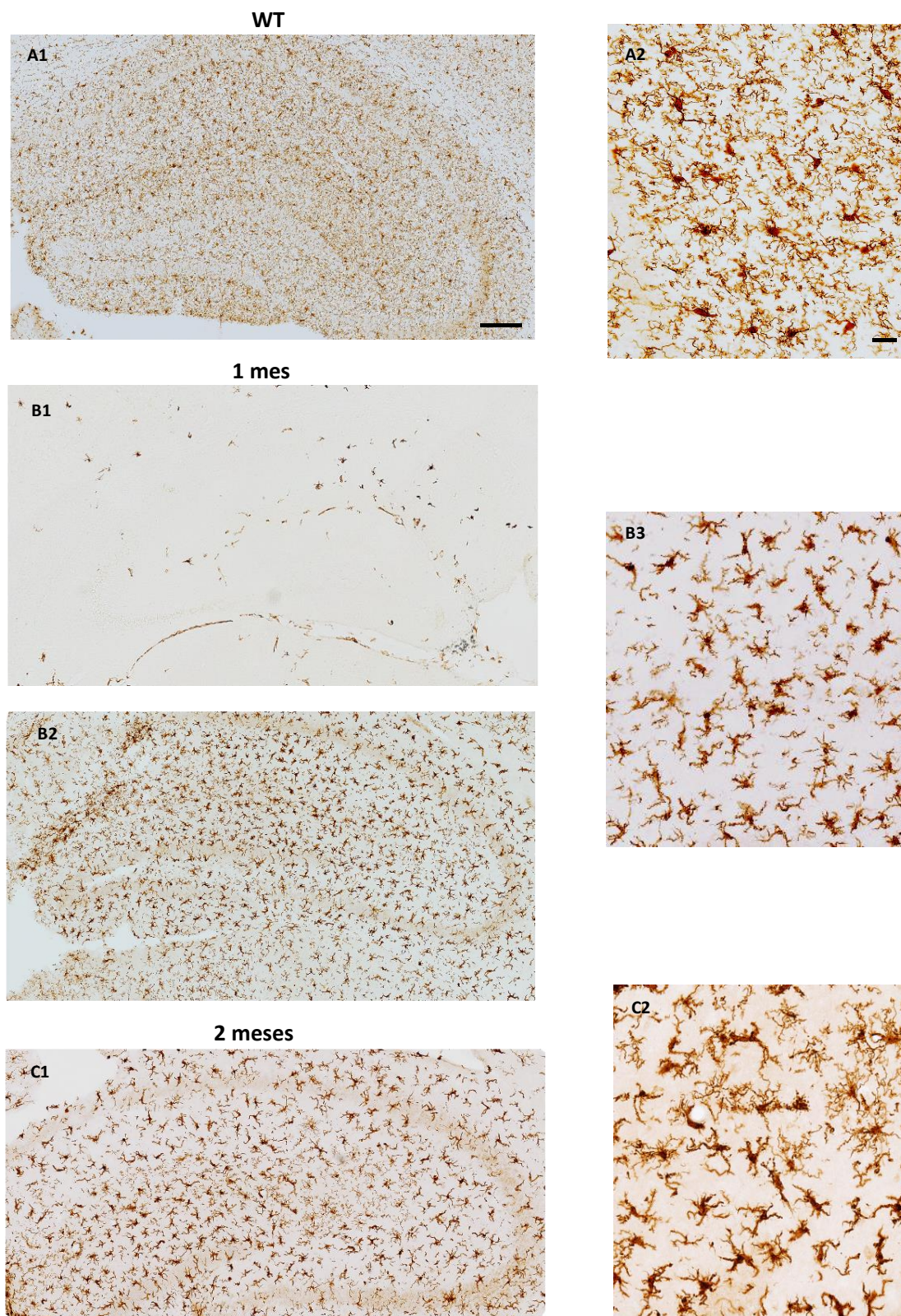


**Figura D.42. Estudio de la depleción microglial en animales jóvenes tras tratamientos crónicos.** **A)** Cuantificación del porcentaje de microglía (células CD45+CD11b+), obtenido por citometría de flujo, en la corteza de ratones WT y CX3CSF1R tras el tratamiento de depleción durante 1 o 2 meses y tras 1 mes de tratamiento y 14 días de repoblación (n=8-12). La significancia estadística se ha analizado mediante el test ANOVA, seguido del test Fisher LSD. **B)** Expresión del marcador de proliferación Ki67, medida por qPCR y normalizada por Gapdh, en el hipocampo de ratones WT y ratones CX3CSF1R tratados durante 1 o 2 meses. **C)** Imágenes representativas de citometría de flujo del análisis de la población microglial (CD45+CD11b+) y su patrón de autofluorescencia en FITC en un ratón WT y un ratón CX3CSF1R tratado 2 meses con tamoxifeno.

Aunque, como se ha comentado anteriormente, no podemos discernir las células microgliales remanentes de las emergentes, diferentes evidencias sugieren que en los tratamientos crónicos tiene lugar una depleción microglial seguida de una repoblación. Por un lado, tras el tratamiento de un mes con tamoxifeno oral seguido de 14 días de repoblación se observa un aumento significativo de la población microglial. Esto ilustra que al retirar el tamoxifeno se produce el pico de repoblación típico, descrito previamente en los tratamientos agudos (ver Resultados, Apartado 4.1) y en otros estudios de depleción (Najafi et al., 2018). Por otro lado, el aumento de expresión del marcador de proliferación Ki67 (Figura D.42 B), aunque es más moderado que en el caso de los tratamientos de depleción aguda, apoya la existencia de microglía emergente. Además, el análisis mediante citometría de flujo de la población microglial en ratones WT comparado con el de ratones CX3CSF1R tratados oralmente con tamoxifeno durante 2 meses muestra un patrón de autofluorescencia cualitativamente diferencial. En los animales tratados, se observan dos subgrupos diferenciados de la población microglial (Figura D.42 C) que podrían corresponder a distintos fenotipos.

Por último, mediante estudios inmunohistoquímicos (Figura D.43), observamos que la microglía presente en los animales CX3CSF1R tratados durante 1 y 2 meses presenta una morfología distinta al control, con una patente disminución de las prolongaciones. Además, mientras que en los ratones WT apenas existen cuerpos microgliales en la capa piramidal del hipocampo y en la capa granular del giro dentado (Dalmau et al., 1998), en los animales tratados con tamoxifeno se observan células microgliales en ambas capas. De hecho, la distribución microglial desordenada en los animales CX3CSF1R dificulta distinguir definitivamente las capas, por lo que sería conveniente realizar tinciones con cresil violeta. Este fenómeno, que debe ser caracterizado con mayor detalle, podría estar asociado a una activación microglial anómala (Zhao et al., 2018). Todas estas evidencias indican que durante los tratamientos crónicos probablemente esté teniendo lugar un mecanismo de recambio microglial.

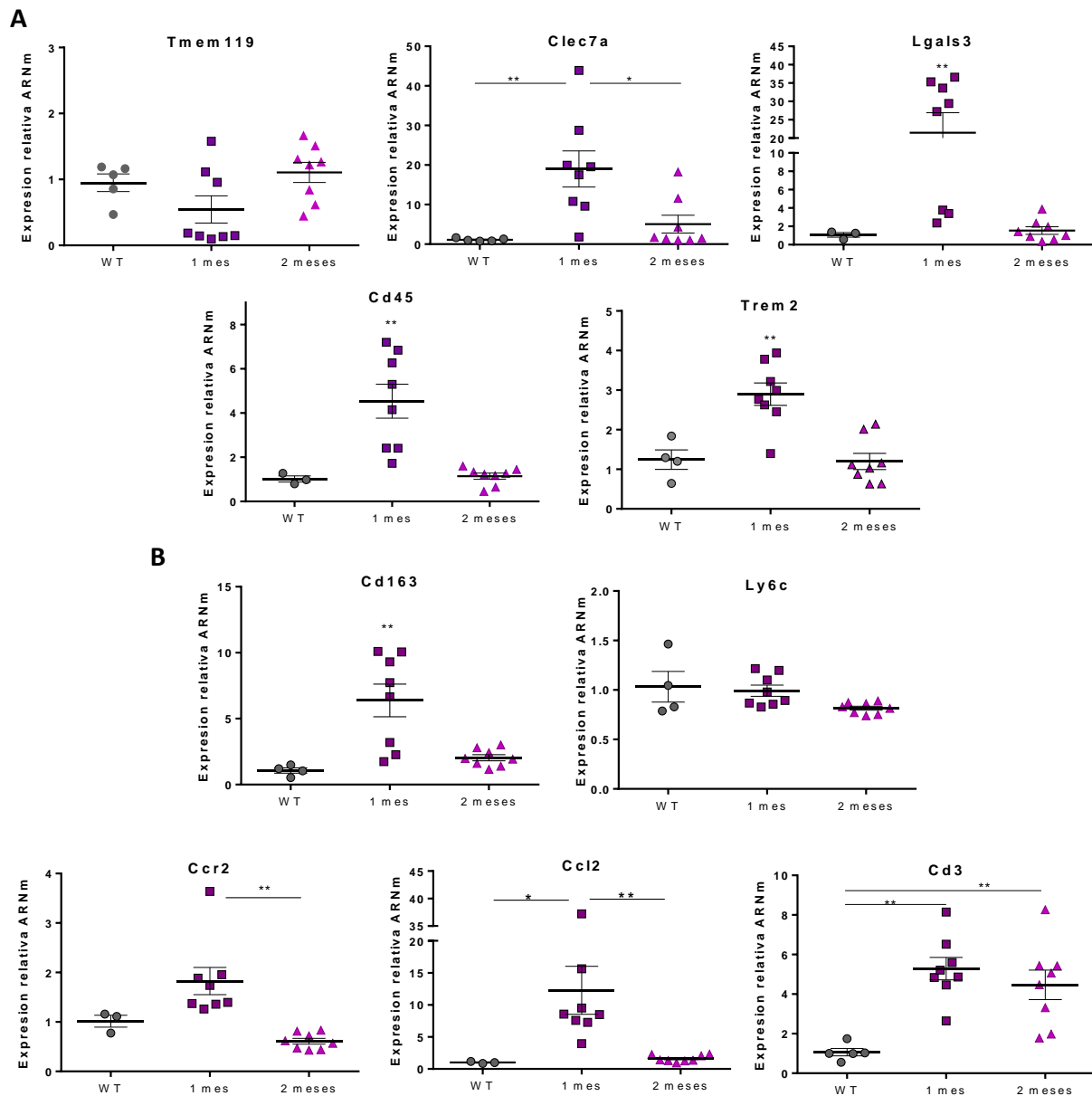




**Figura D.43. Imágenes ilustrativas del hipocampo de ratones WT (A) y CX3CSF1R tratados durante 1 (B) o 2 meses (C) con tamoxifeno oral.** Mientras que tras 1 mes de tratamiento existe elevada variabilidad intragrupal en la depleción microglial, tras el tratamiento de 2 meses, se observa una clara repoblación microglial en todos los animales analizados. Barras de escala: A1, B1, 2, C1, 200  $\mu$ m; A2, B3, C2 10  $\mu$ m.

Por otro lado, de la misma forma que en el tratamiento agudo, en los casos de mayor depleción microglial (1 mes de tratamiento), se produce una activación microglial (aumento de expresión de los marcadores Clec7a, Lgals3, Cd45 y Trem2) significativamente superior al WT, hecho que no ocurre en los animales tratados durante 2 meses, con niveles de microglía similares a la condición WT (Figura D.44 A).

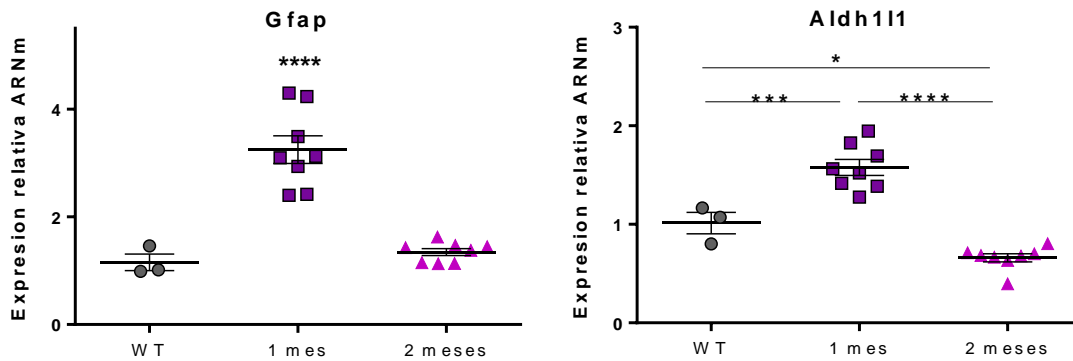
Además, como se muestra en la Figura D.44 B, el análisis de posibles marcadores de infiltración revela que nuevamente aumenta la expresión de Cd163 y Ccr2 en el grupo con mayores niveles de depleción (1 mes de tratamiento oral), mientras que no se registran cambios en el marcador Ly6c. Estos resultados podrían indicar que se está produciendo infiltración de células derivadas de monocitos Cd163+Ccr2+Ly6c- y correlacionan con un aumento de la expresión de la quimiocina atrayente Ccl2. En paralelo, también se produce un aumento de la expresión de Cd3, indicando infiltración de linfocitos. Todo ello coincide con lo que ocurre en animales jóvenes tras la primera semana de repoblación después del tratamiento de depleción aguda. Sin embargo, tras 2 meses de depleción crónica, los niveles de expresión de estos marcadores recuperan los valores de la condición WT, excepto Cd3 que se mantiene en niveles elevados, indicando que los linfocitos se siguen infiltrando. Sería conveniente realizar estudios inmunohistoquímicos para confirmar la presencia de linfocitos CD3 y estudiar su distribución en el parénquima cerebral.



**Figura D.44. Estudio del fenotipo microglial e infiltración de células periféricas en animales jóvenes tras tratamientos crónicos con tamoxifeno oral.** Expresión de marcadores de (A) activación microglial (Clec7a, Lgals3, Cd45, Trem2) referidos al marcador microglial Tmem119 y (B) de marcadores de células mieloides periféricas (Cd163, Ly6c, Ccr2, Cd3) y la quimiocina CCL2, referidos a Gapdh, medidos mediante qPCR en ratones WT y CX3CSF1R tras 1 y 2 meses del tratamiento oral con tamoxifeno. La significancia estadística se ha analizado mediante el test ANOVA, seguido del test Fisher LSD. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

Por otro lado, a diferencia de lo descrito para los tratamientos agudos, en los animales tratados durante 1 mes con tamoxifeno se produce un aumento significativo de los marcadores de activación astrocítica (Gfap, Aldh111) (Figura D.45). Esta diferencia podría deberse a que la microglía emergente esté manteniendo el fenotipo reactivo durante más tiempo. Es decir, mientras que en el tratamiento agudo la activación microglial es puntual y cesa a la segunda semana de repoblación, en el tratamiento crónico, la activación microglial mantenida durante un mes, probablemente induzca la polarización de los astrocitos hacia un fenotipo reactivo. Una vez que el recambio microglial se equilibra (tratamiento oral

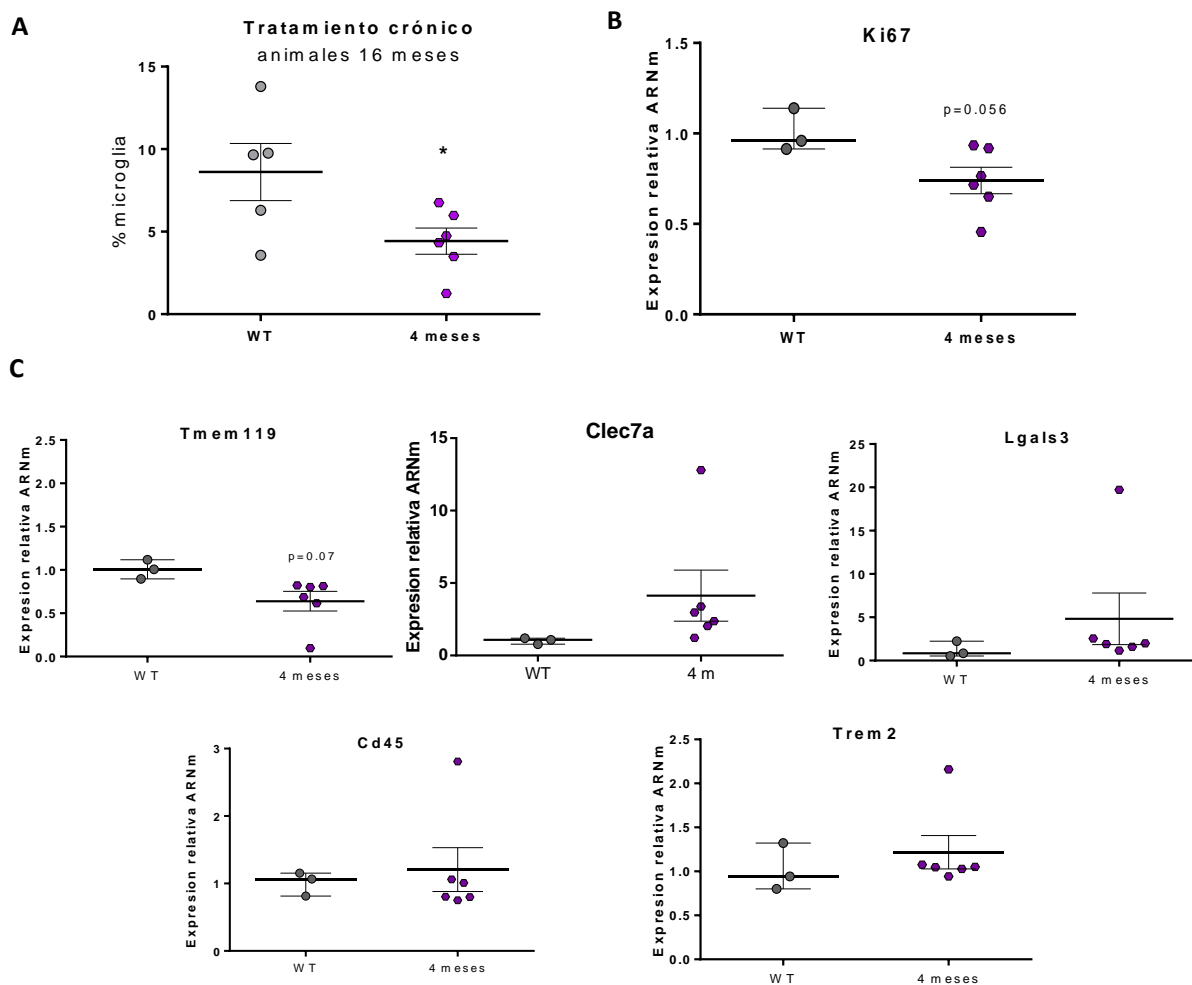
de 2 meses) y no existe reactividad microglial, los niveles de Gfap y Aldh11 vuelven a valores similares a los de la condición WT.



**Figura D.45. Estudio del fenotipo astrogial en animales jóvenes tras tratamientos crónicos con tamoxifeno oral.** Expresión de marcadores de activación astrogial (Gfap, Aldh11), referidos a Gapdh, medidos mediante qPCR en ratones WT y CX3CSF1R tras 1 y 2 meses del tratamiento oral con tamoxifeno. La significancia estadística se ha analizado mediante el test ANOVA, seguido del test Fisher LSD. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

A continuación, dado que nuestro objetivo final es evaluar los efectos de la depleción microglial en modelos de Alzheimer (animales APPCX3CSF1R y TaucX3CSF1R), en los que la patología alcanza su desarrollo a los 8-12 meses, consideramos necesario caracterizar la depleción que tiene lugar mediante tratamientos crónicos en animales CX3CSF1R envejecidos. Pensamos que es probable que en animales envejecidos se pierda la capacidad de repoblación microglial que hemos observado en animales jóvenes con el tratamiento crónico. Además, como los cambios en las patologías Abeta y Tau son lentos, decidimos ampliar los tratamientos crónicos a 4 meses de duración.

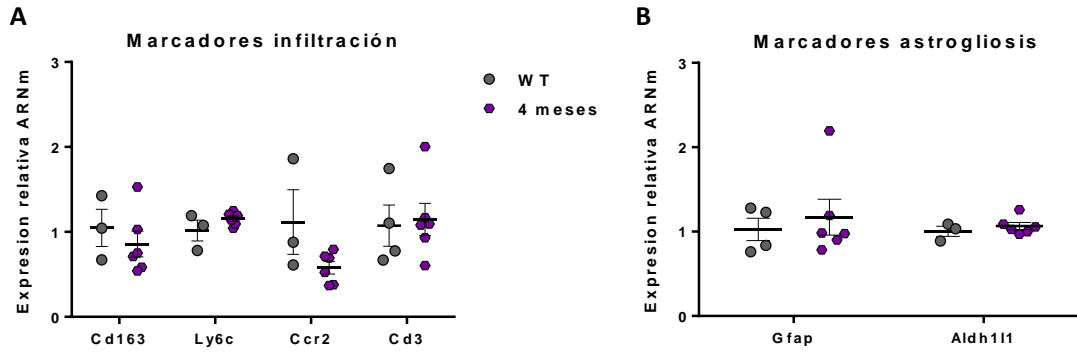
Por consiguiente, alimentamos los animales CX3CSF1R de 12 meses con pienso con tamoxifeno durante 4 meses, sacrificándolos justo al finalizar el tratamiento, con 16 meses de edad. Como se observa en la Figura D.46 A, al finalizar el tratamiento se produce una disminución en el porcentaje de células microgliales que correlaciona con la disminución de la expresión del marcador homeostático microglial Tmem119 (Figura D.46 C), lo que refleja que, en animales envejecidos, el tratamiento prolongado con tamoxifeno no es capaz de mantener una proliferación microglial suficiente para mantener un recambio constante de estas células. De hecho, como se muestra en la Figura D.46 B, tras 4 meses de tratamiento se reduce la expresión del marcador de proliferación Ki67. Además, en contraste con lo que ocurre tras los tratamientos agudos y tras el tratamiento crónico de 1 mes en animales jóvenes, la disminución en la población microglial, no se acompaña de un incremento significativo en los marcadores de activación microglial, aunque Clec7a muestra una ligera subida (Figura D.46 C).



**Figura D.46. Estudio de la depleción y fenotipo microglial en animales envejecidos tras 4 meses de tratamiento con tamoxifeno oral.** **A)** Cuantificación del porcentaje de microglía (células CD45+CD11b+), obtenido por citometría de flujo, en la corteza de ratones WT y CX3CSF1R de 16 meses, tras 4 meses de tratamiento de depleción. Expresión de marcadores de **(B)** proliferación (Ki67), normalizado por Gapdh y de **(C)** activación microglial (Clec7a, Lgals3, Cd45, Trem2) referidos al marcador microglial Tmem119, medidos mediante qPCR, en ratones WT y CX3CSF1R tras 4 meses de tratamiento oral. La significancia estadística se ha analizado mediante t test de Student. \* $p<0,05$ .

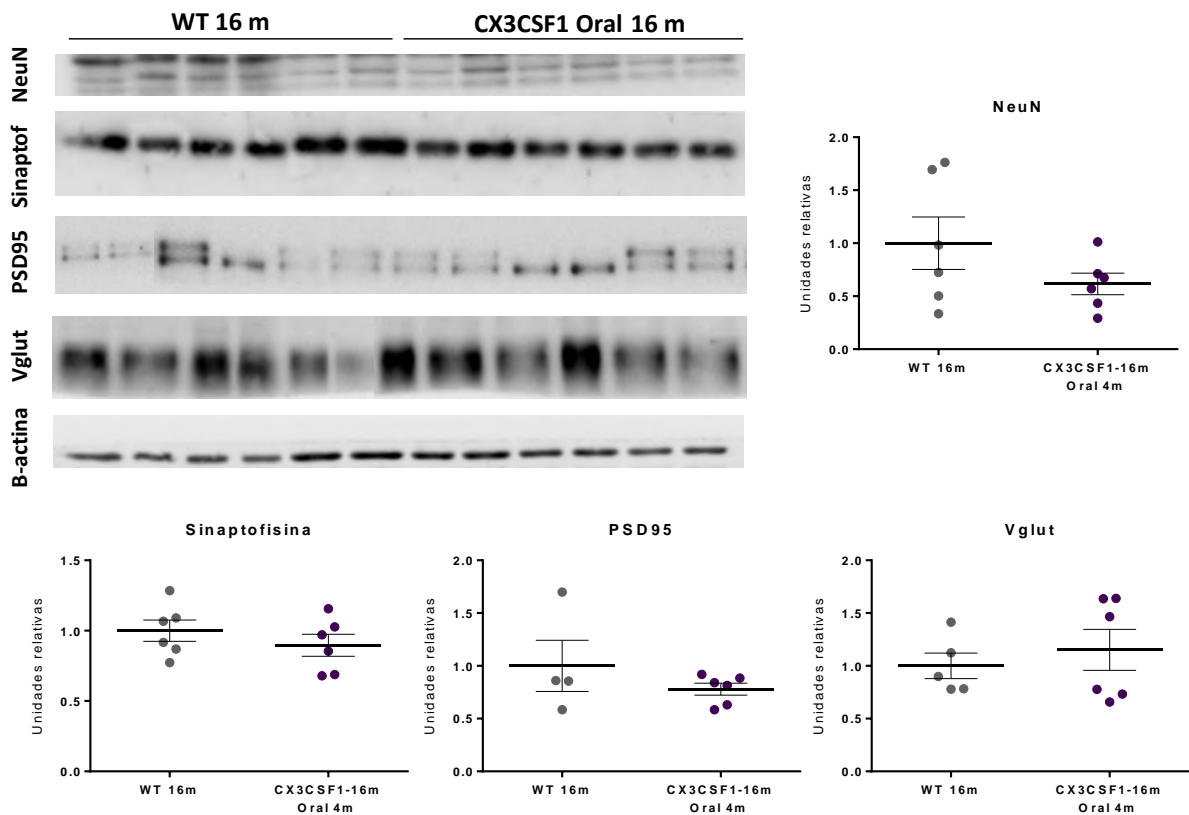
En la misma línea, como se muestra en la Figura D.47 A, tampoco existe un aumento de expresión en los marcadores Cd163, Ly6C, Ccr2 o Cd3. Por tanto, la activación microglial y la infiltración de células periféricas inmunes parecen estar asociadas a una depleción menos prolongada en el tiempo. Además, en consonancia con la falta de activación microglial, no se observa reactividad astrocítica en los animales CX3CSF1R tratados durante 4 meses (Figura D.47 B).





**Figura D.47. Estudio de la infiltración de células inmunes periféricas y de activación astrogliar en animales envejecidos tras 4 meses de tratamiento con tamoxifeno oral.** Expresión de marcadores de (A) infiltración de células inmunes periféricas (Cd163, Ly6c, Ccr2, Cd3) y de (B) activación astrogliar (Gfap y Aldh111), normalizados por Gapdh; medidos mediante qPCR, en ratones WT y CX3CSF1R tras 4 meses de tratamiento oral. La significancia estadística se ha analizado mediante t test de Student.

Dado que este tratamiento implica una reducción crónica de los niveles microgliales y ha sido realizado en animales susceptibles de cambios sinápticos y neuronales por su edad, evaluamos posibles variaciones en marcadores específicos de actividad neuronal. Como se muestra en la Figura D.48, la disminución de la población microglial no se acompaña de una muerte neuronal significativa (ya que se mantienen los niveles de NeuN) ni de alteración de la actividad sináptica (no se producen cambios significativos en los niveles de PSD95, sinaptofisina o Vglut).



**Figura D.48. La depleción microglial no induce cambios neuronales ni sinápticos en animales envejecidos tras 4 meses de tratamiento con tamoxifeno oral.** Western-blots representativos y cuantificaciones del marcador neuronal NeuN y los marcadores sinápticos Sinaptofisina, PSD95 y Vglut. La significancia estadística se ha analizado mediante t test de Student.

### 4.3. Efecto de la depleción microglial en presencia de patología Abeta

Una vez comprobada la eficacia del sistema  $Cx3Cr1^{CreER}CSF1r^{flox/flox}$ , evaluamos los efectos de la depleción microglial sobre modelos con patología de Alzheimer. Para ello, realizamos tratamientos crónicos (4 meses de duración) en animales APPCX3 en estadios pre-patología y post-patología con el fin de evaluar cómo influye la pérdida y/o el recambio continuo de microglía tanto en el inicio como en la progresión de los depósitos amiloides.

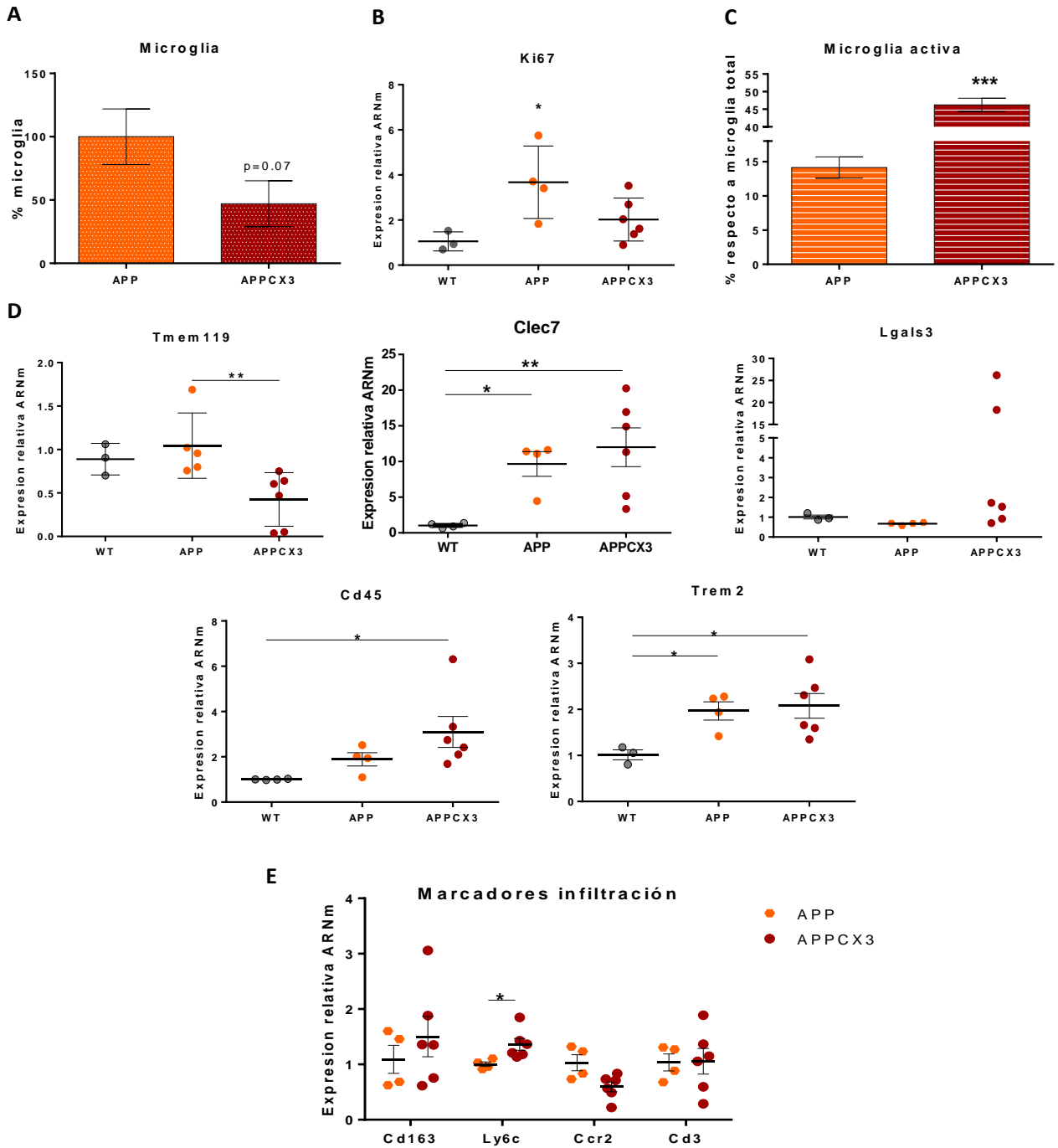
#### 4.3.1. Efectos de la depleción microglial en los estadios iniciales de la patología Abeta

Para estudiar el papel de la microglía en el inicio de la patología amiloide, los ratones APPCX3 se alimentaron con tamoxifeno desde los 4 hasta los 8 meses de edad y se sacrificaron al finalizar la dieta. Tras el tratamiento, y al igual que en el estudio anterior, observamos mediante citometría de flujo y cuantificando la expresión de Tmem119, una reducción de la población microglial en los ratones APPCX3 (Figura D.49 A y D). Aunque el modelo APP sin tratar presenta niveles significativamente superiores de proliferación que los animales WT (marcador Ki67, Figura D.49 B), en el modelo APPCX3 tratado con tamoxifeno, se produce un descenso de dicho marcador de proliferación respecto a APP, que en cualquier caso se mantiene en niveles superiores a los del WT. Por consiguiente, el tratamiento con tamoxifeno tiende a disminuir la capacidad proliferativa microglial que se produce en respuesta a la patología amiloide.

Además, durante el análisis de la población microglial por citometría de flujo en tejido cortical, añadimos un marcaje para Clec7a, con el fin de identificar células microgliales activas. Como se observa en la Figura D.49 C, tras 4 meses de tratamiento con tamoxifeno de los ratones jóvenes APPCX3, se produce un aumento en la proporción de microglía activa respecto al total de células microgliales, que intentamos corroborar analizando mediante qPCR la expresión de los marcadores Clec7a, Lgals3, Cd45 y Trem2, en tejido hipocampal. Sin embargo, aunque la expresión de estos marcadores es significativamente superior a la de la condición WT, y para Clec7a, Lgals3 y Cd45 es superior a la de los ratones APP (Figura D.49 D), las diferencias entre APP y APPCX3 no son estadísticamente significativas, probablemente debido a la gran dispersión de los valores y al escaso número de muestras analizadas.

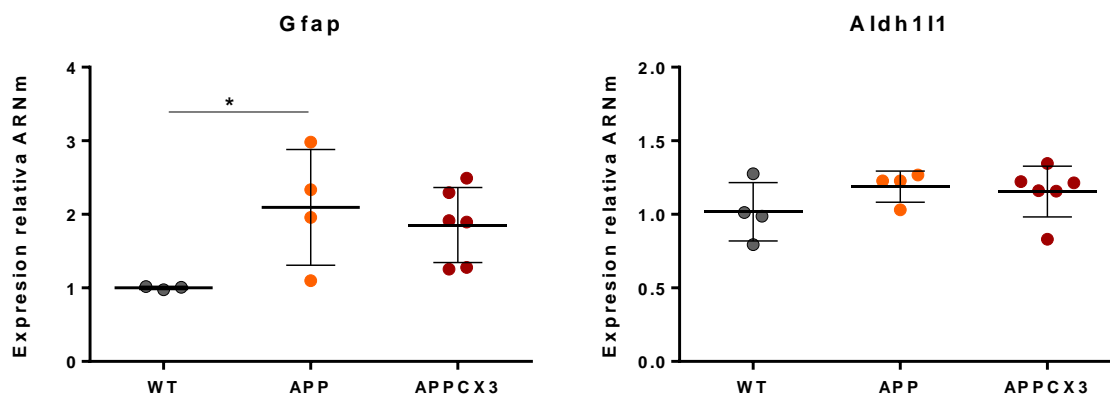
Además, y al igual que ocurría tras el tratamiento de 4 meses en animales sin patología, no observamos cambios en la expresión de los marcadores de infiltración Cd163, Ccr2 o Cd3 (Figura D.49 E). Inesperadamente, sí se produce un incremento en la expresión de Ly6c, que podría reflejar infiltración de monocitos (células Ly6c+) tras la depleción microglial en presencia de patología Abeta. Se requieren estudios inmunohistoquímicos adicionales para la caracterización de estas células.





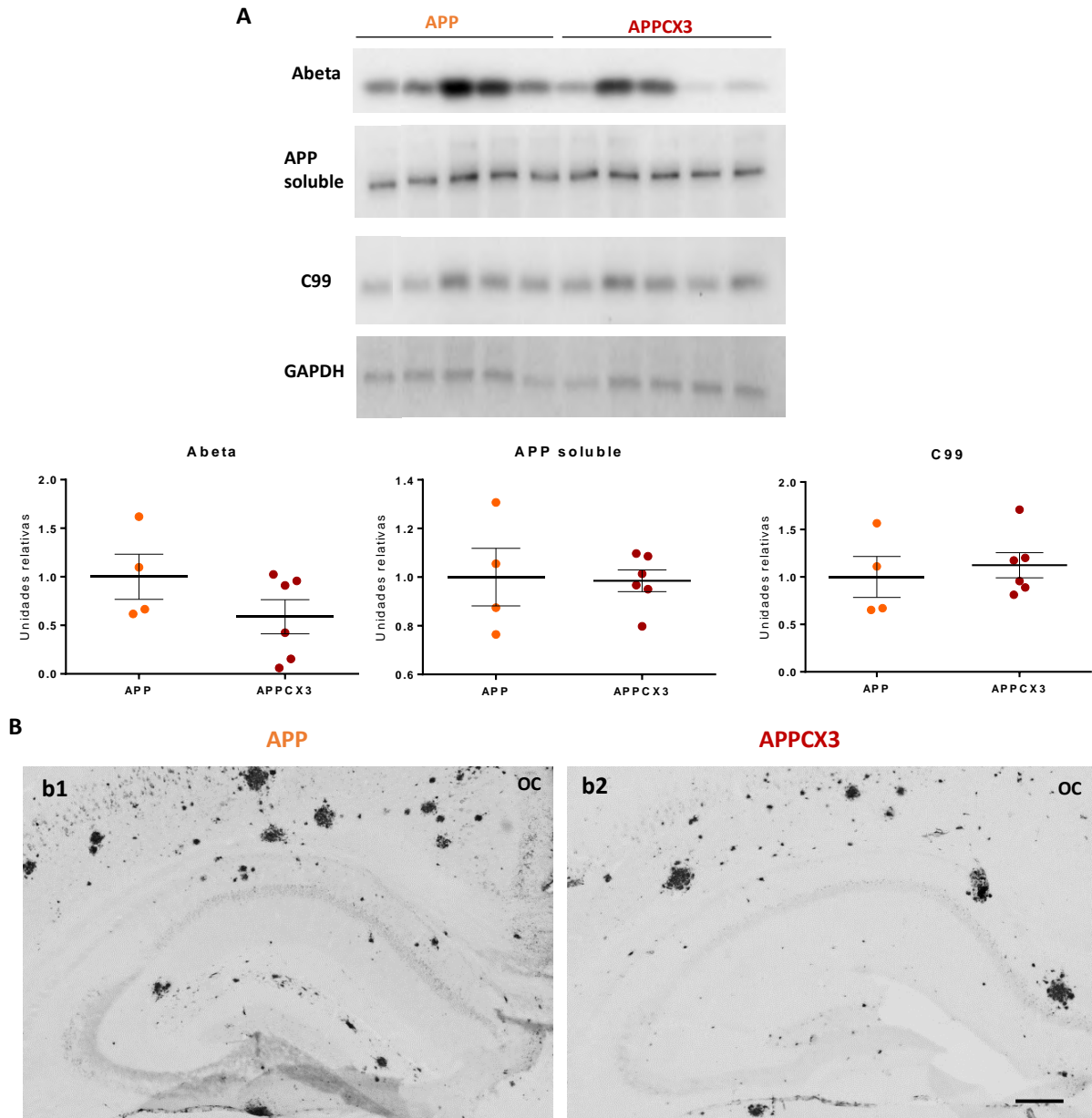
**Figura D.49.** La alimentación con tamoxifeno desde los 4 a los 8 meses en animales APPCX3 produce disminución de la población microglial, incremento en su activación y no induce la infiltración de células periféricas inmunes Cd163+, Ccr2+, Cd3+, pero sí Ly6c+. **(A)** Porcentaje de células microgliales (CD45+/CD11b+) identificadas mediante citometría de flujo en animales APP y APPCX3 de 8 meses. **(B)** Expresión de ARNm para el marcador de proliferación Ki67, medida por qPCR y normalizada por Gapdh. **(C)** Porcentaje de células microgliales activas (CD45+/CD11b+/Clec7a<sup>high</sup>) respecto al total de células microgliales analizado en (A). Expresión de marcadores de **(D)** activación microglial (Clec7a, Lgals3, Cd45, Trem2) referidos al marcador microglial Tmem119, y **(E)** de infiltración de células inmunes periféricas (Cd163, Ccr2, Cd3, Ly6C), normalizados por Gapdh, medidos mediante qPCR, en ratones WT, APP y APPCX3 de 8 meses. La significancia estadística se ha analizado mediante t-test de Student cuando se ha comprado entre dos grupos y mediante el test ANOVA, seguido del test Fisher LSD, cuando se han comparado tres grupos. \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$ .

Por otro lado, al evaluar los marcadores de reactividad astrogliar (Gfap y Aldh1l1), observamos un aumento respecto a WT, pero no existen diferencias significativas entre los animales APP y los animales APPCX3 depletados (Figura D.50).



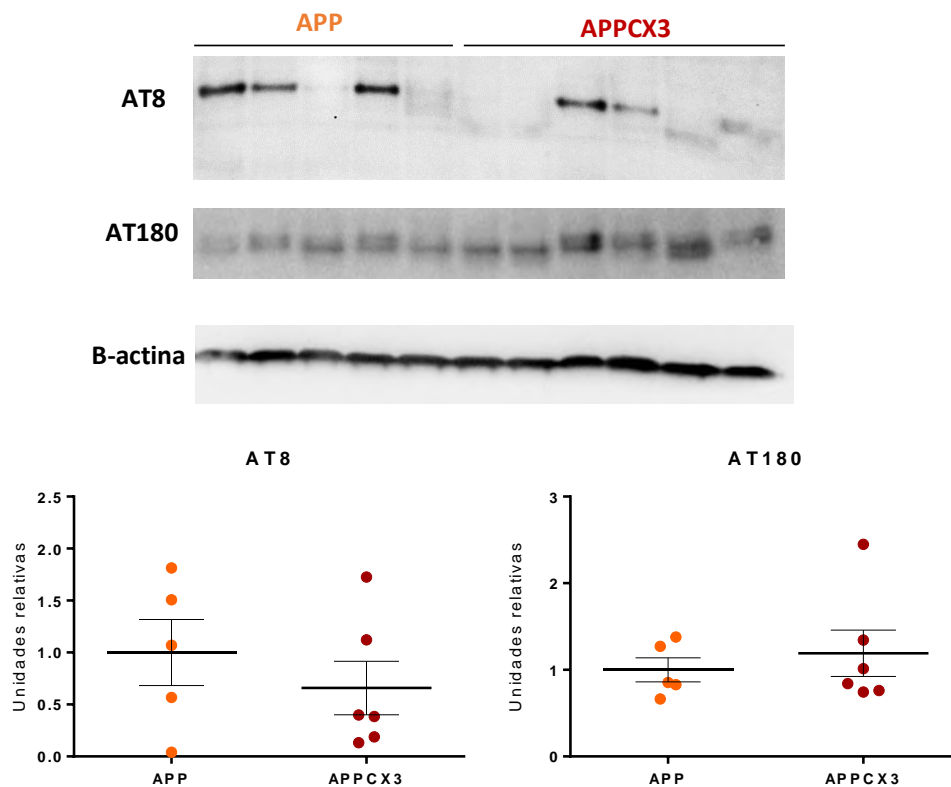
**Figura D.50. La alimentación con tamoxifeno desde los 4 a los 8 meses en animales APPCX3 no modifica la reactividad astrocítica.** Expresión de marcadores de astrogliosis medidos mediante qPCR y normalizados por Gapdh, en ratones WT, APP y APPCX3 de 8 meses. La significancia estadística se ha analizado mediante el test ANOVA seguida del post-test Fisher LSD. \* $p < 0,05$ .

A continuación, estudiamos cómo afecta el tratamiento de depleción microglial tras la dieta de 4 meses con tamoxifeno al desarrollo de la patología amiloide. En la interpretación de estos resultados debemos tener en cuenta que a lo largo de este periodo probablemente ocurre un proceso de recambio microglial y no podemos atribuir si los cambios observados se deben a una reducción de los niveles microgliales y/o a la aparición de células microgliales nuevas, cuya función desconocemos. Mediante western-blot, cuantificamos los niveles de Abeta, APP soluble y C99 en ratones APP y APPCX3. Nuestros resultados muestran gran variabilidad en la patología amiloide en los animales APP de 8 meses, probablemente debido a que aún se está estableciendo la patología, lo que dificulta el análisis comparativo con los animales APPCX3. Como se observa en la Figura D.51 A, los valores de APP soluble y de C99 son similares en ambos grupos, lo que indica que no existen variaciones en la capacidad neuronal para producir Abeta. Sin embargo, la carga de Abeta tiende a disminuir en los animales APPCX3, lo que podría sugerir que el recambio microglial continuo mejora su aclaramiento. Sería conveniente medir la cantidad de Abeta soluble, mediante la técnica de ELISA, para evaluar dicha hipótesis. Por otro lado, las imágenes de inmunohistoquímica con el anticuerpo OC ilustran dicha reducción de los depósitos amiloides en los animales APPCX3 (Figura D.51 B), aunque se requieren estudios cuantitativos acerca del número, tamaño y circularidad de las placas para establecer conclusiones sólidas.



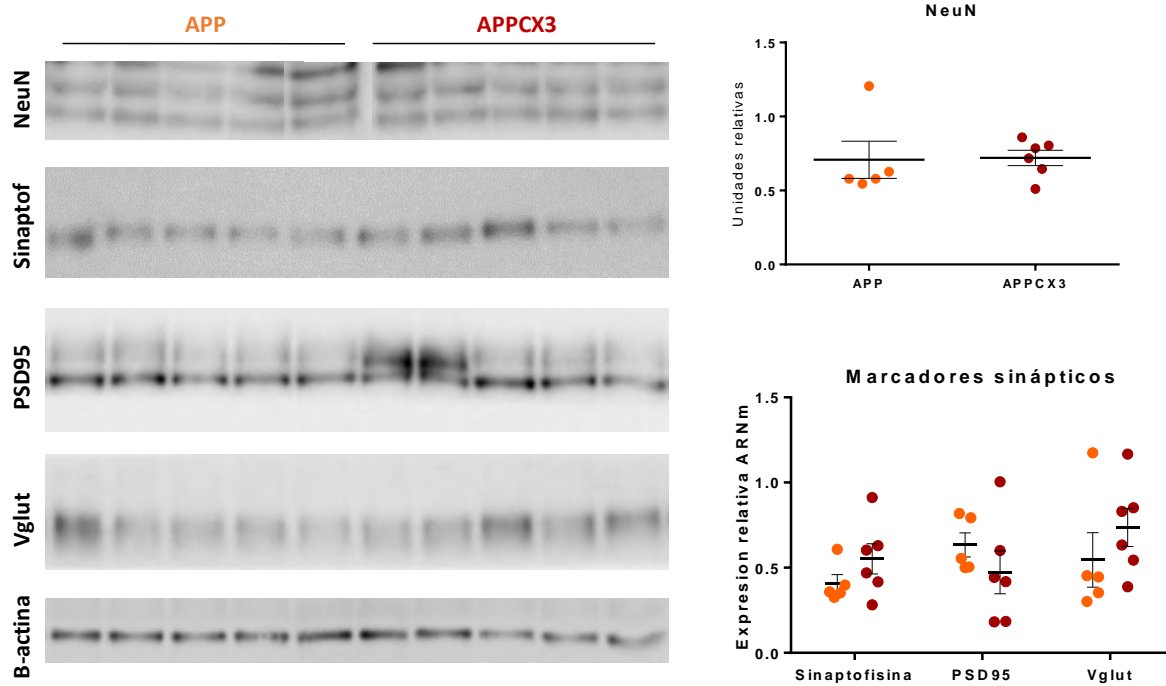
**Figura D.51. Estudio del efecto de la depleción parcial microglial en animales APPCX3 sobre el contenido amiloide. (A)** Western-blots representativos y cuantificaciones de proteínas del metabolismo amiloide: C99, APP soluble y Abeta en ratones APP y APPCX3 tratados con tamoxifeno de los 4 a los 8 meses de edad. La significancia estadística se ha analizado mediante el t test de Student. **(B)** Inmunohistoquímica representativa para OC en ratones APP y APPCX3 tratados con tamoxifeno, que refleja una bajada de los depósitos amiloide en los animales APPCX3. Barra de escala: 200  $\mu$ m.

Seguidamente, teniendo en cuenta que el desarrollo de la patología Abeta induce la fosforilación de Tau en el modelo transgénico APP, evaluamos los efectos de la depleción microglial sobre esta tauopatía. Como se observa en la Figura D.52, no existen cambios significativos en la fosforilación de Tau en los animales APPCX3 de 8 meses comparados con los animales APP. Dado que la inducción de la fosforilación de Tau a través de Abeta es un evento sutil, la ausencia de cambios en AT8 y AT180 podría justificarse como consecuencia de las leves modificaciones que sufre la patología amiloide en los animales APPCX3.



**Figura D.52. La alimentación con tamoxifeno desde los 4 a los 8 meses en animales APPCX3 no induce cambios significativos en la fosforilación de Tau.** Western-blot representativos y cuantificaciones de la fosforilación de Tau (AT8 y AT180) en ratones APP, y APPCX3 tratados con tamoxifeno de los 4 a los 8 meses de edad. La significancia estadística se ha analizado mediante el t test de Student.

Por último, estudiamos si la depleción microglial parcial crónica genera alteraciones en la degeneración neuronal y en la sinaptopatía en el modelo APPCX3. Como se muestra en la Figura D.53, y tal y como se esperaba dados los leves cambios en la carga amiloide, el tratamiento con tamoxifeno no induce cambios neuronales (marcador NeuN) ni sinápticos (marcadores Sinaptofisina, PSD95 y Vglut) en los animales APPCX3 de 8 meses.



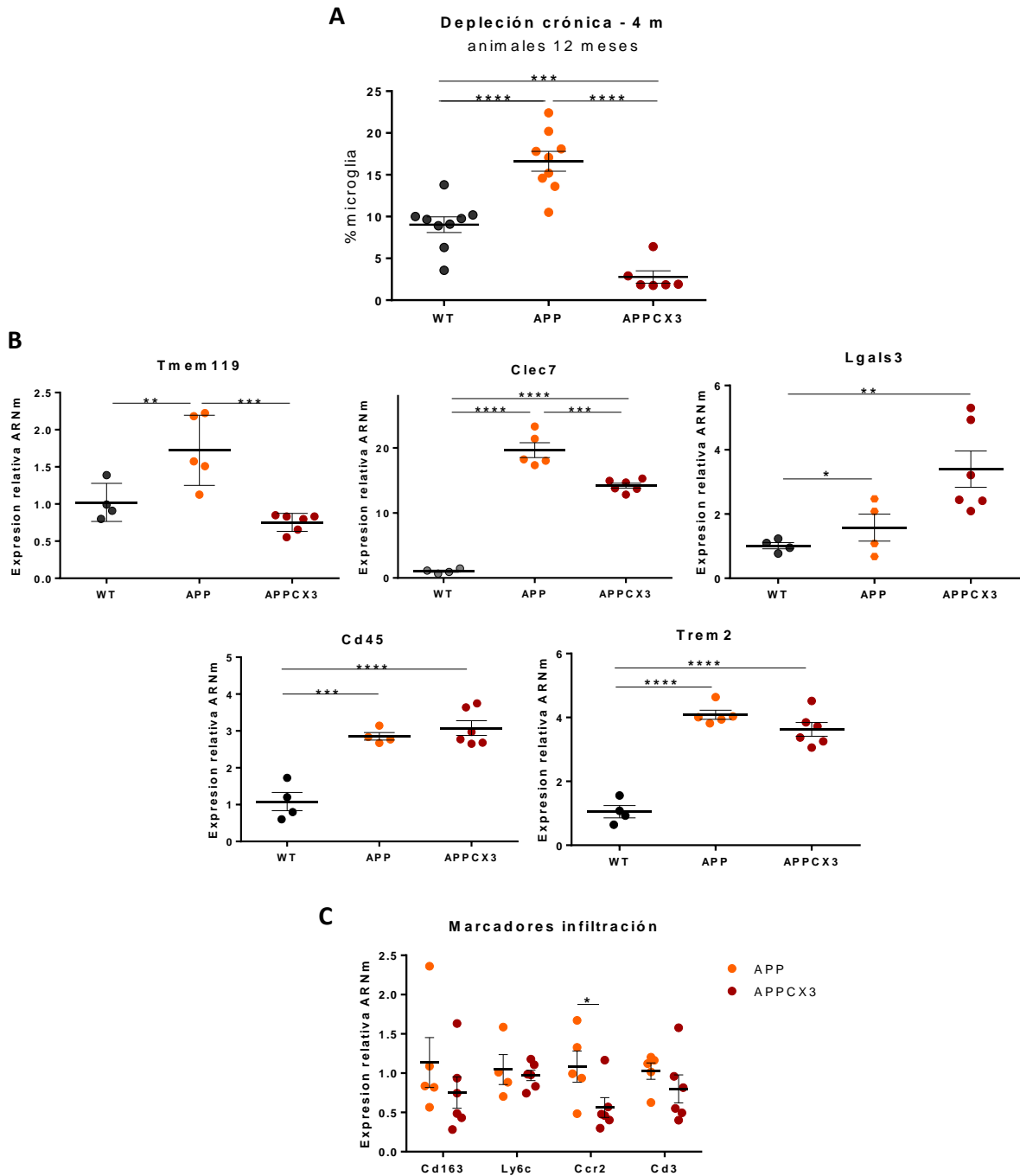
**Figura D.53.** La alimentación con tamoxifeno desde los 4 a los 8 meses en animales APPCX3 no induce cambios neuronales ni sinápticos. Western-blot representativos y cuantificaciones de proteínas neuronales (NeuN) y sinápticas (Sinaptofisina, PSD95 y Vglut) en ratones APP y APPCX3 que han sido tratados con tamoxifeno de los 4 a los 8 meses de edad. La significancia estadística se ha analizado mediante test de ANOVA.

#### 4.3.2. Efectos de la depleción microglial en los estadios avanzados de la patología Abeta

Con el objetivo de estudiar el efecto de la depleción microglial una vez establecida la patología amiloide, alimentamos con tamoxifeno oral a los animales APPCX3 desde los 8 hasta los 12 meses de edad y los sacrificamos justo al finalizar el tratamiento. Tal y como se esperaba, el tratamiento crónico durante 4 meses produce una reducción del porcentaje de células microgliales, analizado mediante citometría de flujo (Figura D.54 A). Nuevamente, en consonancia con lo descrito para el modelo APP, el porcentaje de células microgliales es superior comparado con los ratones WT. Sin embargo, tras el tratamiento con tamoxifeno, la población microglial desciende considerablemente, incluso por debajo de los niveles de animales WT. Estos datos se corresponden con el descenso de expresión, medido mediante qPCR, del marcador homeostático microglial Tmem119 en los animales APPCX3 (Figura D.54 B). En paralelo, la inmunotinción con el marcador microglial Iba1, aparentemente también muestra una disminución del número de células microgliales en el hipocampo de los ratones APPCX3 respecto a los animales APP (Figura D.55). A falta de un análisis inmunohistoquímico de doble tinción Iba1/OC, cabe comentar de forma preliminar que mientras en los animales APP la microglía se dispone ordenadamente y se agrupa alrededor de las placas de Abeta en el parénquima hipocampal, en los animales APPCX3 tratados durante 4 meses, la distribución de estas células parece ser más desordenada y encontramos cuerpos celulares en las capas piramidal y granular, al igual que ocurría en los animales CX3CSF1R tratados

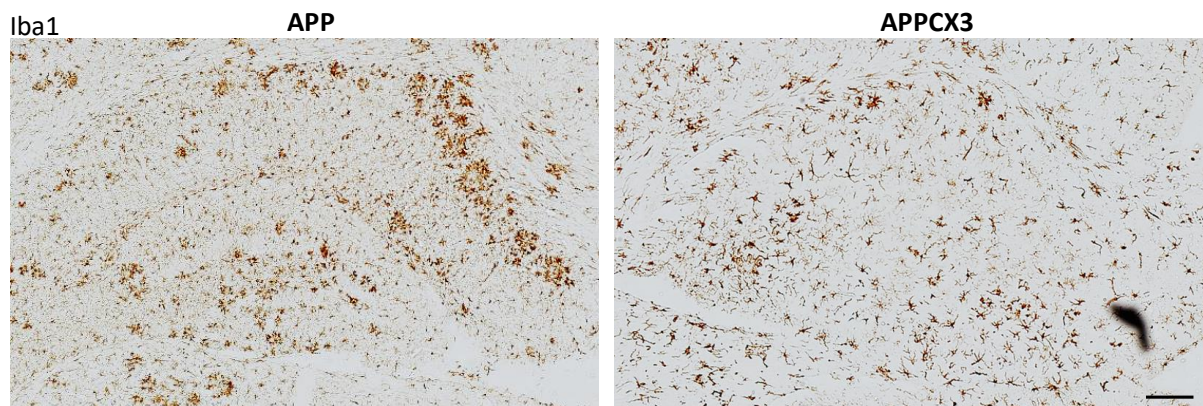
durante 1 y 2 meses con tamoxifeno oral. Además, parece existir una menor agrupación microglial alrededor de placas.

Como se ha mostrado anteriormente (Figura D.1 B), los transgénicos APP de edades avanzadas (9-18 meses) muestran un aumento de los marcadores de activación microglial (Clec7a, Lgals3, Cd45 y Trem2) respecto a animales WT. Sin embargo, en comparación con los animales APP, en los animales APPCX3 alimentados con tamoxifeno se produce un descenso significativo del marcador Clec7a, aunque se mantiene en niveles significativamente superiores respecto a los animales WT. Esto indica que podría existir un descenso de la reactividad microglial como consecuencia de la reducción de los niveles microgliales totales o/y del recambio microglial continuo, aunque no se producen cambios significativos en los niveles de los marcadores Lgals3, Cd45 o Trem2 entre los animales APP y APPCX3. Por otro lado, el tratamiento con tamoxifeno de los 8 a los 12 meses en los animales APPCX3 no supone una infiltración de células inmunes periféricas, ya que no existe aumento en la expresión de los marcadores Cd163, Ly6c, Ccr2 o Cd3, respecto a los animales APP de 12 meses. De hecho, observamos un descenso significativo de la expresión de Ccr2. Por tanto, la reducción de los niveles microgliales totales no parece atraer células inmunes periféricas al parénquima cerebral.



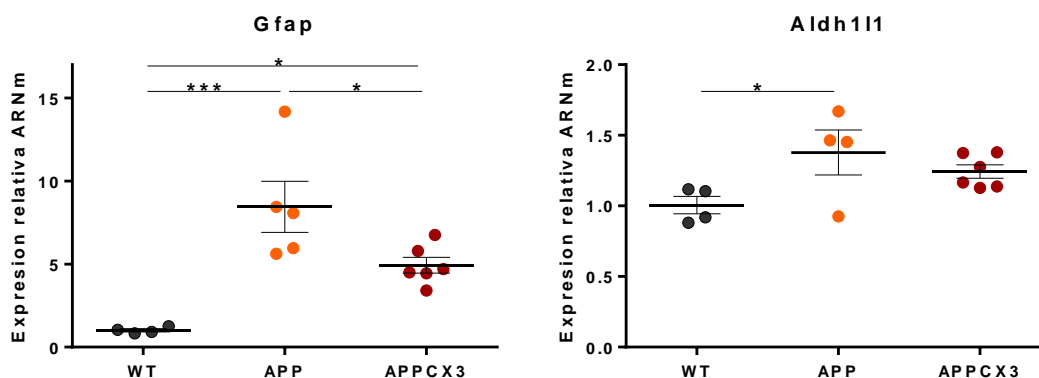
**Figura D.54. La alimentación con tamoxifeno desde los 8 hasta los 12 meses en animales APPCX3 reduce los niveles de microglía y la activación microglial, y no conlleva infiltración de células inmunes periféricas. (A)** Cuantificación del porcentaje de microglía (células CD45+CD11b+), obtenido por citometría de flujo, en ratones WT, APP y APPCX3 de 12 meses de edad, tras 4 meses de tratamiento con tamoxifeno. Expresión, medida mediante qPCR, **(B)** del marcador microglial Tmem119, referido a Gapdh, y de marcadores activación microglial (Clec7a, Lgals3, Cd45, Trem2), referidos al marcador microglial Tmem119; y **(C)** de marcadores de infiltración de células inmunes (Cd163, Ly6c, Ccr2, Cd3), normalizados por Gapdh; en ratones APP y APPCX3 de 12 meses.





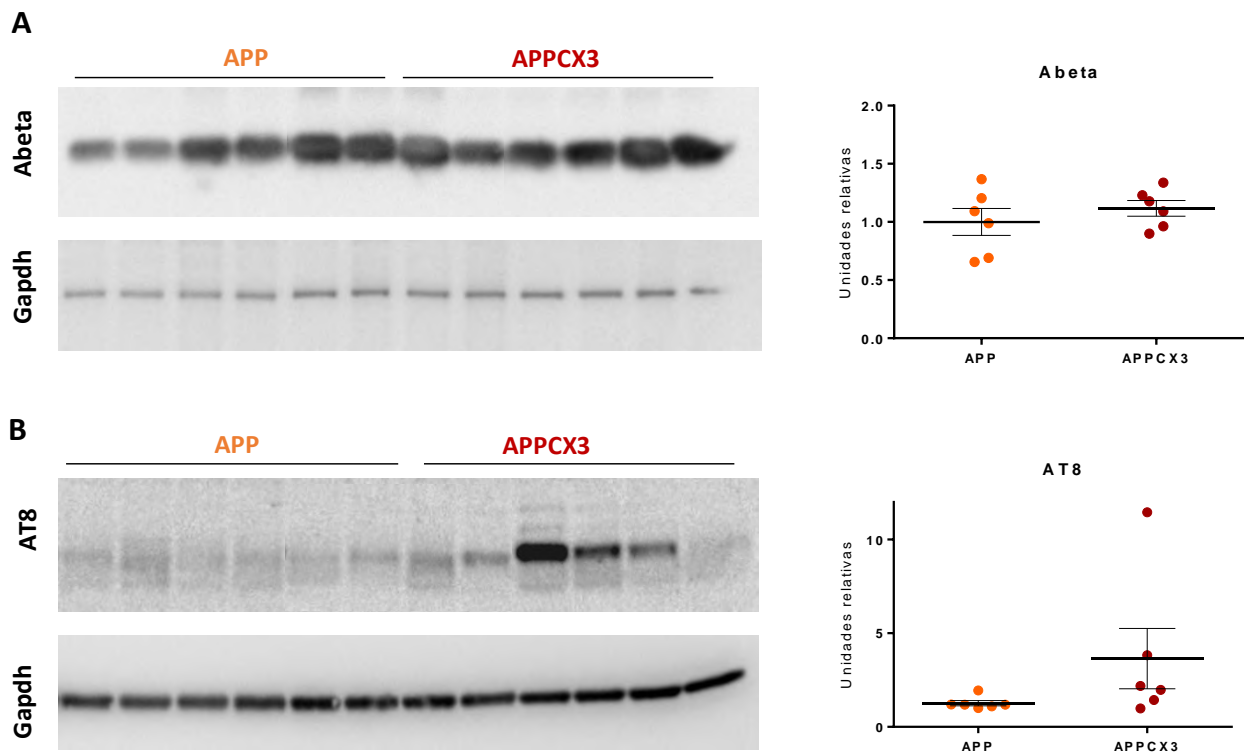
**Figura D.55. Imágenes ilustrativas de la microglía hipocámpal en ratones APP, y APPCX3 alimentados de los 8 a los 12 meses con tamoxifeno oral.** Inmunohistoquímica para el marcador microglial Iba1 en ratones APP y APPCX3 de 12 meses. El tratamiento con tamoxifeno reduce el número de células microgliales y altera su disposición. Barra de escala: 200 µm.

A continuación, con el objetivo de valorar si la reducción de los niveles microgliales o/y el recambio microglial o/y la reducción de la activación microglial en los animales APPCX3 alimentados con tamoxifeno de los 8 a los 12 meses de edad afecta a la reactividad astrogliar, medimos los niveles de expresión de Gfap y Aldh111 mediante qPCR. Como esperábamos, y tal y como se muestra en la Figura D.56, en los ratones APP de 12 meses de edad se produce un aumento significativo de la expresión de Gfap y Aldh111 respecto a WT. Sin embargo, en los animales APPCX3 de 12 meses, observamos una reducción significativa de la expresión de Gfap, si bien, sigue siendo superior a los niveles de WT. Por otro lado, la expresión del marcador Aldh111 disminuye ligeramente respecto a los animales APP y no es significativamente diferente a la expresión en WT. Por consiguiente, el tratamiento crónico de depleción microglial lleva asociado una menor activación astrocítica en los animales con patología amiloide establecida.



**Figura D.56. La alimentación con tamoxifeno desde los 8 hasta los 12 meses en animales APPCX3 reduce la reactividad astrocítica.** Expresión de marcadores de astrogliosis medidos mediante qPCR y normalizados por Gapdh, en ratones WT, APP y APPCX3 de 12 meses. Los animales APPCX3 han sido sometidos a un tratamiento de 4 meses de tamoxifeno. La significancia estadística se ha analizado el test ANOVA seguida del post-test Fisher LSD. \* $p < 0,05$ .

Además, aunque de forma preliminar, hemos evaluado el contenido en Abeta y fosfo-Tau (AT8) en los animales APP y APPCX3 de 12 meses de edad mediante western-blot. Como se muestra en la Figura D.57, ni los niveles de Abeta ni de fosfo-Tau varían significativamente en los animales APPCX3 alimentados durante 4 meses con tamoxifeno, respecto a los animales APP. Es necesario realizar estudios inmunohistoquímicos para valorar si existen diferencias en el número, distribución, tamaño o circularidad de las placas en los animales APPCX3, en los que existen niveles reducidos de microglía y en los que ha tenido lugar un recambio microglial. Así mismo, es necesario valorar si la disposición microglial alrededor de las placas se mantiene en los animales APPCX3 y si las placas con una menor presencia de microglía se asocian con un aumento de neuritas distróficas AT8+.



**Figura D.57. La alimentación con tamoxifeno desde los 8 hasta los 12 meses en animales APPCX3 no altera los niveles de Abeta ni de fosfo-Tau.** Western-blot representativo y cuantificación de los niveles de **(A)** Abeta y de **(B)** fosfo-Tau (AT8), normalizados por Gapdh, en animales APP y APPCX3 tratados con tamoxifeno de los 8 a los 12 meses de edad.

Aunando los resultados de los tratamientos crónicos de depleción microglial, podemos establecer que la administración de pienso con tamoxifeno durante 4 meses mantiene unos niveles microgliales inferiores al control (Figuras D.46 A, D.49 A y D.54 A), en contraste con el tratamiento de 2 meses (Figura D.44 A), donde aún juega un papel importante el fenómeno de repoblación. Por otro lado, en los tratamientos crónicos de 4 meses (Figuras D.47 C, D.49 C D.54 C), no observamos el incremento de expresión en los marcadores de infiltración registrado tras los tratamientos agudos y el tratamiento oral de 1 mes. Esto podría deberse a que las células que inicialmente se infiltran pueden degenerar o cambiar su fenotipo, y/o a que la renovación microglial constante elimine la señal inicial de atracción de células inmunes periféricas.



## **E. Discusión**



Cada día existen más evidencias de la importancia e implicación de la microglía tanto en la homeostasis como en la patología cerebral. Hace ya más de un siglo, Río-Hortega describió la diversidad morfológica de las células microgliales (Río-Hortega, 1919), lo que sugería una alta complejidad de esta población celular. Estudios posteriores sobre su dinamismo y cambios en el estado de activación apoyan la gran heterogeneidad microglial (Stratoulis et al., 2019; Tremblay et al., 2015), e impulsan a profundizar en su caracterización. Ya a principios del siglo pasado, Alois Alzheimer identificó la presencia de microglía asociada a placa en muestras *post mortem* de cerebros de pacientes (Alzheimer et al., 1907) y, a día de hoy, no cabe duda de que la neuroinflamación es una de las características primordiales de la patología, si bien su papel aún no se concreta como beneficioso ni perjudicial. En esta línea, en los últimos años ha suscitado creciente atención la implicación de la microglía en la EA, al ser las células principales implicadas en la inmunidad innata cerebral. Su importancia queda además justificada por la asociación de numerosos polimorfismos en genes implicados en la función microglial con un mayor riesgo de padecer EA y un aumento de la severidad de la patología (Dansokho y Heneka, 2018; Lambert et al., 2013; Shao et al., 2017; Sims et al., 2017). Sin embargo, no se conocen con exactitud las funciones microgliales en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, que dependerán de numerosos factores coyunturales, entre los que se encuentran las interacciones con el resto de células del SNC. Por tanto, resulta fundamental definir los perfiles funcionales (neuroprotector, neurotóxico y/o disfuncional) de la microglía con la progresión de la patología, a fin de poder proponer estrategias terapéuticas exitosas que, en un futuro próximo, palien la evolución de la enfermedad.

La mayoría de los estudios sobre el papel de la microglía en la EA se han realizado en modelos animales, lo que conlleva importantes limitaciones. Por un lado, no existen modelos fiables que reproduzcan la LOAD, que sin duda es la de mayor incidencia. Por otro lado, por motivos técnicos y económicos, es común utilizar animales de mediana edad (12 meses), lo que no permite evaluar los efectos del envejecimiento avanzado, principal factor de riesgo para la LOAD. Además, existen claras diferencias entre el fenotipo microglial descrito en modelos murinos transgénicos y el caracterizado en muestras humanas *post mortem* de pacientes, que padecen otras comorbilidades. Todo ello, supone un reto a la hora de descifrar el papel de la microglía en la patología de Alzheimer (Gutierrez y Vitorica, 2018; Scarce-Levie et al., 2020).



## 1. REACTIVIDAD Y/O DEGENERACIÓN MICROGLIAL

En nuestro grupo de investigación, hemos caracterizado en detalle la respuesta microglial tanto en modelos murinos como en muestras de pacientes de Alzheimer. Nuestros resultados revelan que en el modelo amiloidogénico APP/PS1, la microglía se activa desde edades tempranas alrededor de las placas de Abeta y, con el progreso de la patología, la activación se expande por todo el parénquima cerebral, debido a la acumulación en el mismo de formas solubles de Abeta oligomérico (Jimenez et al., 2008, 2011). Sin embargo, en el hipocampo de pacientes de Alzheimer, donde predomina la patología Tau, la activación microglial es muy limitada y se manifiesta únicamente rodeando las placas amiloides. Además, se produce un proceso de degeneración microglial mediado por formas solubles de Tau fosforilado (Sanchez-Mejias et al., 2016; Streit et al., 2020). En el presente Trabajo, demostramos que la respuesta microglial es más compleja, y no está mediada exclusivamente por el efecto directo de la patología Abeta o de la patología Tau. La caracterización de muestras hipocampales de los ratones transgénicos APP, ThyTAU22 y TAU P301S nos ha permitido determinar que tanto en modelos amiloidogénicos (APP y APP/PS1) como en modelos de tauopatía (TAU P301S) se produce una activación microglial mediada por agregados y formas solubles de Abeta (Jimenez et al., 2008), y por ciertas formas de Tau (Romero-Molina et al., 2018). Sin embargo, otras formas de Tau parecen no ser suficientes para activar las células microgliales, sino que más bien contribuyen a reducir su viabilidad, como ocurre en el modelo ThyTAU22 y en las muestras de hipocampo de pacientes de Alzheimer (Romero-Molina et al., 2018; Sanchez-Mejias et al., 2016). Recientemente, Dujardin et al. (2020) han descrito una elevada heterogeneidad en la hiperfosforilación, agregación y propagación de Tau aislado de muestras *post mortem* de pacientes, lo que refleja la complejidad de su estudio en la EA. Concretamente, ciertas modificaciones post-traduccionales en Tau se relacionan con una mayor capacidad de propagación y, a su vez, con un mayor declive cognitivo, aunque no correlacionan con la presencia de células microgliales fagocíticas (CD68+) (Dujardin et al., 2020).

La **activación microglial** asociada a la EA se ha descrito en numerosos estudios, aunque bajo este término se engloban diferentes perfiles funcionales que explicarían los distintos papeles de la microglía en la progresión de la patología (Hashemiaghdam y Mroczek, 2020). Debido a que la hipótesis de la cascada amiloide es, a día de hoy, la más aceptada para explicar los eventos patológicos de la EA, la caracterización de la respuesta microglial en modelos amiloidogénicos es más amplia que en modelos de tauopatía, motivo por el que clásicamente se ha asociado la activación microglial con la patología Abeta (Karran y De Strooper, 2016; Selkoe y Hardy, 2016). Sin embargo, no existe un único componente patológico responsable de la activación de células microgliales y no es posible determinar categóricamente si la activación microglial es superior bajo el estímulo de Abeta o de Tau. En este sentido, los análisis realizados en este Trabajo sobre la activación microglial en los modelos APP y TAU

P301S dan lugar a resultados contrapuestos dependiendo de la región cerebral estudiada. En hipocampo, los niveles de expresión de ARNm de los marcadores de activación microglial Cd45, Cd68, Trem2 y Clec7a son considerablemente más elevados en el modelo TAU P301S que en el APP. Sin embargo, al aislar la microglía activa del tejido cortico-hipocampal en ambos modelos, obtenemos una mayor proporción de células microgliales activas (CD11b+CD45+Clec7a<sup>high</sup>) en el modelo APP. Para explicar este hecho debemos tener en cuenta que, como se observa en nuestras imágenes de inmunohistoquímica, en el modelo amiloidogénico la microglía activa se sitúa alrededor de las placas de Abeta, que se distribuyen de manera relativamente homogénea entre la corteza y el hipocampo del ratón. Sin embargo, en el modelo TAU P301S, la microglía activa se localiza principalmente en hipocampo, que es donde se acumula la patología Tau. Por ello, es lógico que, aunque el porcentaje de células microgliales activas sea superior en el modelo amiloidogénico, la expresión absoluta de marcadores de reactividad microglial sea mayor en el modelo TAU en los estudios en los que nos restringimos exclusivamente al tejido hipocampal. En cualquier caso, la distribución de la microglía activa correlaciona con la localización de la patología, independientemente de que sean agregados de Abeta o de Tau.

A pesar de que, como hemos comentado, la respuesta microglial en modelos Tau ha sido menos caracterizada, numerosos estudios sugieren que la exclusiva presencia de Tau induce activación microglial. En este sentido, se ha descrito una importante reactividad microglial en cerebros de pacientes con diferentes tauopatías, como la parálisis supranuclear progresiva (Fernández-Bohrán et al., 2011; Gerhard et al., 2004; Ishizawa y Dickson, 2001), la demencia frontotemporal (FTD, de sus siglas en inglés) (Bellucci et al., 2011), la degeneración corticobasal (Gerhard et al., 2004; Henkel et al., 2004), y la propia EA (Sheffield et al., 2000). De hecho, los estudios GWAS en la FTD revelan una clara asociación entre genes implicados en la función microglial y la progresión de esta patología (Broce et al., 2018). Adicionalmente, también se produce microgliosis en modelos animales de rata que expresan la forma humana no-truncada de Tau (Stozicka et al., 2010; Zilka et al., 2009), y en los ratones transgénicos Thy1-P301S (Bellucci et al., 2004) y rTg4510 (Wang et al., 2018; Wes et al., 2014). Es más, la ablación genética de Tau previene la activación microglial (Maphis et al., 2015). Paralelamente, se ha propuesto que la microglía podría estar implicada en la propagación de depósitos de Tau (Asai et al., 2015; Bolós et al., 2015; Hopp et al., 2018), lo que a su vez constituye un elemento de retroalimentación positiva para la reactividad microglial.

En este Trabajo, hemos descrito un importante y significativo aumento en los marcadores de activación microglial en los animales envejecidos TAU P301S, que ha sido corroborado mediante estudios inmunohistoquímicos. Sin embargo, curiosamente, en el extracto total de hipocampo de los modelos APP y TAU P301S no observamos disminución, sino aumento, en la expresión de marcadores homeostáticos microgliales, como Cx3cr1, marcador que sí desciende significativamente en la microglía

activa aislada mediante FACS de los mismos modelos. El aumento en la expresión total de CX3CR1 podría deberse a un mayor número de células microgliales totales consecuencia de un proceso de proliferación. En este sentido, la proliferación microglial a partir de células microgliales maduras, y no precursoras, ya ha sido descrita en modelos de EA (Askew y Gomez-Nicola, 2018; Baglietto-Vargas et al., 2017). Además, nuestro grupo de investigación ha descrito que la expresión de Cx3cr1 aumenta en astrocitos activos (Sanchez-Mico, 2019), lo que también podría ser responsable del incremento de este marcador observado en tejido hipocampal total. En contraste, el aislamiento específico de microglía activa y su análisis mediante microarrays de hibridación confirma, tal y como ha sido descrito anteriormente (Keren-Shaul et al., 2017), que la activación microglial cursa con una disminución en la expresión de genes homeostáticos, entre los que se incluye Cx3cr1.

La identificación de los receptores implicados en la interacción microglial con Tau y el mecanismo subyacente al proceso de activación microglial son cuestiones sin resolver. El incremento en la expresión de Trem2 sugiere que la activación microglial podría estar mediada vía Trem2, a pesar de que hasta ahora no se ha descrito ninguna interacción de las formas de Tau con dicho receptor. Además, el aumento de expresión de CD68 que se produce en estos animales refleja un aumento de la actividad fagocítica de esta microglía activa, lo que sugiere que podría estar internalizando formas patológicas de Tau. En el presente Trabajo, hemos planteado diferentes ensayos *in vitro* para estudiar los posibles mecanismos de activación microglial y los receptores implicados en el proceso. Sin embargo, nos hemos encontrado con diversos problemas técnicos y metodológicos que nos han impedido obtener resultados concluyentes. Entre ellos, destacamos que las fracciones solubles procedentes de los animales TAU P301S envejecidos tienen bajo contenido en fosfo-Tau y, probablemente debido a ello, no son inmunogénicas *in vitro* (resultados no mostrados).

Sin embargo, Bolós et al. (2015) han descrito, en muestras *post mortem* de pacientes de EA, células de microglía que colocalizan con varias formas de Tau y han demostrado que la microglía es capaz de fagocitar Tau soluble e insoluble tanto *in vitro* como *in vivo*. Basándose en estos resultados, estos mismos autores proponen posteriormente que la microglía podría fagocitar Tau extracelular a través del receptor Cx3cr1, ya que la secuencia aminoácida de Tau presenta un 37% de homología con la secuencia de Cx3cl1; aunque este mecanismo se vería dificultado en estados tardíos de la EA debido a la hiperfosforilación de Tau y a la sobre-expresión de Cx3cl1 (Bolós et al., 2017). Por otro lado, Nagamine et al. (2016) sugieren que existe una interacción entre los ovillos neurofibrilares y las células microgliales a través del receptor CD33, que es capaz de reconocer los residuos de ácido siálico que aparecen en los NFTs de enfermos de Alzheimer.

Contrariamente a lo descrito en modelos amiloidogénicos (Jimenez et al., 2008) y en el modelo TAU P301S (Romero-Molina et al., 2018), en otros modelos de patología Tau como el ThyTAU22 y en pacientes de Alzheimer (Sanchez-Mejias et al., 2016), la activación microglial es muy limitada. En este sentido, se han descrito mediante estudios de secuenciación en célula única, diferentes respuestas de activación microglial en distintos modelos de patología Tau (Friedman et al., 2018). A pesar de ello, las razones subyacentes a esta variabilidad en la respuesta microglial no se conocen, si bien podrían estar relacionadas con las especies de Tau presentes en cada modelo. Aunque no está claramente establecido cuáles son las principales formas de Tau involucradas en la activación microglial, algunos autores proponen que Tau truncado (Kovac et al., 2011) o la propia proteína Tau sin fosforilar (Perea et al., 2018) son suficientes para activar a las células microgliales mediante la vía de señalización de las MAP quinasas. En contraste, otros estudios plantean que son sólo las formas fosforiladas y oligoméricas de Tau, pero no las monoméricas, las que desencadenan la activación microglial (Morales et al., 2013; van Olst et al., 2020). En este sentido, se ha descrito colocalización de microglía activa con oligómeros de Tau, tanto en modelos de tauopatías como en pacientes de EA y FTD (Nilson et al., 2017). En cualquier caso, las especies solubles de Tau, más que los NFTs, deben ser las responsables de la activación microglial, ya que la microgliosis precede a la formación de los ovillos (van Olst et al., 2020; Yoshiyama et al., 2007). Al comparar los modelos ThyTAU22 y TAU P301S, observamos una mayor fosforilación de Tau en el modelo TAU P301S, lo que en principio podría explicar la exacerbada microgliosis que existe en el hipocampo de dicho modelo. A ello se suma una mayor acumulación de Tau total, probablemente debida al promotor priónico que precede al transgén insertado, en comparación con el promotor Thy1, específico neuronal, presente en el modelo ThyTAU22.

Paralelamente, no debemos olvidar que en la EA están presentes otros estímulos que podrían contribuir a la activación microglial. Además de la patología Abeta, que tras la interacción con diferentes receptores microgliales, media la activación de estas células (Doens y Fernández, 2014), existen numerosos mecanismos por identificar que participan en la respuesta inflamatoria. Un ejemplo de ello sería la degeneración del locus coeruleus, una estructura afectada en estadios asintomáticos de la EA, y cuya principal función es la producción de noradrenalina y neurotransmisores anti-inflamatorios (Šimić et al., 2017). El locus coeruleus posee amplias proyecciones hacia diferentes estructuras cerebrales, por lo que se ha postulado que su degeneración facilita la reacción inflamatoria en la EA (Heneka et al., 2010; Kelly et al., 2017). Por otra parte, dada la comunicación entre la inmunidad periférica y el SNC, procesos inflamatorios crónicos como infecciones sistémicas o como la obesidad podrían contribuir a la reactividad microglial en la EA (Heneka et al., 2015; Holmes et al., 2009). Como caso concreto, se ha demostrado que la inducción de osteoartritis en ratones con patología amiloide exagera la activación glial (Kyrkanides et al., 2011).

Por otro lado, cabe considerar los estudios que apuntan a que las especies de Tau podrían ser **tóxicas para la microglía** (Sanchez-Mejias et al., 2016; Streit et al., 2009), impidiendo que ejerza su función de fagocitosis y degradación de agregados. Se han descrito distintas especies solubles de Tau responsables de activar los mecanismos de neurotoxicidad (Busche et al., 2019; Kopeikina et al., 2012), por lo que cabría esperar que también afectaran a la supervivencia microglial. Nuestros resultados muestran cómo las fracciones solubles procedentes de ratones ThyTAU22 de avanzada edad reducen la viabilidad de cultivos microgliales induciendo un mecanismo apoptótico.

Siguiendo las evidencias descritas sobre el mecanismo de toxicidad de Tau en neuronas, que proponen que se debe a una alteración de la distribución mitocondrial (Cheng y Bai, 2018; Guo et al., 2020; Kopeikina et al., 2011), la toxicidad microglial observada también podría estar mediada por una función mitocondrial aberrante (Agrawal et al., 2020). En este sentido, nuestros resultados demuestran la importancia del metabolismo mitocondrial en la microgliosis crónica. Sin embargo, las medidas de los niveles de ATP en cultivos microgliales tratados con las fracciones de fosfo-Tau tóxicas no revelan una depleción de las reservas energéticas y la distribución mitocondrial en células microgliales podrían no ser tan relevante como en neuronas, donde la morfología soma-axón hace que una distribución aberrante sea crítica. Por otra parte, teniendo en cuenta que elevados niveles de calcio mitocondrial correlacionan con la toxicidad neuronal en el modelo amiloidogénico 5xFAD (Calvo-Rodriguez et al., 2020) y que los estudios de Xie et al. (2017) demuestran que el tratamiento de cultivos microgliales con Abeta induce un aumento de la concentración de calcio mitocondrial y la apoptosis de dichas células, sería interesante valorar si dicho mecanismo está también presente en la toxicidad inducida por Tau. En cualquier caso, a día de hoy, queda pendiente determinar qué vías median la toxicidad de Tau sobre la microglía.

Es probable que los elevados niveles de Tau fosforilado (AT8+) presentes en las fracciones solubles sean los mediadores de esta degeneración microglial, ya que la depleción específica de las formas fosforiladas solubles de Tau revierte la toxicidad (Sanchez-Mejias et al., 2016). Esto se corrobora además por la ausencia de toxicidad microglial de las fracciones solubles con bajos niveles de AT8 (como las procedentes de ratones ThyTAU22 jóvenes), incluso aunque posean un alto contenido en citoquinas pro-inflamatorias (como las S1 de ratones TAU P301S envejecidos). Sin embargo, la fracción obtenida tras la solubilización de agregados procedentes de animales TAU P301S envejecidos, con alto contenido en AT8+, no produce toxicidad *in vitro*, lo que podría indicar que las formas solubles fosforiladas tóxicas de Tau deben presentar además determinados estados conformacionales. Paralelamente, las formas agregadas de Tau no son tóxicas para la microglía, como demuestran nuestros experimentos tras tratar la microglía *in vitro* con las fracciones sarkosyl insolubles procedentes tanto de ratones TAU P301S envejecidos (este Trabajo; Romero-Molina et al., 2018) como de hipocampo de pacientes con EA (Sanchez-Mejias et al., 2016). En conjunto, estos resultados sugieren que la formación de NFTs supone

un mecanismo de protección no sólo frente a neurodegeneración (Santacruz et al., 2005), sino también contra la disfuncionalidad microglial.

En conclusión, el efecto de Tau sobre la microglía es diferente según el modelo transgénico elegido, lo que se debe a una variable acumulación, fosforilación y agregación de Tau. Esto debe ser tenido en cuenta a la hora de elegir el modelo Tau de estudio, de manera que guarde las mayores similitudes posibles con la patología Tau existente en los pacientes de EA a la vez que sea apropiado para la hipótesis a ensayar. Para ello, resulta indispensable conocer las formas de Tau más inmunogénicas versus las más tóxicas, lo que nos permitirá en un futuro describir detalladamente la interacción entre la patología Tau y la microglía, así como los mecanismos y consecuencias de su activación y/o degeneración.

## 2. PERFIL TRANSCRIPTÓMICO Y FUNCIONAL DE LA MICROGLÍA ACTIVA

Aunque la activación microglial se ha descrito ampliamente en la EA (Belluci et al., 2004, Hasen et al., 2018, Wang et al., 2018), no se conocen con exactitud ni el fenotipo ni la función de estas células con el avance de la patología, que probablemente dependan de la región cerebral considerada y de la progresión de las patologías Abeta, Tau y neurodegenerativa. En este Trabajo, hemos descrito la activación microglial que se produce en el cerebro de ratones transgénicos APP y TAU P301S de edad avanzada. Conocer detalladamente el perfil genético y funcional de esta microglía activa supone un importante avance para proponer dianas terapéuticas nuevas y eficaces. Además, la identificación de microglía activa en el modelo TAU P301S (en contraste con lo que ocurre en el modelo ThyTAU22, con ausencia de activación), nos ha permitido comparar la reactividad microglial diferencial frente a las patologías Abeta y Tau. A este respecto, un análisis transcriptómico muy reciente compara el modelo amiloidogénico APP<sup>swe</sup>/PS1L166P con el modelo ThyTAU22, y asocia ciertos genes de activación microglial, relacionados con un mayor riesgo de padecer EA, exclusivamente a la patología Abeta (Sierksma et al., 2020). De esta forma, establecen que únicamente la patología Abeta es responsable del cambio transcriptómico microglial en la EA, que se produciría con anterioridad al establecimiento de la patología Tau. Estos resultados deberían ser reconsiderados, teniendo en cuenta la importante activación microglial que se produce en otros modelos de tauopatía, como en el hipocampo de ratones TAU P301S.

Aunque no está demostrado que la activación microglial sea consecuencia directa de las patologías Abeta y Tau, está claro que la ruptura de la homeostasis cerebral debe ser significativa para que tenga lugar esta reactividad. Como prueba de ello, el estudio de microglía procedente de animales APP y TAU P301S de 3 meses de edad no revela diferencias transcriptómicas significativas respecto a los animales WT, lo que refleja que la población microglial DAM no aparece hasta que se inicia la patología, en concordancia con lo descrito para el modelo 5xFAD (Keren-Shaul et al., 2017). En contraste, cuando comparamos la microglía aislada de ratones APP y TAU P301S de edades avanzadas con la microglía de WT, encontramos numerosos genes expresados diferencialmente. Incluso la población microglial menos activa (Clec7a<sup>low</sup>) aislada de los ratones APP y TAU P301S envejecidos también presenta diferencias significativas de expresión génica respecto a WT, lo que avala la existencia de una población microglial transitoria (Keren-Shaul et al., 2017; Nguyen et al., 2020). Por tanto, nuestros datos apoyan la existencia de diferentes poblaciones microgliales con distinto grado de reactividad (Hashemiaghdam y Mroczek, 2020; Lynch, 2009; Mathys et al., 2017), en concordancia con un gradiente progresivo de activación.

El análisis de rutas enriquecidas en la microglía activa (Clec7a<sup>high</sup>) en los modelos APP y TAU P301S respecto a WT, a partir de la expresión génica diferencial, nos ha permitido identificar un



enriquecimiento en la firma genética DAM (Keren-Shaul et al., 2017) y, más concretamente, en el set génico **MGnD** (firma común a enfermedades neurodegenerativas; Krasemann et al., 2017). El aumento en la expresión de los genes incluidos en este set, como *Clec7a*, *Spp1*, *Axl*, *Itgax*, *ApoE*, etc, ha sido previamente descrito en otros modelos con patología amiloidogénica, como el modelo 5xFAD (Keren-Shaul et al., 2017; Wang et al., 2015), el PS2APP (Meilandt et al., 2020; Srinivasan et al., 2016) o el APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> (Krasemann et al., 2017; Orre et al., 2014), y con patología Tau (TAU P301L y TAU P301S) (Friedman et al., 2018). Además, el aumento observado en la expresión de *Trem2* podría reflejar la transición del estadio 1 al estadio 2 DAM, en la que este receptor es el elemento contributivo esencial (Keren-Shaul et al., 2017). Paralelamente, nuestros resultados ilustran la disminución de la expresión de genes homeostáticos asociada al fenotipo DAM (Butovsky et al., 2015; Colonna y Wang, 2016; Keren-Shaul et al., 2017): *Tmem119*, *P2ry13*, *P2ry12*, *Cx3cr1*, *Csf1r*, entre otros. Es decir, se reduce la expresión de genes que diferencian a la microglía de otros macrófagos residentes en tejidos y le otorgan funciones especializadas para el SNC (Friedman et al., 2018). Siguiendo la hipótesis planteada en el campo, la inhibición de la ruta de TGF $\beta$  parece ser la responsable de la disminución de la expresión de factores de transcripción (como *Pu.1* y *Mef2a*) indispensables para la expresión de los genes microgliales homeostáticos (Butovsky et al., 2014; Krasemann et al., 2017).

Por tanto, el perfil génico de la microglía activa aislada de nuestros modelos Abeta y Tau corresponde al fenotipo molecular inducido por neuronas apoptóticas (Krasemann et al., 2017), y difiere de la activación clásica M1. De hecho, hemos observado un enriquecimiento no sólo de la ruta KEGG “Enfermedad de Alzheimer”, sino también de las rutas de otras patologías neurodegenerativas como “Enfermedad de Huntington” y “Enfermedad de Parkinson”. En este sentido, hemos comprobado que también aumenta significativamente el módulo génico “**asociado a neurodegeneración**” definido por Friedman et al. (2018) en base a estudios transcriptómicos realizados en ocho modelos diferentes de neurodegeneración. Un 75% de los genes incluidos en este módulo están anotados, mediante ontología génica, en procesos relacionados con la membrana plasmática y el espacio extracelular, lo que sugiere que la microglía está cambiando su forma de interactuar con el ambiente (Friedman et al., 2018). Sin embargo, esta microglía activa también presenta un incremento en la expresión de genes asociados al fenotipo inflamatorio general y, por consiguiente, registramos un enriquecimiento del proceso biológico de respuesta a interferón y, por su parecido, de la respuesta a virus. Además, comparte el perfil de expresión con modelos de respuesta a LPS. Todo ello concuerda con otros modelos de neurodegeneración, donde existe un enriquecimiento en estos módulos, pero siempre menor al obtenido para el módulo “asociado a neurodegeneración” (Friedman et al., 2018). La inducción de dichos módulos también es relativamente dependiente de *Trem2*, ya que la expresión de los genes integrantes disminuye considerablemente en el modelo *Trem2*KO-5xFAD (Friedman et al., 2018).

La comparación de los perfiles genéticos microgliales obtenidos en modelos animales con los análisis realizados en **humanos** (controles y pacientes con EA) es complicada debido a varias limitaciones. Por un lado, en humanos el análisis se realiza normalmente en tejido *post mortem*, lo que impide aislar las células microgliales y evaluar estadios iniciales de la patología. Por otro lado, el estrés inducido durante el tiempo *post mortem* podría inducir cambios en el perfil inflamatorio microglial. A pesar de todo ello, el módulo génico “asociado a neurodegeneración” está enriquecido en tejido total de pacientes con EA respecto a individuos control (Friedman et al., 2018), y las nuevas técnicas de secuenciación de núcleos están empezando a aportar información más detallada al respecto (Del-Aguila et al., 2019; Gerrits et al., 2020; Mathys et al., 2019; Olah et al., 2018). Mathys et al. (2019) describen que los cambios específicos de cada tipo celular ocurren en los estadios más iniciales de la EA, mientras que en estadios tardíos los genes sobreexpresados son comunes para las distintas poblaciones celulares y están implicados en una respuesta de estrés global. Más concretamente, el estudio transcriptómico realizado en microglía procedente de cerebros humanos envejecidos y con patología de Alzheimer revela una disminución en estas células de la expresión de genes que conforman la ruta de señalización de TGF $\beta$  (KEEG pathway) (Olah et al., 2018) y un aumento de expresión de genes que aumentan la susceptibilidad de padecer LOAD (CD33, SORL1, Trem2) (Mathys et al., 2019; Olah et al., 2018). Además, aunque en discrepancia con los datos de Zhou et al. (2020), nuestro análisis transcriptómico de marcadores microgliales homeostáticos (como P2ry12 y Cx3cr1) en muestras de pacientes de EA, muestra una disminución de su expresión (Muñoz-Castro, 2021), lo que concuerda con lo observado en la microglía activa aislada de nuestros modelos murinos.

Recientemente, Nguyen et al. (2020) han determinado cuatro clústeres distintos de microglía en cerebros de pacientes de Alzheimer: homeostática, distrófica, microglía asociada a respuesta a Abeta y microglía migratoria. La proporción de cada subgrupo varía en función de las patologías Abeta y Tau así como de los genotipos ApoE y Trem2. Además, también es determinante la historia clínica de cada paciente y las diferencias entre las distintas regiones cerebrales, aún dentro del mismo individuo (Böttcher et al., 2019; Nguyen et al., 2020). En esta línea, los estudios transcriptómicos en modelos animales también muestran claras diferencias en los perfiles de expresión génica de microglía aislada de cerebelo, corteza, estriado o hipocampo (Grabert et al., 2016).

Sin embargo, es conveniente ser cautelosos en el análisis transcriptómico de núcleos aislados de muestras humanas ya que puede existir una pérdida importante de la información asociada a la técnica (Thrupp et al., 2020). Una mejor alternativa sería analizar células microgliales únicas tras su aislamiento, lo que requiere el uso de tejido fresco, difícil de obtener en humanos. Recientemente, Olah et al. (2020) han confirmado la validez y eficacia del aislamiento de microglía tanto de autopsias como de tejido quirúrgico humano, identificando nueve clústeres microgliales diferentes. Dos de ellos son considerados microglía homeostática, mientras que los demás están enriquecidos en procesos relacionados con la

respuesta inmune (respuesta a INF, estrés celular, respuesta anti-inflamatoria o ciclo celular). Sin embargo, la firma génica DAM no está claramente asociada a ningún clúster, sino que se distribuye entre los diferentes subgrupos microgliales humanos. Es necesario refinar las técnicas transcriptómicas en muestras humanas para poder comparar fielmente los resultados obtenidos con los análisis realizados en modelos murinos.

Por otro lado, para establecer con precisión las **funciones** de la microglía activa que hemos aislado de los modelos APP y TAU, serían necesarios estudios adicionales utilizando diferentes aproximaciones experimentales, como la secuenciación de célula única, que permitiría clasificar diferentes subpoblaciones microgliales. Además, sería de interés realizar un análisis longitudinal que incluyese animales en diversos estadios de progresión de la patología. Se han realizado estudios de este tipo en un modelo de ratón que presenta neurodegeneración CK-p25, similar a la producida en modelos de Alzheimer. En dichos ratones, se produce una activación microglial secuencial paralela a la muerte neuronal que se clasifica en siete estados de activación, todos diferentes al de la microglía aislada de cerebros control (Mathys et al., 2017). Aunque en los primeros estadios de la patología se produce una clara proliferación microglial, ésta desaparece en las fases más avanzadas y es sustituida por microglía con aumento de expresión de genes relacionados con la respuesta inmune (como respuesta a interferón y defensa frente a virus), lo que concuerda con nuestros resultados en ratones con patología Abeta y Tau establecidas. En la misma línea, estos autores también observan un aumento en la expresión de genes implicados en la cascada del complemento (C3, C4b, Cfb) específico del clúster microglial asociado a los estadios tardíos, coincidiendo también con nuestros resultados en ratones modelo de EA.

Por otro lado, también se ha secuenciado microglía aislada de ratones con tauopatía (rTg4510) a diferentes edades (Rexach et al., 2020; Wang et al., 2018). Wang et al. (2018) proponen que, a pesar de existir diversos fenotipos microgliales con el progreso de la patología, la proporción de genes diferencialmente expresados asociados a respuesta M1 y M2 es similar en todos los grupos descritos, indicando que no existe una polarización radical en ningún momento de la patología. Sin embargo, Rexach et al. (2020) establecen una clara transición fenotípica conforme progresa la patología y describen que, en edades tempranas, se produce un enriquecimiento de la respuesta a INF tipo 1, con un aumento de la proliferación, producción de ROS y citoquinas pro-inflamatorias, mientras que en fases avanzadas con elevada neurodegeneración, predomina un fenotipo microglial de respuesta a virus, interferón tipo-2 y apoptosis.

Como ha sido descrito en numerosas ocasiones en modelos de Abeta la microglía activa se asocia a placa (Jimenez et al., 2008; Krasemann et al., 2017; Plescher et al., 2018; Yin et al., 2017), hecho que corroboramos en el modelo APP mediante la inmunotinción de microglía Trem2+/Iba1+. En contraposición, los análisis de inmunohistoquímica con el anticuerpo Trem2 en el modelo TAU P301S

muestran una distribución homogénea de la microglía activa a lo largo de todo el parénquima hipocampal. Esto podría deberse a que en dicho modelo se produce una acumulación homogénea de las neuronas con NFTs que expresan señales apoptóticas, y a que las agrupaciones de Tau en el parénquima no son de suficiente magnitud como para atraer focalmente a la población microglial de forma evidente, como hacen las placas amiloides. Sin embargo, la comparación directa entre el perfil transcriptómico de la microglía activa de los modelos APP y TAU revela un enriquecimiento de la respuesta a estímulos antigénicos en el modelo de tauopatía y un incremento significativo de la expresión de genes de histocompatibilidad (H2-Aa, H2-Ab1, H2-Eb1), lo que indica que la microglía en este modelo está recibiendo múltiples señales e interaccionando activamente con el entorno.

Nuestros resultados muestran que la activación microglial **frente a las patologías Abeta y Tau** comparte un mismo perfil metabólico y funcional. Sin embargo, aproximadamente un 50% de los genes diferencialmente expresados en la microglía Clec7a<sup>high</sup>, respecto a WT, son distintos en la microglía activa aislada del modelo APP comparado con el modelo TAU P301S. Esto parece reflejarse en muestras de pacientes de EA, dado que los estudios transcriptómicos de Nguyen et al. (2020) muestran que el porcentaje de las diferentes subpoblaciones microgliales identificadas varía considerablemente en los individuos que sólo presentan patología Abeta en comparación con los pacientes que presentan patologías Abeta y Tau. A pesar de estas diferencias transcripcionales, pocos son los procesos biológicos diferencialmente enriquecidos en la comparación directa entre el modelo APP y el modelo TAU P301S (este Trabajo; Castanho et al., 2020). La ruta más enriquecida en la microglía activa de animales APP respecto a la de TAU es la firma hipóxica (HMM), que aumenta significativamente en la microglía que rodea las placas amiloides. Sin embargo, esta hipoxia local, ya descrita anteriormente (Orre et al., 2014), no es suficiente para redirigir el metabolismo microglial, como se comentará más adelante.

Por otro lado, los procesos biosintéticos de alcoholes y esteroides también están significativamente enriquecidos en la microglía Clec7a<sup>high</sup> del modelo APP respecto al TAU P301S. El hecho de que la microglía internalice Abeta soluble mediante macropinocitosis (Mandrekar et al., 2009) podría explicar el aumento de la síntesis de esteroides para la formación de membranas. Además, se ha descrito la participación de Abeta y AICD en la regulación de rutas lipídicas y, a su vez, el metabolismo lipídico influye en el procesamiento de APP (Grimm et al., 2017) y en la degradación de Abeta (de Dios et al., 2019), pudiendo existir una retroalimentación entre ambos que explica el incremento de la expresión de genes implicados en estos procesos biológicos.

### 3. PAPEL DEL METABOLISMO OXIDATIVO EN LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL

En las circunstancias de estimulación y estrés que implican las patologías amiloidea y neurofibrilar en los modelos que hemos caracterizado, la microglía es capaz de sobrevivir y mantener su función de activación, lo que requiere una elevada actividad metabólica. Sin embargo, el metabolismo microglial en sus diferentes estados de activación es un terreno aún poco caracterizado. Los estudios realizados en macrófagos describen un metabolismo glucolítico asociado a un estado pro-inflamatorio (Diskin y Pålsson-McDermott, 2018) e investigaciones en cáncer proponen que el cambio de metabolismo de oxidativo a glucolítico anaerobio es esencial para el crecimiento tumoral en las etapas iniciales donde el medio es rico en  $O_2$  y nutrientes (Jung et al., 2019). En cultivos microgliales primarios, se ha descrito que la microglía presenta un fenotipo glucolítico en respuesta a LPS (Fodelianaki et al., 2019; Hu et al., 2020) y en cultivos de células BV2 se ha observado un aumento del consumo de glucosa y de la actividad enzimática glucolítica tras tratamientos con LPS e INF $\gamma$  (Gimeno-Bayon et al., 2014). Por tanto, el fenotipo microglial pro-inflamatorio se asocia con un metabolismo glucolítico (Orihuela et al., 2016). En este sentido, se ha descrito que la microglía que responde inicialmente a la patología Abeta podría presentar un metabolismo anaerobio que facilite un fenotipo fagocítico (Baik et al., 2019; Weichhart et al., 2015).

En contraposición, el fenotipo M2 de macrófagos está asociado con un metabolismo oxidativo que permite mantener la activación y función inmune durante periodos más prolongados de tiempo (Orihuela et al., 2016; Liu et al., 2021). Teniendo en cuenta la toxicidad del fenotipo inmune M1, es plausible considerar que la microglía, al residir en el SNC, presente de forma predeterminada una polarización predominantemente M2 (Butovsky et al., 2014). En concordancia, este Trabajo aporta de forma novedosa y trascendente, numerosas evidencias de que la activación microglial crónica en los modelos de EA se sustenta en un **metabolismo oxidativo**. Detrás de la respuesta DAM, la OXPHOS es el proceso biológico más enriquecido en la microglía Clec7a<sup>high</sup> aislada de modelos APP y TAU P301S respecto a WT. Además, esto se acompaña de un enriquecimiento significativo de la expresión de procesos biológicos relacionados, como la síntesis y ensamblaje de complejos respiratorios mitocondriales. Adicionalmente, nuestros estudios metabólicos *in vitro*, mediante ensayos de Seahorse, demuestran un aumento de la capacidad respiratoria máxima tras tratamientos prolongados con oligómeros de Abeta. De hecho, mediante diferentes aproximaciones, mostramos cómo el compromiso del metabolismo oxidativo, por ejemplo mediante una reducción de la disponibilidad de oxígeno, impide la activación microglial. Todo ello otorga un papel fundamental al metabolismo oxidativo en la respuesta de la microglía a la patología de Alzheimer. En paralelo, este pronunciado enriquecimiento de la OXPHOS también tiene lugar en microglía aislada de otros modelos de EA, como el modelo amiloidogénico 5xFAD (March-Diaz et al., aceptado en Nature Aging) y en modelos de esclerosis lateral amiotrófica (Chiu et al., 2013).

Las mitocondrias tienen un rol fundamental en condiciones variables de nutrientes, permitiendo una adaptación rápida a la demanda bioenergética a través de su dinámica de fusión y fisión. La inducción de la fosforilación oxidativa en células inmunes está acompañada de un proceso de **elongación mitocondrial** (Buck et al., 2016; Li et al., 2020; Rambold y Pearce, 2018). Teniendo en cuenta los resultados de Katoh et al. (2017), dicha elongación, al menos *in vitro*, es dependiente de los microtúbulos, ya que el tratamiento de los cultivos microgliales con nocodazole, un inhibidor microtubular, impide la elongación mitocondrial. Nuestros resultados de microscopía electrónica, obtenidos en colaboración con la Dra. Antonia Gutiérrez (March-Díaz et al., aceptado en Nature Aging), muestran que en el hipocampo de ratones APP/PS1 las mitocondrias de la microglía cercana a las placas de Abeta, pero no las de la microglía alejada de las mismas, presentan morfología elongada. Esto confirma que tiene lugar una reprogramación metabólica microglial hacia un metabolismo oxidativo en respuesta a los depósitos amiloides. En futuros experimentos, sería de interés corroborar estos resultados en el modelo TAU P301S.

Por otro lado, cabe considerar el hecho de que la microglía asociada a placa y la microglía que responde a la tauopatía se enfrenten a situaciones de restricción de nutrientes y/u O<sub>2</sub> que también podrían ser inductoras de su reprogramación hacia un metabolismo oxidativo, como ocurre para las células tumorales (Li et al., 2017). En este Trabajo, hemos demostrado que la microglía activa localizada cerca de las placas amiloides expresa marcadores de hipoxia, lo que sugiere que en las regiones adyacentes a dichos depósitos proteicos se produce una disminución de la disponibilidad de oxígeno. En paralelo, en el hipocampo de ratones envejecidos TAU P301S, la excesiva activación microglial existente podría inducir una competición por los recursos metabólicos y originar un ambiente pobre en nutrientes. En este sentido, se ha descrito que en las células sometidas a estrés nutricional, la elongación mitocondrial protege a estos orgánulos de la mitofagia y maximiza la producción de ATP, asegurando así la viabilidad celular en un contexto de privación de recursos energéticos (Gomes et al., 2011; Li et al., 2017; Rambold et al., 2011; Rambold y Pearce, 2018). Además, esta elongación mitocondrial facilita el ensamblaje de complejos respiratorios, lo que fomenta la OXPHOS (Li et al., 2017). En definitiva, nuestros resultados *in vivo* demuestran que la elevada demanda metabólica requerida para la reactividad microglial crónica induce un metabolismo oxidativo para mantener la supervivencia celular.

Sin embargo, si el entorno es demasiado hostil y la privación de recursos es excesiva, como podría ocurrir en el cerebro de pacientes de EA con alteraciones vasculares u otras comorbilidades, las células microgliales reprogramadas hacia un metabolismo oxidativo podrían sufrir daño mitocondrial. De hecho, mediante microscopía electrónica, es posible distinguir distintos fenotipos entre la microglía activa (CD45+) asociada a placas, diferenciándose microglía más clara (con baja electrodensidad), microglía intermedia (con electrodensidad moderada), y microglía oscura (con elevada electrodensidad) (Nuñez-Díaz, 2019). La microglía oscura se localiza exclusivamente asociada a los depósitos amiloides, no en

regiones lejanas a placas, y se caracteriza por presentar fagolisosomas en su interior, cisternas del RER dilatadas y un núcleo más electrodensito y con mayor cantidad de heterocromatina (Nuñez-Díaz, 2019). Un elevado aumento de los procesos oxidativos podría explicar y contribuir al fenotipo adquirido por la microglía oscura, denominada recientemente en el campo como “dark” microglía (Bisht et al., 2016; St-Pierre et al., 2020). Para validar esta hipótesis, se requieren futuros experimentos que permitan medir el estrés oxidativo y los procesos metabólicos diferenciales en las diversas subpoblaciones microgliales asociadas a placa. Sin embargo, debemos tener en cuenta que es probable que la “dark” microglía esté dañada y no sobreviva al aislamiento mediante citometría de flujo y, por tanto, no veamos reflejado su perfil transcriptómico en nuestros análisis.

En la misma línea, se ha descrito que una elongación mitocondrial aberrante, por ejemplo debida a una desregulación de DRP1, conlleva un aumento de la activación del inflammasoma NLRP3 y de la expresión de caspasa 1 en macrófagos (Park et al., 2015). Dado que en la microglía que responde a la patología de la EA se produce una activación del inflammasoma NLRP3 (Hanslik y Ulland, 2020; Ising et al., 2019; Scheiblich et al., 2017), cabe sopesar que alteraciones durante la reprogramación metabólica y la elongación mitocondrial contribuyan a dicho fenómeno. En definitiva, el metabolismo oxidativo de la microglía de los modelos de EA podría explicar otros mecanismos, previamente identificados, relacionados con la activación microglial.

Comparando nuestros datos en modelos con los resultados obtenidos en pacientes, los análisis de tomografía por emisión de positrones (PET) indican que, en el cerebro de pacientes de Alzheimer, se produce una disminución del consumo de glucosa (Chételat et al., 2020; Mosconi et al., 2008) y una bajada de las subunidades individuales de los complejos mitocondriales en tejido total (Kenney y Bennett, 2019). Estos resultados podrían, en principio, resultar discordantes con un incremento del metabolismo oxidativo microglial. Sin embargo, probablemente sean consecuencia de una menor actividad metabólica de los astrocitos, células mayoritarias en el SNC (Sanchez-Mico, 2019; Muñoz-Castro, 2021), unido a menor actividad neuronal. En este sentido, Tondo et al. (2020) acaban de demostrar mediante estudios de PET que en cerebros de pacientes de Alzheimer Familiar se produce un hipometabolismo generalizado que se manifiesta por la bajada del consumo de glucosa junto a una activación microglial, determinada por [<sup>11</sup>C]-PK11195 PET.

Aunque en condiciones homeostáticas las células microgliales metabolizan preferencialmente glucosa, presentan elevada flexibilidad metabólica (Bernier et al., 2020a; Bernier et al., 2020b). El transportador GLUT5, con alta especificidad por la fructosa, se expresa exclusivamente en células microgliales en el SNC (<https://www.brainrnaseq.org/>), si bien su contribución podría ser cuestionada dada la baja disponibilidad de fructosa cerebral (Hwang et al., 2017). Por otro lado, la expresión en la membrana



plasmática microglial de transportadores de monocarboxilatos (MCTs), de lípidos (CD36), o de glutamina (SNAT1) apuntan a que la microglía podría utilizar otras moléculas como fuentes alternativas de carbono (Bernier et al., 2020a). Sin embargo, dado que los niveles de SNAT1 (Yamada et al., 2019) y de CPT1A (Jernberg et al., 2017), enzima indispensable para el transporte de ácidos grasos a la mitocondria, son muy bajos en la microglía, es improbable que la glutamina o los lípidos contribuyan sustancialmente al metabolismo microglial. Además, no existen variaciones significativas en la expresión de ninguno de los transportadores mencionados en la microglía activa aislada de nuestros modelos de EA (datos no mostrados). En contraste, en nuestro análisis transcriptómico hemos observado que el transportador de glucosa GLUT1 (codificado por el gen *Slc2a1*) aumenta significativamente su expresión, respecto a WT, en la microglía activa aislada de los modelos APP (Fold-Change=7.07, p-valor ajustado = 0.0002) y TAU P301S (Fold-Change=2.28, p-valor ajustado = 0.021). Todo ello indica que la glucosa es el sustrato metabólico principal en la microglía activa.

En este Trabajo, hemos intentado profundizar en el perfil metabolómico de la microglía activa *in vivo* mediante estudios en colaboración con la Dra. Coral Barbas (Universidad CEU San Pablo). Sin embargo, no hemos logrado un protocolo óptimo que nos proporcione resultados fiables, a pesar de haber conseguido minimizar el tiempo de extracción de la microglía y aumentar el número de células obtenidas. Además, es posible que el simple hecho de utilizar FACS para el aislamiento microglial conlleve alteraciones metabólicas (Binek et al., 2019). Por ello, también hemos probado un sistema de aislamiento con bolas magnéticas (Miltenyi Biotec), pero no hemos logrado un enriquecimiento microglial superior al 50%, lo que consideramos insuficiente para un estudio metabólico específico de la microglía. Tras estos contratiempos, y como aproximación experimental al estudio del metabolismo microglial en la patología de Alzheimer, hemos intentado analizar la capacidad de respiración mitocondrial mediante ensayos de Seahorse en microglía aislada de los modelos animales de EA. Sin embargo, al cultivar la microglía aislada mediante FACS, observamos falta de adhesión a la placa y una morfología alterada, lo que nos hace dudar de la fiabilidad de los resultados que se obtendrían a partir de estas células en ensayos metabólicos. Para evitar los problemas asociados al aislamiento celular, hemos barajado la opción de realizar un estudio metabolómico mediante espectroscopía de protones por resonancia magnética de alta resolución (HR-MAS RMN, del inglés *High Resolution Magic Angle Spinning Nuclear Magnetic Resonance*) utilizando cerebros intactos de animales recién sacrificados. Con este fin, estamos trabajando en la puesta a punto de esta técnica en colaboración con el grupo de la Dra. Antonia Gutiérrez. En cualquier caso, somos conscientes de sus limitaciones, como que sólo puede detectar un número reducido de metabolitos y que obtendríamos datos correspondientes a tejido total, lo que implica que los resultados puedan reflejar el metabolismo de otros tipos celulares.

Por otro lado, con el objetivo de cuantificar la expresión proteica de los complejos mitocondriales y/o sus actividades enzimáticas, hemos puesto a punto una técnica de electroforesis capilar (Jess, Bio-

Technee) (ver Materiales y Métodos, Apartado C.15). Frente al protocolo clásico de western-blot, esta tecnología de elevada sensibilidad permite reducir considerablemente el volumen de muestra necesario y medir simultáneamente varios anticuerpos. Nuestros análisis preliminares muestran que existe un aumento de la expresión proteica del complejo II (SDHA) en la microglía de ratones APP de 12 meses frente a ratones WT (datos no mostrados), pero no hemos sido capaces de obtener un método de normalización proteica fiable. Por consiguiente, seguimos trabajando en la optimización de esta novedosa técnica.

### **3.1. Trem2 es esencial para la inducción del metabolismo oxidativo y la activación microglial**

Recientemente, se ha demostrado que la vía Trem2-mTOR es fundamental para el mantenimiento metabólico microglial. Ulland et al. (2017) han reportado que la ausencia de Trem2 altera la señalización vía mTOR en el modelo amiloidogénico 5xFAD y conlleva una reducción del número de mitocondrias y de los niveles de ATP microgliales. En la misma línea, estudios recientes *in vitro* confirman que tanto deficiencias en Trem2 (Piers et al., 2020) como en mTOR (Hu et al., 2020) disminuyen la capacidad respiratoria máxima microglial *in vitro*. Paralelamente se ha descrito, en ratones Trem2KO con patología amiloide, que un aumento de la reserva de ATP mediante el tratamiento con ciclocreatina mejora el metabolismo microglial y la respuesta a Abeta (Ulland et al., 2017). Por tanto, teniendo en cuenta que nuestros resultados muestran que en la microglía activa se induce la vía mTOR, y a su vez se incrementa la expresión de Trem2, podríamos afirmar que el enriquecimiento en la OXPHOS que se produce en estas células al activarse está mediado, al menos en parte, por el eje Trem2-mTOR.

Además, nuestros resultados demuestran la incapacidad de la microglía para activarse en los modelos KO y KD de Trem2, *in vitro*, corroborando la importancia de este eje en la reactividad microglial. En este caso, la interacción Abeta-Trem2 sería el estímulo inicial para la activación de esta vía de señalización, imprescindible para la fagocitosis de oligómeros de Abeta (este Trabajo) y de sinaptoneurosomas humanos (McQuade et al., 2020). Con el fin de analizar *in vivo* la capacidad microglial de fagocitar Abeta oligomérico en ausencia de Trem2, hemos realizado inyecciones intrahipocampales de Abeta oligomérico fluorescente en ratones WT y Trem2-KO. Hasta la fecha, no hemos sido capaces de identificar el Abeta oligomérico fluorescente en el interior de células de microglía Iba1+ en los animales control, por lo que seguimos trabajado en la puesta a punto del sistema. En cualquier caso, basándonos en nuestros resultados transcriptómicos de modelos murinos y en nuestros datos *in vitro*, esperamos que la microglía del modelo Trem2-KO encuentre dificultades significativas, respecto al WT, en la fagocitosis de Abeta.

### 3.2. Balance OXPHOS / HIF en la microglía asociada a placa

HIF es un factor transcripcional que juega un papel esencial en la respuesta celular a bajos niveles de oxígeno. La expresión de su subunidad  $\alpha$  es dependiente de oxígeno, mientras que su subunidad  $\beta$  se expresa de forma constitutiva (McGettrick y O'Neill, 2020). Durante los procesos inflamatorios, la generación de un entorno hipóxico y la producción de citoquinas pro-inflamatorias, como TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$ , incrementan la acumulación y activación transcripcional de HIF1 $\alpha$  (Jung et al., 2003a; Jung et al., 2003b). Además, la inducción de mTORC1 también puede promover la transcripción de HIF1 $\alpha$ , mediante la inducción de STAT3 (del inglés, *signal transducer and activator of transcription 3*) (Yokogami et al., 2000), y regular su actividad a nivel traduccional mediante la proteína S6K1 (del inglés, *ribosomal protein S6 kinase 1*) (Masoud y Li, 2015). La activación de la cascada de señalización mediada por HIF, concretamente de PDK1 (del inglés, *pyruvate dehydrogenase kinase 1*), reprime el flujo de conversión de piruvato a acetil-CoA, desviando así la fuente de carbono y reduciendo el metabolismo oxidativo (Majmundar et al., 2010).

Nuestro análisis transcriptómico muestra que en la microglía activa de los modelos amiloidogénicos coexiste un enriquecimiento del metabolismo oxidativo en paralelo con un incremento de la expresión de HIF1 $\alpha$  y otros genes de respuesta a hipoxia, respecto a la microglía WT. Por tanto, tiene lugar un balance entre ambas vías, aparentemente contradictorias. Esta discrepancia metabólica es específica de microglía asociada a placas amiloides, ya que es patente en otros modelos amiloidogénicos (5xFAD), pero no en modelos de envejecimiento, esclerosis lateral amiotrófica (March-Díaz et al., aceptado en Nature Aging) o tauopatía (este Trabajo). Por consiguiente, el ambiente pro-inflamatorio y la inducción de mTOR existentes en el modelo TAU P301S no son suficientes para inducir significativamente una respuesta a hipoxia. Sin embargo, si a este contexto se suman las alteraciones de la microvasculatura asociadas a las proximidades de las placas de Abeta, descritas tanto en cerebros de pacientes con EA como en modelos animales (Kalaria, 1997; Sweeney et al., 2018), se produce una inducción de la vía HIF. En definitiva, mientras que la OXPHOS es un rasgo común de la microglía asociada a trastornos neurodegenerativos, la combinación del metabolismo oxidativo con la expresión de HIF1 es una peculiaridad de la microglía asociada a placa que parece estar mediada por fenómenos de hipoperfusión en el parénquima local.

En los ratones con patología amiloide, es posible que leves alteraciones en el balance entre OXPHOS / HIF conlleven estrés metabólico y, como consecuencia, falta de activación o incluso muerte microglial. Sin embargo, este efecto podría compensarse por la proliferación microglial de células lejanas a placas de Abeta. Nuestros resultados muestran que existe un incremento, aunque no significativo, del número de células microgliales proliferativas (EdU+) en los animales APP respecto a WT. En concordancia, Füger

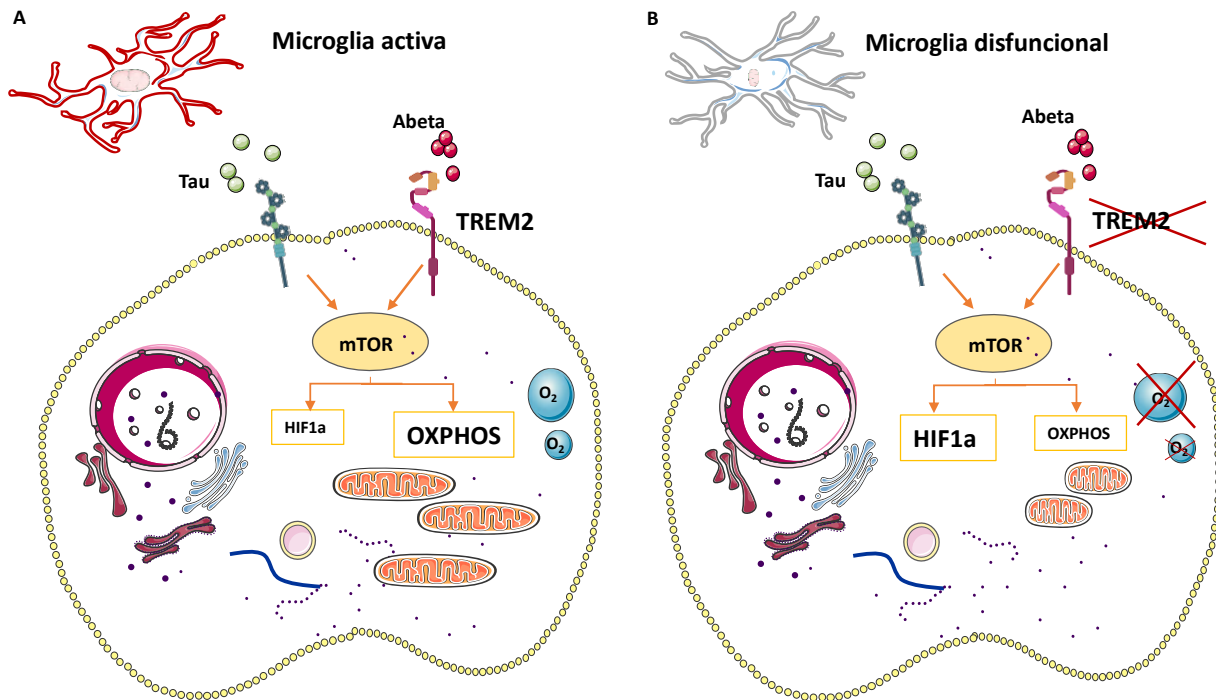
et al. (2017) han demostrado, mediante microscopía doble-fotón de seguimiento de células individuales a largo plazo, que mientras que las tasas de muerte y proliferación microglial en animales WT son similares, la proliferación de células microgliales lejanas a placas en animales APP/PS1 es tres veces superior a la tasa de mortalidad. Además, evidencian que la microglía emergente migra hacia las placas amiloides, donde las tasas de proliferación y mortalidad son similares. Por consiguiente, el incremento del número de células microgliales alrededor de los depósitos de Abeta (Baglietto-Vargas et al., 2017; Radde et al., 2006) proviene de la proliferación microglial en áreas lejanas a placas. Aunque la proliferación es un proceso asociado a la activación microglial general (Tay et al., 2017), nuestro análisis transcriptómico revela un enriquecimiento de este fenómeno en modelos con patología Abeta respecto a la patología Tau. A pesar de no ser estadísticamente significativo, este enriquecimiento podría reflejar un aumento del recambio microglial necesario en modelos amiloidogénicos como consecuencia del desbalance puntual entre el metabolismo oxidativo y la respuesta hipóxica, específico de la microglía asociada a las placas.

Sin embargo, si se reduce drásticamente la disponibilidad de oxígeno y, por tanto, se compromete llamativamente el metabolismo oxidativo, disminuye la reactividad microglial general. Prueba de ello es la disminución significativa de la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias tras tratamientos con oligómeros de Abeta, *in vitro*, cuando reducimos los niveles de oxígeno de un 21% a un 1%. De la misma forma, en los tratamientos *in vivo* en la cámara de hipoxia (9% oxígeno), el equilibrio entre la OXPHOS y la inducción de HIF1 $\alpha$  se rompe, y en consecuencia, se produce una falta de migración microglial a la placa. De hecho, la microglía aislada de ratones APP/PS1 deficientes para la proteína von Hippel-Lindau (VHL), una ubiquitina ligasa que media la degradación de HIF1 $\alpha$ , no presenta un metabolismo oxidativo (March-Diaz et al., aceptado en Nature Aging). La ausencia de VHL simula una situación de baja disponibilidad de oxígeno, con sobre-estabilización de HIF1 $\alpha$ , y en consecuencia induce la glucólisis anaerobia e inhibe la actividad mitocondrial. En concordancia con lo que ocurre en los animales APP/PS1 sometidos a hipoxia (este Trabajo), en los transgénicos APP/PS1/VHL- se produce menor activación microglial y una reducción en el área de placa cubierta por microglía (March-Diaz et al., aceptado en Nature Aging). Todo ello, refuerza la importancia del metabolismo oxidativo en la activación microglial y en la respuesta a la patología Abeta.

Del mismo modo, la reducción drástica de la disponibilidad de oxígeno en los animales TAU P301S conlleva, como se detallará más adelante, una disminución de la activación microglial, subrayando de nuevo que la OXPHOS es esencial para dicho proceso.

En resumen, la microglía activa aislada tanto de modelos amiloidogénicos como de modelos de tauopatía presenta un fenotipo asociado a inflamación, fagocitosis y neurodegeneración, sustentado por un metabolismo oxidativo. Esta reprogramación metabólica, dependiente de Trem2, conlleva un

aumento de la expresión de complejos mitocondriales y una elongación mitocondrial (Figura E.1 A). Diferencialmente, en los modelos de patología Abeta, la hipoxia local generada por los depósitos amiloides genera un equilibrio entre la OXPHOS y la respuesta a HIF en la microglía asociada a placa que permite su activación crónica. Sin embargo, alteraciones en Trem2 o una disminución de la disponibilidad de oxígeno conllevan la disrupción del metabolismo oxidativo microglial y, en consecuencia, una disminución de su capacidad de activación (Figura E.1 B).



**Figura E.1. La activación microglial crónica requiere un metabolismo oxidativo. (A)** La activación microglial crónica inducida por las patologías Abeta y Tau se sustenta en un metabolismo oxidativo (OXPHOS), mediado por la vía Trem2-mTOR, y caracterizado por elongación mitocondrial. En la microglía asociada a placa, existe un equilibrio entre la OXPHOS y la respuesta a hipoxia (HIF1). **(B)** La disrupción del metabolismo oxidativo microglial por alteraciones en Trem2 o por una disminución de la disponibilidad de oxígeno impiden la activación microglial y median la disfunción de estas células. Imagen creada utilizando elementos de SMART (Servier Medical Art), Creative Commons.

#### 4. CONSECUENCIAS DE LA DISFUNCIÓN MICROGLIAL POR PRIVACIÓN DE OXÍGENO

El cerebro, debido a su alta demanda energética y a que carece de un sistema de almacenamiento de energía a largo plazo, depende del suministro continuo de oxígeno y sustratos. Para ello, la vasculatura cerebral presenta una topología y anatomía únicas, el flujo sanguíneo cerebral está estrechamente regulado y la barrera hematoencefálica controla rigurosamente el intercambio molecular y celular entre el SNC y la periferia (Klohs, 2019). Numerosos factores de riesgo modificables de la EA, como la hipertensión, obesidad, inactividad física, tabaquismo o diabetes, confluyen en la alteración del sistema vascular y/o la reducción de la disponibilidad de oxígeno y nutrientes. De hecho, la disfunción de los vasos sanguíneos del cerebro contribuye total o parcialmente a aproximadamente el 40% de todas las demencias a nivel mundial (Sweeney et al., 2019) y, concretamente, un 80% de los enfermos de Alzheimer padecen patologías cerebrovasculares, como la angiopatía amiloide cerebral (Matthews et al., 2009). Ya desde estadios leves, se han descrito alteraciones en la función vascular en pacientes de Alzheimer (Iturria-Medina et al., 2016; Montagne et al., 2016). De hecho, Iturria-Medina et al. (2016) han demostrado que la reducción del flujo sanguíneo cerebral se detecta antes incluso que los cambios en biomarcadores clásicos como Abeta o Tau. Además, la aparición de microhemorragias, principalmente localizadas en el lóbulo occipital (Kantarci et al., 2013), y de calcificaciones asociadas a vasos en el hipocampo (Kockelkoren et al., 2016) correlacionan con el déficit cognitivo.

En este Trabajo, observamos un significativo aumento en la expresión de genes asociados a la respuesta hipóxica en **individuos con EA**. Nuestros resultados muestran que la inducción de la respuesta a hipoxia tiene lugar en los estadios Braak III-IV (donde existe un aumento de HIF1 $\alpha$ ) mientras que el incremento de expresión de los genes diana de HIF1 (Hmox, Slc7a5, Bhlhe40, etc) se manifiesta en los estadios Braak V-VI. Estos resultados reflejan que la hipoxia se cronifica con el avance de la patología, lo que tendrá consecuencias negativas sobre las neuronas, bien de forma directa (aumentando la formación de péptidos Abeta, alterando la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> y estimulando la formación de especies reactivas de oxígeno (Lall et al., 2019)), o de forma indirecta, alterando las funciones microgliales necesarias para proteger la homeostasis neuronal. Por consiguiente, la valoración de marcadores de hipoxia y de la función vascular cerebral debería ser tomada en cuenta en la evaluación clínica de los pacientes con EA. En este sentido, se podrían valorar la permeabilidad de la BHE, mediante resonancia magnética con contraste de gadolinio, los cambios macroestructurales mediante FLAIR (de inglés, *fluid-attenuated inversion recovery*) y los cambios microestructurales mediante la evaluación de parámetros de difusión (Sweeney et al., 2019).

La hipoxia podría ser consecuencia, entre otros factores, de la elevada cantidad de O<sub>2</sub> que consumen las células microgliales para cubrir el alto coste energético necesario para sus funciones, sumado

evidentemente a la alteración vascular local que pueden generar las placas y la disposición celular a su alrededor (Eltzschig y Carmeliet, 2011). Este contexto puede a su vez alterar, como se ha comentado anteriormente, el equilibrio metabólico OXPHOS/HIF en la microglía y modificar sus funciones defensivas. De hecho, en las muestras de pacientes de Alzheimer, observamos que las regiones cerebrales más hipóxicas (como el giro dentado) presentan menor cobertura microglial en las placas amiloides. Como consecuencia de este ambiente inductor de la disfunción microglial, se produce un aumento en el número de neuritas distróficas (este Trabajo; Heras-Garvín, 2015). Por tanto, la contención de las placas amiloides por parte de la microglía es un evento beneficioso en los pacientes de Alzheimer.

Del mismo modo, cuando los animales **transgénicos con patología amiloide** se someten a hipoxia crónica, disminuye significativamente la migración microglial a los depósitos de Abeta. La participación de la microglía en la formación de las placas de Abeta es un evento cada vez más caracterizado. Además de en la compactación física de la placa (Casali et al., 2020), la microglía podría intervenir secretando factores de agregación e incluso internalizando bajas concentraciones de Abeta fibrilar, potencialmente más tóxico (Reiss et al., 2018; Venegas et al., 2017). Por tanto, la activación microglial podría tener un papel protector frente a las placas amiloides, opuesto a la actividad perjudicial asociada con la pérdida sináptica, mediada por el complemento, que también se ha descrito en modelos amiloideos (Wu et al., 2019). Sin embargo, la disrupción del equilibrio metabólico microglial por la inducción de HIF1 que ocurre durante la hipoxia, impide la quimiotaxis hacia el depósito amiloide, lo que conllevará una menor compactación de la placa y un aumento de las neuritas distróficas. Lo mismo ocurre en el modelo APP/PS1/VHL-, donde la ablación génica de VHL induce la sobreexpresión de HIF1 (March-Diaz et al, aceptado en Nature Aging). En este sentido, se ha descrito que la inyección sistémica de LPS, que conlleva la sobreactivación de HIF1, también empeora la patología (Wendeln et al., 2018) y estas mismas consecuencias se registran en presencia de deficiencias en Trem2 (McQuade et al., 2020; Meilandt et al., 2020; Wang et al., 2016; Yuan et al., 2016). De forma inversa, tanto el rutósido sódico, un flavonoide natural que induce un cambio en la microglía de glucólisis anaeróbica a OXPHOS (Pan et al., 2019), como IFN $\gamma$ , un inductor de mTOR, atenúan la neuroinflamación y los defectos de aprendizaje y memoria en modelos de deposición de Abeta (Baik et al., 2019; Pan et al., 2019). Todo ello refuerza nuevamente que el eje de señalización Trem2-mTOR-OXPHOS es esencial para la activación microglial crónica.

Igualmente, la activación microglial también se ve comprometida en el **modelo TAU P301S** bajo hipoxia, ya que nuestros resultados muestran un descenso significativo de la expresión de los marcadores de reactividad Clec7a, Trem2, Cd45 y Lgals3 en dichos ratones sometidos a bajos niveles de O<sub>2</sub>. Este hecho demuestra la importancia del balance OXPHOS/HIF para la microgliosis crónica también en modelos de tauopatía.



La interacción microglial con las formas de Tau es un tema de debate, aunque algunas investigaciones proponen una participación activa de la microglía en la propagación de la tauopatía. De hecho, la activación del inflammasoma NLRP3 en la microglía induce la fosforilación de Tau en neuronas (Ising et al., 2019). En paralelo, una activación microglial exacerbada por deficiencias en el receptor CX3CR1 en modelos murinos de tauopatía aumenta los niveles de fosfo-Tau (Bhaskar et al., 2010; Maphis et al., 2015). A este respecto, nuestros resultados en el modelo TAU P301S muestran que cuando la activación microglial es menor, disminuyen los niveles de Tau fosforilado, coincidiendo con el manuscrito de Mancuso et al. (2019). En el modelo TAU P301S, donde la tauopatía es muy patente en hipocampo y corteza entorrinal (Yoshiyama et al., 2007), los niveles de fosfo-Tau disminuyen significativamente en ambas regiones tras someter los ratones a hipoxia.

Por tanto, la ausencia de activación microglial, consecuencia de la disrupción en el balance OXPPOS/HIF, podría aletargar o enlentecer la progresión de la patología Tau. En concordancia con esta idea, recientes publicaciones han demostrado que la variante de riesgo RH47 de Trem2 o incluso la depleción de Trem2 disminuyen la microgliosis y son neuroprotectoras en este modelo (Gratuze et al., 2020; Leyns et al., 2017). Esto recalca, una vez más, la implicación de Trem2 en el eje de activación microglial. Sin embargo, cabe mencionar que al modificar o suprimir Trem2, afectamos específicamente a las células microgliales, por lo que los efectos observados sobre la patología derivan claramente de la modificación microglial. En contraste, nuestro tratamiento de hipoxia podría ejercer un efecto directo sobre la fosforilación de Tau, independiente del efecto derivado de la microglía. En este sentido, investigaciones recientes *in vitro* han demostrado que la hipoxia puede modificar el splicing alternativo de Tau (Jakubauskienė et al., 2021) y su patrón de fosforilación (Mavroeidi et al., 2017). Mavroeidi et al. (2017) reportan que la privación de oxígeno conlleva una desfosforilación de Tau en las serinas 396 y 404 ya que, aunque incrementa la actividad de GSK3 $\beta$ , también aumenta la actividad de la fosfatasa PP2A. En contraposición, en modelos de privación de oxígeno y glucosa *in vitro* se ha observado un aumento de la fosforilación de Tau a través de un incremento en la actividad de GSK3 $\beta$  (Zhao et al., 2016). En cualquier caso, nuestros ensayos en la línea neuronal SH-Tau demuestran que no existen cambios en la fosforilación de Tau tras tratamientos de hipoxia y Yoshiyama et al. (2007) demostraron, en el modelo TAU P301S, que la inmunosupresión farmacológica con tacrólimus atenúa la tauopatía. Todo ello que apoya que la atenuación de la respuesta microglial, y no la hipoxia *per se*, sería la responsable de la reducción de la patología Tau.

Por otro lado, la menor activación microglial en el modelo TAU P301S bajo condiciones de hipoxia podría inducir una disminución de la reactividad de los astrocitos, ya que nuestros resultados muestran una reducción de la expresión de marcadores de activación astrocítica general y de las respuestas A1 y A2 en estos animales. Los estudios transcriptómicos realizados en nuestro laboratorio a partir de

astrocitos aislados de animales TAU P301S de 9 meses muestran una reducción del metabolismo oxidativo respecto a WT (Sanchez-Mico, 2019), por lo que la falta de oxígeno probablemente no comprometa de forma tan significativa la activación astrogliar. Además, dado que los astrocitos presentan un estrecho contacto con el sistema vascular a través de los pies astrocitarios, la disminución de la disponibilidad de oxígeno en estas células podría ser menor que en la microglía. Por tanto, la reducción de la astrogliosis en los animales TAU P301S sometidos a hipoxia podría reflejar la interacción microglía-astrocito, cada vez más caracterizada (Vainchtein y Molofsky, 2020).

Aunque es necesario realizar estudios inmunohistoquímicos para analizar detalladamente si existe una mejora significativa en la patología neuronal de los animales TAU P301S sometidos a hipoxia, nuestros resultados de western blot indican una ligera reducción en las alteraciones sinápticas, ya que se produce una tendencia al aumento en la expresión de PSD95 y VGLUT. Si esta variación se debe a una menor gliosis o a una disminución de la fosforilación de Tau es una cuestión pendiente de resolver, aunque probablemente no exista una respuesta unilateral. Sin embargo, tal y como demuestran Gratuze et al. (2020), una menor activación microglial disminuye su capacidad de fagocitar sinapsis, contribuyendo así a la neuroprotección. En este sentido, Leyns et al. (2017) han descrito que en el modelo P301S-Trem2KO se produce neuroprotección sin cambios en la patología Tau, pero con una reducción de la microgliosis. En paralelo, existen evidencias de que la función moduladora de sinapsis de los astrocitos puede modificarse tras su activación, que aumentaría la excitotoxicidad mediada por glutamato y afectaría a las sinapsis inhibitorias GABAérgicas (Ishibashi et al., 2019; Perez-Nievas y Serrano-Pozo, 2018). Por consiguiente, la menor activación astrogliar en el modelo TAU P301S sometido a hipoxia también podría ser responsable de la leve mejora sináptica observada. Dado que la activación microglial y astrogliar suelen ocurrir al unísono, es complicado distinguir *in vivo* la contribución independiente de cada población celular y probablemente la respuesta combinada de ambas contribuya a la neurodegeneración. En cualquier caso, se ha demostrado que la respuesta inmune crónica está asociada a niveles elevados de citoquinas pro-inflamatorias excitotóxicas para las sinapsis (Cianciulli et al., 2020), así como de proteínas del complemento que favorecen la fagocitosis y destrucción sináptica (Tenner et al., 2018). Nuestros resultados en ratones TAU P301S sometidos a hipoxia muestran una disminución en la expresión de las citoquinas inflamatorias TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  y de las proteínas del complemento C4a y C4b, lo que apoya que la reducción de la respuesta inflamatoria exacerbada podría ser la responsable de la leve mejora en la patología sináptica.

Por otro lado, el modelo TAU P301S quizás no sea el que mejor mimetice la tauopatía de pacientes de Alzheimer, sino que refleja mejor tauopatías primarias como la FTD. Sin embargo, la menor activación microglial en ratones TAU P301S como consecuencia de la disminución de la disponibilidad de oxígeno sí podría mimetizar la situación que tiene lugar en el cerebro de individuos Braak V-VI. Dado que

nuestros resultados muestran una inducción de los genes de respuesta a hipoxia en muestras humanas, cabe considerar que la respuesta microglial frente a la patología Tau se reproduzca más fielmente en el modelo TAU P301S bajo condiciones de hipoxia.

En definitiva, este estudio nos permite afirmar que la respuesta microglial influye de manera claramente diferencial en la progresión de las patologías Abeta y Tau. Mientras que la activación microglial, mediada principalmente por el eje Trem2-OXPHOS, parece proteger de los efectos nocivos derivados de la patología amiloide, podría a su vez contribuir a la propagación de la tauopatía. En concordancia con esta hipótesis, la variante R47H de Trem2 parece reducir la microgliosis alrededor de las placas en estadios tempranos de la patología, incrementando el número de placas (Ewers et al., 2020; Price et al., 2020; Wang et al., 2020, 2016), pero en estadios tardíos parece atenuar la pérdida sináptica asociada a Tau mediante la reducción de la capacidad fagocítica microglial (Gratuze et al., 2020; Leyns et al., 2019, 2017). Por tanto, sería acertado potenciar la función de Trem2, y por consiguiente la activación microglial, al inicio de la patología de Alzheimer (Ewers et al., 2020; Price et al., 2020) y aminorar su actividad en estadios avanzados (Perea et al., 2020), sin llegar a suprimirla, pues la ablación de la función de Trem2 se manifiesta con el desarrollo de la enfermedad de Nasu-Hakola (Dardotis et al., 2017).

## 5. DEPLECIÓN MICROGLIAL COMO MODELO DE DISFUNCIÓN MICROGLIAL

A pesar de que en diversos modelos animales de EA se produce un proceso de activación microglial paralelo al desarrollo de la patología, en el hipocampo de pacientes en estadios avanzados de EA (Braak V-VI) la reactividad microglial es muy limitada (Gutierrez y Vitorica, 2018; Navarro et al., 2018, Sanchez-Mejias et al., 2016; Swanson et al., 2020). Esta realidad es parcialmente mimetizada por escasos modelos murinos, siendo el modelo ThyTAU22 uno de ellos. Sin embargo, este modelo no reproduce completamente lo que ocurre en enfermos de Alzheimer, ya que la microglía no presenta un fenotipo distrófico, como el observado en los pacientes (Sanchez-Mejias et al., 2016; Streit et al., 2020; Romero-Molina et al., 2018). Por consiguiente, resulta urgente desarrollar aproximaciones experimentales que mimeticen con más fiabilidad la situación descrita en el hipocampo de enfermos de Alzheimer, con el fin de conocer la interacción microglial real con la patología, y poder plantear dianas terapéuticas más eficaces y seguras.

En pacientes de Alzheimer, la disfuncionalidad microglial puede estar mediada por numerosos factores, como la patología vascular, mutaciones/alteraciones en Trem2, la senescencia celular por activaciones repetidas, disminución de la proliferación, toxicidad por especies solubles de fosfo-Tau, etc. En este Trabajo, hemos descrito cómo la microglía pierde su capacidad de fagocitar oligómeros de Abeta cuando presenta alteraciones en Trem2. Por otro lado, hemos demostrado su incapacidad de asociarse a las placas amiloides en condiciones de hipoxia, situación similar a la que se produce cuando existen problemas vasculares en pacientes de EA. La baja disponibilidad de oxígeno también afecta a la interacción microglial con la patología Tau, aunque en este caso parece disminuir su severidad. Con estos datos, podríamos hipotetizar que la microglía parece frenar la patología Abeta mientras que contribuye a la propagación de la patología Tau. Sin embargo, es necesario profundizar en los efectos asociados a la disfuncionalidad microglial con el fin de entender con más exactitud su papel en la EA.

En los últimos años, se han desarrollado varios modelos de depleción microglial como una interesante aproximación para conocer el papel de la microglía en respuesta a diferentes enfermedades neurológicas (Green et al., 2020; Spangenberg y Green, 2017). Además, las estrategias de depleción-repoblación microglial y de trasplante de células gliales (Han et al., 2019; Shen et al., 2017; Srivastava et al., 2018) están siendo seriamente consideradas como medidas terapéuticas en enfermedades neurodegenerativas, ya que serían clave tanto en los procesos en los que la microglía es disfuncional como en los que es hiperreactiva, pues en ambos casos contribuye al daño neuronal. De hecho, existen investigaciones básicas y clínicas que han demostrado que una supresión parcial de la respuesta inmune a través de la depleción de células autorreactivas podría reestablecer el balance inmune en el SNC (Wraith, 2017). Sin embargo, un nuevo reto es que esta depleción sea selectiva de las células

hiperreactivas para minimizar daños colaterales, ya que, por ejemplo, la supresión de la microglía inmunomoduladora productora de TGF $\beta$  podría constituir un evento traumático *per se* y contribuir al daño neuronal (Han et al., 2019).

Existen diversos modelos de depleción microglial, la mayoría basados en la inhibición del receptor CSF1R, específico de la microglía y esencial para su supervivencia (Han et al., 2017). De hecho, los ratones *knockout* para CSF1R mueren antes de alcanzar el estado adulto (Erblich et al., 2011; Ginhoux et al., 2010). Por tanto, para desarrollar los modelos de depleción microglial la supresión de este receptor se realiza en la edad adulta, bien mediante la administración de un inhibidor farmacológico (PLX5622, PLX3394) o a través de la ablación génica gracias a un sistema modulable, normalmente inducible por tamoxifeno (Green et al., 2020; Han et al., 2019). Las distintas aproximaciones producen un porcentaje de depleción variable y dependiente de la dosis y del tiempo de administración del inhibidor o compuesto inductor del sistema Cre-LoxP (ver Materiales y Métodos, Apartado 2.3.1). En este Trabajo, el modelo de ablación genética temporal de CSF1R nos ha permitido estudiar, en primer lugar, la **capacidad de depleción** y repoblación microglial tras **tratamientos agudos**. Con la administración de tamoxifeno inyectado (75 mg/kg durante 7 días) hemos logrado una depleción del 98%, porcentaje similar al descrito en estudios con dosis elevadas (1200 mg/kg de pienso) de los inhibidor farmacológico PLXs (Han et al., 2017). La rapidez (7 días) de la depleción apunta a que se debe a un proceso de muerte microglial y no a una inhibición de la proliferación. Además, Elmore et al. (2014) demuestran que la activación de caspasa 3 es la responsable de la apoptosis de las células microgliales, y que no se produce desdiferenciación de la microglía hacia otros tipos celulares.

A partir de este nicho vacío, hemos descrito, en concordancia con lo publicado en la literatura tanto para cerebro como médula espinal (Han et al., 2017; Yao et al., 2016), una rápida **repoplación microglial** que no se acompaña de efectos colaterales visibles, como alteraciones en el estado físico o comportamental de los animales. Esta repoblación ocurre tanto en los animales de 2 meses de edad como en los de 12 meses, lo que refleja que en el SNC adulto envejecido también existe una población microglial plástica y dinámica. En este Trabajo, el tratamiento agudo de depleción en animales de 12 meses se ha realizado con el fin de evaluar la capacidad de repoblación microglial a edades más avanzadas ya que el objetivo final del proyecto es utilizar animales CX3CSF1R –APP y –TAU de 9-12 meses para evaluar el papel de la microglía una vez establecida la patología. Dado que la esperanza de vida de estos modelos transgénicos es menor que la de animales WT, consideramos que la edad de 12 meses corresponde a estadios finales, especialmente en el modelo TAU P301S. Sin embargo, para comprobar realmente que en animales WT no existen cambios en la capacidad de repoblación microglial asociados a la edad, sería más conveniente repetir este estudio en animales con un envejecimiento más avanzado (20-24 meses de edad).

El origen de las células que repueblan aún no ha sido determinado con claridad. Elmore et al. (2014) proponen que son células microgliales progenitoras locales (nestina+) las que proliferan, mientras que Bruttger et al. (2015) apoyan que son las propias células microgliales remanentes las que aumentan su tasa proliferativa. Otros estudios de mapeo, secuenciación de célula única y parabiosis apoyan este segundo mecanismo (Askew et al., 2017; Huang et al., 2018; Konishi et al., 2020). Nuestros resultados también parecen inclinarse hacia esta hipótesis, ya que observamos que cuanto menor es la depleción, mayor es la repoblación. Por ejemplo, el porcentaje de microglía remanente tras un segundo ciclo de tratamientos agudos de tamoxifeno es mayor al obtenido tras el primer ciclo de tratamiento agudo, y esto correlaciona con un pico más pronunciado de repoblación microglial. Es decir, si quedan más células microgliales remanentes que puedan proliferar, la repoblación es más rápida y contundente. Además, el hecho de que Konishi et al. (2020) hayan identificado la expresión de Ki67+ en la microglía tras un tratamiento de depleción, nos confirma que el aumento de expresión de Ki67+ que observamos en el tejido total de los animales depletados corresponde a la proliferación de las células microgliales remanentes.

Además, la activación microglial subsecuente a la depleción podría contribuir a que la microglía remanente sea menos dependiente de CSF1R. En este sentido, se ha descrito que la señalización de Trem2 induce la activación de la vía Syk (ruta *downstream* a CSF1R), de manera sinérgica al eje CSF1-CSF1R *in vitro* (Wang et al., 2015). Por consiguiente, el aumento de expresión de Trem2 en la microglía remanente / que repuebla, podría favorecer su tolerancia al tratamiento con tamoxifeno y explicaría los niveles moderados de microglía registrados durante los tratamientos crónicos.

En nuestros resultados, se muestra que la repoblación microglial es muy variable: mientras que en algunos animales los niveles de microglía tras 7-14 días de repoblación alcanzan niveles similares a la condición WT, en otros son prácticamente inexistentes. Dado que los animales tienen la misma edad y fondo genético, evaluamos si existe alguna correlación entre la variabilidad de la repoblación y el sexo. Teniendo en cuenta que el tamoxifeno es un antagonista del receptor estrogénico, más activo en hembras que en machos, esperábamos encontrar alguna asociación. Sin embargo, nuestros resultados, al igual que otros estudios de depleción, no encuentran variaciones en la repoblación asociadas al sexo. Aparte, algunas investigaciones evalúan el porcentaje de microglía tras 21-28 días después de finalizar el tratamiento de depleción, cuando nuestros resultados muestran ya una repoblación completa; y, las que evalúan el proceso a tiempos más cortos, no reportan variabilidad intragrupal como la que nosotros encontramos (Casali et al., 2020; Elmore et al., 2014; Lund et al., 2018; Najafi et al., 2018). En definitiva, a pesar de los análisis realizados, no conocemos las causas subyacentes a la variabilidad entre individuos en nuestro modelo de depleción.

En paralelo, a día de hoy, tampoco contamos con una explicación clara para el peculiar patrón de repoblación que observamos mediante inmunohistoquímica con el anticuerpo Iba1 en algunos animales depletados, que presentan una llamativa variación rostro-caudal, con regiones cerebrales totalmente depletadas y otras completamente repobladas. Las publicaciones consultadas no muestran imágenes de las secciones cerebrales completas y secuenciales durante el proceso de repoblación microglial, comparables a nuestros resultados ni reportan detalles al respecto. Por consiguiente, se requieren futuros experimentos para poder entender la variabilidad del patrón de repoblación que hemos observado.

Por otro lado, nuestros datos muestran que la depleción prácticamente total de microglía que conseguimos tras el tratamiento agudo (sobre todo en animales de 2 meses de edad) parece mediar **infiltración** de células del sistema inmune periférico. Sin embargo, sería conveniente realizar ensayos inmunohistoquímicos y experimentos de citometría de flujo, usando marcadores específicos de células inmunes periféricas, para confirmar este hecho y definir con precisión qué tipos celulares se infiltran. Se ha descrito infiltración de monocitos en los modelos patogénicos de depleción CD11b-HSVTK (Varvel et al., 2012) y Cx3Cr1<sup>CreER+</sup>/R26<sup>DTA+</sup> (Lund et al., 2018). De hecho, Lund et al. (2018) demuestran que la firma transcriptómica de las células infiltradas (F4/80<sup>hi</sup>) no coincide con la de la microglía local caracterizada por Bennet et al. (2018). En cuanto a los modelos de inhibición de CSF1R con PLXs, no se han reportado cambios en marcadores de infiltración, como Ccr2 (Elmore et al., 2014), mientras que en el modelo CX3CR1<sup>CreER+</sup>/CSF1R<sup>fl/fl</sup> (el mismo que utilizamos en este Trabajo), se produce una infiltración de macrófagos con una firma transcripcional y funcional propia cuando se impide la auto-renovación microglial (Cronk et al., 2018). En este sentido, se ha descrito que la microglía podría ser la responsable de mantener el estado de inmunoprivilegio del SNC en situaciones patológicas (Plemel et al., 2020).

Nuestros resultados muestran una significativa infiltración de linfocitos (Cd3<sup>+</sup>) subsecuente a la depleción microglial aguda y tras 1-2 meses de tratamiento crónico. Sin embargo, no está claro si existe también infiltración de otras poblaciones mieloides, como células derivadas de monocitos (CDM). El hecho de que en modelos murinos con patología Abeta y Tau la infiltración de linfocitos sea más patente que la de células derivadas de monocitos (Muñoz-Castro, 2021) nos hace suponer que, o bien la atracción y entrada de linfocitos es más contundente tras alteraciones de la homeostasis cerebral, o bien su identificación es más clara. En este sentido, dado que los macrófagos asociados al SNC y las CDM presentan marcadores generales de macrófagos, su estudio diferencial respecto a la microglía es más complicado. De hecho, aunque la expresión de Cd163 se asocia a CDM en pacientes de Alzheimer (manuscrito en preparación; Muñoz-Castro, 2021), también se ha descrito en macrófagos asociados al SNC (Kierdorf et al., 2019) y en subpoblaciones microgliales (Nguyen et al., 2020; Sankowski et al., 2019). A todo ello, se suma que las CDM podrían modificar su fenotipo al exponerse al ambiente del SNC, asemejándose aún más a la microglía (Greenhalgh et al., 2020; Kierdorf et al., 2019). Por ejemplo, el



hecho de que no se modifique la expresión de Ly6C tras la depleción podría explicarse por una ausencia de infiltración de CDM, por una infiltración de células Ly6c<sup>-</sup> o porque las células infiltrantes Ly6c<sup>+</sup> disminuyan su expresión de Ly6c al entrar en el SNC. Además, en nuestras muestras procedentes de animales depletados no existe correlación entre la expresión de los marcadores Cd163, Ccr2 y Ly6c, por lo que se requieren estudios complementarios para identificar el tipo de células infiltradas tras los procesos de depleción microglial. Adicionalmente, para diferenciar las células microgliales originales de células inmunes infiltrantes que posteriormente adquieran un fenotipo microglial, podríamos inyectar, antes de iniciar el tratamiento con tamoxifeno, virus con constructos fluorescentes (como GFP) con un promotor específico de Cx3cr1 que marquen la microglía original. Sin embargo, esta aproximación presenta limitaciones como el hecho de que la eficiencia del marcaje inicial microglial pueda variar entre animales y conduzca a resultados erróneos.

Según estudios recientes, la **nueva microglía**, provenga de hiperproliferación local, de progenitores microgliales o derive de células infiltradas, parece cumplir las funciones propias de la microglía residente, y es capaz de vigilar el entorno y responder a estímulos agudos (Elmore et al., 2015; Varvel et al., 2012; Zhang et al., 2018). En este Trabajo, hemos demostrado que la microglía remanente o/y que repuebla presenta una morfología activa, con un engrosamiento del cuerpo celular y acortamiento y engrosamiento de las prolongaciones. Además, el aumento de los marcadores Clec7a y Lgals3 corrobora dicha activación microglial. Este fenotipo es típico de microglía fagocítica, que podría estar eliminando restos celulares de microglía muerta, tal y como sugieren Elmore et al. (2014). De hecho, comparando los resultados obtenidos en los tratamientos agudos entre animales de 2 y 12 meses, hemos observado que cuanto mayor es la depleción, mayor es la activación microglial. Sin embargo, dada la escasa población microglial remanente a los 0 días de repoblación, el SNC debe contar con un mecanismo adicional independiente de la microglía para eliminar todos los restos celulares, entre los que se ha propuesto la actividad fagocítica de los astrocitos (Konishi et al., 2020). Konishi et al. (2020) demuestran que, tras la depleción específica microglial (ratones Siglech<sup>dtr</sup>) no son los macrófagos asociados al SNC ni los monocitos circulantes, sino los astrocitos, los que aclaran los debris microgliales.

A pesar de que investigaciones emergentes establecen una conexión entre la actividad microglial y **astrocítica** (Bouvier y Murai, 2015; Paolicelli et al., 2019), en nuestros estudios, la depleción microglial aguda no parece afectar a la reactividad astrocítica. Paralelamente, Katsouri et al. (2020) han demostrado que la ablación de astrocitos tampoco parece modificar las funciones microgliales. Sin embargo, una microgliosis mantenida, como la que tiene lugar en los animales tratados con tamoxifeno durante 1 mes, sí está asociada a una activación astrogliar significativa, que podría ser clave para la estabilización de los niveles de microglía observada tras 2 meses de tratamiento. Sería interesante realizar una depleción astrogliar subsecuente a la microglial para valorar si las funciones astrocíticas son indispensables en los mecanismos de repoblación microglial.

Nuestro modelo CX3CSF1R permite además realizar tratamientos de **depleción crónica** mediante la administración de tamoxifeno oral. Esta modalidad no es posible con otros modelos de depleción como el CX3CR1<sup>cre<sup>ER</sup></sup> x DTR<sup>f/f</sup> que requiere la administración de la toxina diftérica, e induce una importante cascada de citocinas que limita el tratamiento a un periodo agudo (5 días) (Bruttger et al., 2015; Rice et al., 2017). Del mismo modo, el modelo viral CD11b-HSVTK también permite mantener una depleción microglial limitada (aproximadamente 4 semanas) ya que la administración de ganciclovir induce daño en la BHE y mielotoxicidad (Grathwohl et al., 2009). Igualmente, el uso de liposomas de clodronato tampoco es válido para la depleción a largo plazo ya que, debido a su corta vida media y a que es incapaz de atravesar la BHE, requiere administrarse mediante inyección intraparenquimal (Faustino et al., 2011).

En los tratamientos crónicos de depleción, nuestros datos muestran que no se consigue una depleción total de microglía, probablemente debido a la proliferación constante de la microglía remanente, como sugieren los estudios de Cronk et al. (2018). La pérdida microglial debe estar siendo contrarrestada por una proliferación de células con expresión residual de CSF1R o de células en las que se activen otras vías de señalización pro-supervivencia independientes de CSF1R. Tras 1 mes de tratamiento oral con tamoxifeno, observamos que existe una elevada variabilidad en la capacidad de repoblación ya que encontramos animales con niveles altos de microglía y otros con niveles muy reducidos. El balance depleción-repoblación se estabiliza tras 2 meses de tratamiento, alcanzándose niveles similares al WT; pero, tras 4 meses de tratamiento, observamos nuevamente niveles microgliales reducidos. Este cambio podría atribuirse bien al aumento de tiempo de tratamiento o al uso de animales más envejecidos, ya que los tratamientos de 1-2 meses se han realizado en animales jóvenes de 2 meses mientras que el tratamiento de 4 meses se ha administrado a ratones de 12 meses de edad. Sin embargo, también hemos observado esta disminución de la población microglial tras 4 meses de tamoxifeno en los animales APPCX3 jóvenes (tratados a los 4 meses de edad). Por tanto, y teniendo en cuenta que la capacidad de repoblación tras tratamientos agudos no se afecta con la edad, es más probable que la reducción de los niveles microgliales se deba a la prolongación de la duración del tratamiento y no al envejecimiento de los animales.

Aunando los resultados obtenidos para los distintos tratamientos, podríamos concluir, aunque de forma preliminar, que la infiltración de células inmunes periféricas y la activación microglial ocurren cuando los niveles microgliales son significativamente bajos. Una renovación microglial constante podría eliminar la señal inicial de atracción para las células inmunes periféricas (Unger et al., 2018), probablemente mediada por Ccl2 y Ccl4 (Muñoz-Castro, 2021). Nuestros resultados muestran un aumento significativo de Ccl2 en animales de dos meses de edad cuando se reduce la población microglial (depleción aguda y tratamiento crónico de 1 mes). En este sentido, otras publicaciones han demostrado un aumento en

la expresión de Ccl2 en el SNC de pacientes de Alzheimer (Ishizuka et al., 1997; Zenaro et al., 2017). De hecho, los niveles de Ccl2 en LCR y plasma parecen correlacionar con un mayor declive cognitivo (Kimura et al., 2018), lo que nos hace suponer que correlacionará a su vez con los pacientes que presenten una microglía más degenerativa.

Aunque se ha descrito que la microglía está implicada en procesos de remodelación sináptica en la progresión de enfermedades neurodegenerativas (Wu et al., 2015), en los animales CX3CSF1R de 16 meses con niveles reducidos de microglía no observamos cambios significativos en marcadores neuronales ni sinápticos. Probablemente, en ausencia de patologías, la interacción microglía-sinapsis en edades adultas carezca de tanta relevancia.

Es necesario caracterizar más en detalle nuestro modelo de depleción CX3CSF1R para establecer conclusiones sólidas sobre los diferentes aspectos discutidos y poder pasar a evaluar el papel de la microglía en la patología de Alzheimer. Sin embargo, nuestros resultados preliminares de depleción en el modelo **APP-CX3CSF1R**, en primer lugar demuestran, en concordancia con la bibliografía (Casali et al., 2020; Spangeberg et al., 2019), que la microglía también es dependiente de CSF1R en cerebros con patología amiloide. El estudio del efecto de la eliminación de la microglía en la patología Abeta ha concluido en resultados controvertidos. Recientemente, se ha demostrado que las células situadas alrededor de las placas son exclusivamente microgliales, sin contribución de células mieloides infiltrantes (Reed-Geaghan et al., 2020; Shukla et al., 2019), por lo que la microglía sería fundamental en la contención de los depósitos amiloides. De hecho, recientes publicaciones afirman que existe una disminución de las placas de Abeta si la inhibición de CSF1R se realiza antes o en los inicios del desarrollo de la patología (Casali et al., 2020; Spangenberg et al., 2019). Dichos autores demuestran que la carga total de Abeta no varía, sino que cambia su distribución, lo que apoya la importancia de la microglía en la formación de las placas de Abeta. Todo ello concuerda con los resultados obtenidos en este Trabajo, que muestran una tendencia hacia una disminución de la carga amiloide como consecuencia de la depleción microglial parcial en animales de ocho meses. Sería conveniente realizar estudios inmunohistoquímicos cuantitativos acerca del número, tamaño y circularidad de las placas para evaluar de forma más detallada este fenómeno. Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado mediante estudios de western-blot que, en condiciones desnaturalizantes, el contenido amiloide que se visualiza corresponde principalmente a las placas (Jimenez et al., 2014), por lo que sería conveniente realizar ensayos de ELISA para evaluar el contenido en Abeta soluble en animales APPCX3. Por una parte, cabe esperar que al reducirse los niveles de células microgliales y, por consiguiente, la compactación de los depósitos amiloides, aumentase el contenido de Abeta soluble. Además, dado que los niveles de APP soluble y C99 no varían en este modelo, no encontramos indicios de que exista una menor producción neuronal de Abeta.

Sin embargo, también es posible que el recambio continuo de microglía genere células más eficientes (Lloyd et al., 2019), que realicen un mejor aclaramiento del Abeta soluble. Sería de interés diseñar nuevos experimentos que nos permitiesen distinguir entre la microglía inicial y la microglía emergente, de manera que pudiésemos comparar sus capacidades en la respuesta a Abeta. En este sentido, hemos valorado el doble tratamiento de los animales APPCX3 con tamoxifeno y EdU, para así marcar las células proliferativas durante la depleción-repoblación. Sin embargo, la larga duración del tratamiento oral requeriría numerosas inyecciones de EdU, lo que eleva en exceso el coste del experimento.

En cualquier caso, nuestros datos, y la reciente publicación de Casali et al. (2020), no demuestran que la depleción microglial en animales APP se traduzca en una mejora de la patología neuronal, mientras que otros estudios sí observan una disminución del Abeta intraneuronal y de las placas neuríticas, acompañado de un menor declive cognitivo (Sosna et al., 2018; Spangenberg et al., 2019).

Una vez establecida la patología (ratones de 10 a 18 meses de edad), algunas publicaciones muestran una mejora de las capacidades cognitivas cuando se reduce la población microglial, aunque no esté acompañado de una disminución de la carga amiloide. En este Trabajo, no hemos realizado estudios de comportamiento en los animales y nuestros resultados muestran que la carga amiloide no varía en los animales APP envejecidos depletados, datos que debemos corroborar mediante técnicas complementarias. Por su parte, Zhao et al. (2017) demuestran que, aunque no varíe el número de placas, sí se produce un aumento del tamaño de las mismas, otorgando nuevamente a la microglía un papel fundamental en la compactación de las placas.

Aparte, resulta de gran interés evaluar la influencia de la depleción y repoblación microglial en el inicio y progresión de la patología Tau, por lo que estamos generando modelos **TAU-CX3CSF1R**. Aunque Zu et al. (2020) no observan ninguna variación en la patología Tau tras la depleción microglial, el modelo hTAU que utilizan es menos agresivo que la mayoría de modelos murinos transgénicos que expresan la forma Tau mutante asociada a demencia frontotemporal: JNPL3 (Acker et al., 2013; Lewis et al., 2000), PS19 (Yoshiyama et al., 2007, el utilizado en este Trabajo) y rTg4510 (Ramsden et al., 2005). De hecho, en el modelo hTAU que utilizan, describen un fenotipo homeostático para la microglía, incluso en edades avanzadas (Zhu et al., 2020). Por otro lado, tampoco se observan cambios en la patología Tau en los modelos rTg4510 (Bennett et al., 2018) ni 3xTg-AD (Dagher et al., 2015) tras una depleción microglial del 30% utilizando los inhibidores farmacológicos PLX3397 y PLX5562, respectivamente. Aunque las deficiencias en genes específicos microgliales implicados en su supervivencia y proliferación, como Cx3cr1 o Trem2, empeoran la patología Tau (Bemiller et al., 2017; Bhaskar et al., 2010; Maphis et al., 2015), nuestros resultados de disfuncionalidad microglial en presencia de baja disponibilidad de oxígeno en el modelo TAU P301S muestran una mejora de la patología Tau. Por lo tanto, cabría esperar una menor progresión de Tau en el modelo TAU-CX3CSF1R, lo que concordaría con los resultados descritos

para el modelo de depleción viral microglial en los transgénicos PS19 (Asai et al., 2019). En cualquier caso, el modelo TAU-CX3CSF1R será fundamental para aclarar el papel de la microglía frente a la tauopatía.

Las publicaciones de estudios de depleción microglial en otras patologías del SNC muestran resultados igualmente controvertidos. Rice et al. (2017) y Acharya et al. (2016) describen mejoras significativas subsecuentes a la depleción microglial en modelos de daño neuronal. En la misma línea, Li et al. (2016) muestran neuroprotección siguiendo la depleción microglial en un modelo de hemorragia intracerebral. Sin embargo, otras publicaciones reportan un aumento de la neuroinflamación y daño cerebral tras la depleción microglial en modelos de isquemia (Jin et al., 2017; Szalay et al., 2016).

En nuestro caso, nuestro modelo CX3CSF1R deber ser caracterizado más en profundidad para obtener una idea sólida de su funcionamiento. La alta heterogeneidad en la depleción-repoblación intragrupal ha dificultado enormemente sacar conclusiones claras y nos hace cuestionarnos la fiabilidad del modelo. A pesar de los esfuerzos realizados, no hemos podido achacarla a ningún factor controlable. Por otro lado, este modelo podría no reproducir, tan fielmente como habíamos diseñado, el fenotipo microglial disfuncional / degenerativo registrado en el hipocampo de muestras de pacientes de EA (Sanchez-Mejias et al., 2016). En el modelo murino, a través de una elevada tasa de proliferación microglial y/o una contribución del sistema inmune periférico, se alcanza una repoblación total tras los tratamientos agudos y un recambio constate durante los tratamientos crónicos. Además, esta microglía que repuebla podría tener efectos más beneficiosos que la microglía precedente (Han et al., 2019; Rice et al., 2017). Sin embargo, en pacientes Braak V-VI, donde además existe un ambiente tóxico crónico, el deteriorado sistema inmune central y periférico probablemente no sea capaz de sustentar dicho recambio microglial y no se produzca la sustitución de la microglía disfuncional. Es todo un reto mimetizar esta situación en los modelos murinos, que se caracterizan por una elevada capacidad proliferativa microglial y la ausencia de otras enfermedades coetáneas, que posiblemente contribuyan al deterioro del sistema inmune en pacientes.

Sin embargo, dado que hemos logrado cierta reducción de los niveles microgliales tras los tratamientos de 4 meses, podríamos plantearnos realizar tratamientos combinados añadiendo inhibidores específicos de proliferación de manera que disminuyesen aún más los niveles de microglía. Si bien, cabe la posibilidad de que aun así exista de nuevo repoblación por infiltración de células periféricas. Un conocimiento más exhaustivo del funcionamiento del modelo nos posibilitará diseñar aproximaciones exitosas que finalmente nos permitan estudiar la respuesta microglial frente a las patologías Abeta y Tau cuando la microglía es disfuncional. A partir de ahí, será posible plantear nuevas estrategias dirigidas a la función microglial en la EA.

Por otro lado, si los fenómenos de depleción-repoblación pudieran enlentecer la progresión de las patologías Abeta y Tau, podrían diseñarse terapias basadas en el recambio microglial. Recientemente, Xu et al. (2020) han propuesto diferentes estrategias para el reemplazamiento microglial en modelos murinos. En humanos, el inhibidor de CSF1R PLX3397 ha sido aprobado por la FDA y ha demostrado cierta eficacia en la depleción microglial (Butowski et al., 2016). Además, el agonista de Trem2 AL002, que potencia la proliferación microglial en modelos murinos (Wang et al., 2020), está siendo ensayado en fase I para tratar la enfermedad de Alzheimer en estadios leves y moderados (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03635047>), por lo que sería un candidato para favorecer la repoblación del nicho depletado, impulsando así la escasa proliferación microglial que tiene lugar en humanos. En definitiva, las estrategias de depleción de células microgliales constituyen una herramienta prometedora para evaluar el rol de la microglía en la EA y diseñar posibles terapias.

## 6. CONSIDERACIONES FINALES

Debido al continuo fracaso terapéutico obtenido hasta la fecha para la EA (Muñoz-Castro et al., 2020), es fundamental ampliar miras respecto a la visión neurocéntrica predominante hasta ahora y centrar el foco en dianas alternativas a las patologías de Abeta y Tau. El hecho de que muchos de los genes alterados en modelos de Alzheimer estén implicados en las interacciones de la microglía con el ambiente (receptores de membrana) o en su función lisosomal, recalca que la modulación de la actividad microglial debe ser considerada como una potencial estrategia terapéutica.

En este Trabajo, hemos descrito que el papel de la microglía en la EA varía según el contexto. Frente a la patología Abeta y frente a ciertas formas de fosfo-Tau, la microglía presenta un fenotipo activo asociado a neurodegeneración, sustentado por un metabolismo oxidativo y en el que participa la vía de señalización de Trem2. Dado que ciertas variantes en Trem2 están asociadas a un mayor riesgo de padecer Alzheimer (Jonsson et al., 2013), cabe considerar que la falta de activación microglial empeora el progreso de la patología. En este sentido, hemos observado tanto en muestras humanas como en modelos murinos amiloidogénicos, que la disrupción del metabolismo oxidativo microglial por hipoxia disminuye la cobertura microglial de la placa y aumenta la aparición de distrofias. Por tanto, hemos demostrado que la detección de alteraciones vasculares y de polimorfismos en genes asociados a la función microglial podría ser de gran utilidad en la evaluación de la progresión de la EA. Por otro lado, hemos contribuido a la demostración de que la microglía participa en la propagación de Tau, atribuyéndole así un rol dual frente a las patologías Abeta y Tau.

El hecho de que el metabolismo oxidativo sea un requerimiento esencial para la activación microglial crónica subraya la relación entre la desregulación de la glucosa y/o el metabolismo y la incidencia de Alzheimer. A pesar de que no existe correlación entre los signos patológicos de la EA, como los depósitos amiloides o los NFTs, y el síndrome metabólico o la diabetes mellitus tipo 2 (Arnold et al., 2018), nuestro grupo ha demostrado que la afectación del metabolismo glial influye en la progresión de la EA (este Trabajo; Sanchez-Mico, 2019; Muñoz-Castro, 2021). De hecho, la resistencia a insulina, que está potenciada por la activación de mTOR e íntimamente relacionada con la disfunción mitocondrial, está asociada a un mayor riesgo de padecer EA (Butterfield y Halliwell, 2019). En esta línea, el estrés oxidativo mitocondrial es potencialmente responsable de un fenotipo microglial distrófico (Streit et al., 2020). Por tanto, la identificación de moléculas que puedan restaurar la función mitocondrial, como el antioxidante glutatión (Mari et al., 2020), es fundamental en la propuesta de nuevas dianas terapéuticas.

Teniendo en cuenta que la microglía puede presentar un fenotipo distrófico en la EA a causa de diferentes factores como estrés oxidativo (Streit et al., 2020), alteración de la OXPHOS (este Trabajo),



formas de fosfo-Tau (este Trabajo, Sanchez-Mejias et al., 2016) o acumulación de hierro (Lopes et al., 2008), el desarrollo del modelo murino de depleción microglial nos permitirá realizar grandes aportaciones sobre el papel de la microglía en la EA. Aunque la caracterización de este complejo modelo aún es preliminar, permitirá estudiar los efectos de bajos niveles de microglía así como la eficiencia de la microglía renovada frente a las patologías Abeta y Tau, lo que será fundamental para proponer nuevas dianas terapéuticas. En contraste con la muerte neuronal, la disfunción microglial no es irreversible y la restauración de sus funciones podría atenuar la progresión de la enfermedad (Golde, 2019).

Aunando los resultados obtenidos en este Trabajo podemos concluir que, en la EA, la microglía podría presentar inicialmente un papel neuroprotector esencial en la contención de la patología amiloide, pero el avance de la enfermedad, que implica la exacerbación de la tauopatía y la acumulación de alteraciones metabólicas, oxidativas y vasculares, podría inducir la disfunción de estas células. Aunque la microglía se caracteriza por un alto potencial antioxidante con elevada expresión de dismutasas, catalasas y glutatión-peroxidasas (Dringen, 2005), la propia hiper-activación microglial podría conllevar su agotamiento inmune en situaciones patológicas (Streit y Xue, 2013). De esta forma, en estadios avanzados de la EA la microglía adquiere, según la coyuntura regional, una activación exacerbada o un fenotipo distrófico, ambos perjudiciales para la progresión de la patología. Así pues, cabe considerar el uso de moléculas que restauren la homeostasis microglial, como CD22 (Pluinage et al., 2019), que sería de gran utilidad en estadios avanzados de la EA.

En definitiva, a pesar de que la variada respuesta microglial existente en las diferentes regiones cerebrales, que depende de la magnitud de las patologías Abeta y Tau y de otras comorbilidades, dificulta el diseño de terapias concretas, los avances en torno a su implicación en la EA nos permiten acercarnos a un tratamiento efectivo para frene esta prevalente enfermedad.



# **F. Conclusiones / Conclusions**



1. En modelos murinos de patología Tau, las distintas formas de Tau originan una respuesta microglial diferencial. En el modelo TAU P301S, existe una importante fosforilación y agregación de Tau asociada a una pronunciada reactividad microglial, mientras que en el modelo ThyTAU22 la microglía no se activa significativamente. Sin embargo, las formas fosforiladas solubles de Tau del modelo ThyTAU22, pero no las del modelo TAU P301S, son tóxicas para la microglía *in vitro*.
2. En modelos murinos de EA, la microglía activa que responde a las patologías Abeta y Tau presenta un perfil transcriptómico asociado a neurodegeneración, con un enriquecimiento de los procesos inflamatorios y fagocíticos. La activación microglial crónica se sustenta en un metabolismo oxidativo, mediado via mTOR-Trem2 y asociado a un aumento de la síntesis y ensamblaje de los complejos respiratorios mitocondriales y a una elongación mitocondrial. Las alteraciones en Trem2 impiden la activación microglial y la subsecuente fagocitosis de oligómeros de Abeta *in vitro*.
3. En la microglía activa asociada a placas de Abeta, existe un equilibrio entre el metabolismo oxidativo y la respuesta a hipoxia. Ante una menor disponibilidad de oxígeno, se reduce la respuesta microglial hacia oligómeros de Abeta *in vitro* y disminuye la cobertura microglial de las placas amiloides en ratones APP/PS1, lo que otorga a la microglía un papel protector frente a la patología Abeta.
4. En el cerebro de pacientes en estadios avanzados de EA, aumenta la expresión de genes de respuesta a hipoxia. Además, en regiones hipóxicas como el giro dentado, disminuye significativamente la microglía asociada a placa y aumenta la patología neurítica.
5. La privación de oxígeno y el consecuente compromiso del metabolismo oxidativo disminuyen significativamente la activación microglial en el modelo TAU P301S. Esto conlleva una relevante mejora de la tauopatía, lo que apoya la participación de la microglía activa en la propagación de Tau.
6. Hemos generado un sistema de depleción microglial controlado, basado en la ablación genética específica de CSF1R. La depleción microglial *in vivo* produce un aumento de la reactividad microglial y una infiltración de linfocitos, pero no modifica la reactividad astrogliar. La microglía presenta una contundente capacidad de repoblación, aunque los niveles totales de microglía se reducen tras tratamientos muy prolongados. El recambio microglial en animales con patología amiloide parece asociarse a una disminución de la carga de Abeta, aunque se necesitan estudios complementarios.
7. En la Enfermedad de Alzheimer, el fenotipo y la función microglial dependen del grado de desarrollo de las patologías Abeta y Tau, de la disponibilidad de recursos metabólicos y de polimorfismos en genes fundamentales para su activación, como Trem2. Todo ello recalca la importancia de diseñar terapias personalizadas dirigidas a modular la función microglial para los pacientes de Alzheimer.

1. In Tau mouse models, distinct Tau forms lead to a different microglial response. In the TAU P301S model, there is a high Tau phosphorylation and aggregation associated with a pronounced microglial activation, whereas in the ThyTAU22 model, there is no microgliosis. In contrast, soluble phospho-Tau species from the ThyTAU22 model, but not from the TAU P301S model, are toxic for microglial cells *in vitro*.
2. Active microglia from Abeta and Tau mouse models present an inflammatory, phagocytic and neurodegeneration-associated transcriptomic profile. Chronic microglial activation is sustained by an oxidative metabolism, accompanied by mitochondrial elongation, and mediated through the Trem2-mTOR pathway. Trem2 impairment alters microglial response to Abeta pathology *in vitro*.
3. In plaque-associated microglia, there is a balance between the oxidative metabolism and the induction of the hypoxic response. Under a diminution of oxygen availability, microglial response to Abeta oligomers *in vitro* is compromised and, in APP/PS1 mice, there is a reduction in plaque-associated microglia. These results confer a protective role to microglia towards Abeta pathology.
4. In Braak V-VI AD samples, there is an increase of hypoxia-related markers. Brain hypoxic regions, such as the dentate gyrus, show a significant diminution of plaque-associated microglia, which leads to an increase of neuritic dystrophies.
5. Under hypoxia, which compromises oxidative metabolism, there is a significant reduction in microglial activation in TAU P301S mice. In this case, it produces a relevant amelioration of Tau pathology, suggesting that active microglia are implied in Tau propagation.
6. The development of a microglial depletion model will allow us to study Abeta and Tau progression when microglial levels are reduced or/and when a microglial continuous replacement is taking place. *In vivo* microglial depletion carries on with microglial, but no astroglial, reactivity and lymphocytes infiltration. It is followed by a variable microglia repopulation, which can be partially compromised by prolonged treatments. In eight month-old APPCX3 mice, microglia depletion leads to a light diminution of Abeta content, although further experiments are required.
7. In AD, microglial phenotype and function depend on the degree of development of Abeta and Tau pathologies, on resources availability and on the presence of risk variants in essential genes for microglial activation, such as Trem2. Thus, designing personalized therapeutics focused on microglia will be a promising strategy for AD patients.

# G. Summary





## 1. Introduction

Alzheimer's Disease (AD) is an irreversible neurodegenerative disorder, characterized by a progressive impairment of behavioral and cognitive functions including memory, comprehension, language, attention, reasoning, and judgment. It affects 35 mill people and its prevalence is predicted to increase four times by 2050 (Kumar and Tsao, 2020). Although many clinical trials have been conducted, to this day there is no cure for this disease (Atri, 2019; Muñoz-Castro et al., 2020), which turns it into a grave socio-sanitary problem.

AD can be inherited as an autosomal dominant disorder with nearly complete penetrance, although this variant, known as Familial AD, only represents a 5% of cases. Genetic mutations affect the amyloid precursor protein (APP), presenilin 1 (PS1) or/and presenilin 2 (PS2) ([www.alzforum.org](http://www.alzforum.org)). In contrast, most cases correspond to Sporadic AD, which has a latter onset and multifactorial origin with multiple risk factors, being aging the leading one (Robinson et al., 2017). Despite having a different origin and time of onset, both variants share symptomatology and histopathological lesions. AD is characterized by macroscopical alterations such as a reduction in brain volume and an increase in ventricle's size, and microscopical lesions (Hane et al., 2017). The most relevant microscopical alterations comprise (Guo et al. 2020): (i) extracellular amyloid deposits and soluble forms of the Abeta protein, (ii) accumulation of the hyperphosphorylated Tau protein as soluble forms or aggregated in neurofibrillary tangles, (iii) synaptic and neuronal loss, and (iv) a neuroinflammatory response mediated by microglial and astrocytic activation, and possibly accompanied by an infiltration of peripheral immune cells.

Due to previous treatment failure and considering genetic studies which have identified high-risk polymorphisms in genes implied in the glial response (Sancesario and Bernardini, 2018), neuroinflammation is growing in importance, being a potential therapeutic approach. Glial activation has been described as an early AD component (Gutierrez and Vitorica, 2018; Hane et al., 2017), although its role has not been dilucidated yet. Recently, our group has identified a loss of astrocytes' functions in mouse models and human samples of AD, with an impaired metabolism and a reduction of neuroprotective properties (Muñoz-Castro, 2021; Sanchez-Mico, 2019; manuscript in preparation).

On the other hand, a strong microglial activation, characterized by a pro-inflammatory and hyperreactive role has been reported in mouse models (Gutierrez and Vitorica, 2018; Jimenez et al., 2008, 2011; Moreno-Gonzalez et al., 2009). Novel transcriptomic studies have identified a transcriptional microglial profile in different pathological conditions (disease-associated microglia, DAM) (Deczkowska et al., 2018; Friedmann et al., 2018; Keren-Shaul et al., 2017; Krasemann et al., 2017). In contrast, a limited activation or even a dystrophic microglial phenotype have been described in human sample studies (Navarro et

al., 2018; Sanchez-Mejias et al., 2016; Scearce-Levie et al., 2020). In fact, although microglia interaction with Abeta soluble forms and amyloid plaques has been further more investigated (Mandrekar et al., 2009; St-Pierre et al., 2020; Yuan et al., 2016) than microglial response to Tau accumulation (Asai et al., 2015; Hopp et al., 2018; Maphis et al., 2015, Zhu et al., 2020), microglial contribution to the progression of both pathologies is still not clear. What is more, new models which better mimic human AD are needed (Gutierrez and Vitorica, 2018; Navarro et al., 2018), taking into account other comorbidities as vascular alterations, so common in AD patients (Iturria-Medina et al., 2016). A deeper research in microglial dysfunctional phenotype is required to propose therapeutic targets that will succeed in clinical trials.

Our hypothesis is that several factors, such as Abeta and Tau progression, mutations in genes related with microglial function, or vascular pathologies may define microglial phenotype. Also, microglia function will vary depending on every brain region and each stage of disease. Therefore, our main objective is to characterize the transcriptomic, metabolomic and functional microglial heterogeneity in different AD contexts, by using transgenic mouse models and AD human samples. Concretely, our specific aims are: (1) studying microglial phenotype in mouse models of Tau pathology, (2) characterizing the transcriptomic and metabolomic profile of active microglia in response to Abeta and Tau pathologies, (3) analysing microglial response under hypoxic conditions in human samples and mouse models, (4) developing a mouse model of microglial depletion in order to reproduce microglial dysfunction.

## 2. Methods

For experimental procedures, we used the amyloidogenic transgenic models APP (APP<sub>SL</sub>) and APP/PS1 (PS1 $\Delta$ exon9xAPPs), the tauopathies models, ThyTAU22 and TAU P301S (Line PS19); and the microglial depletion models CX3CR1<sup>CRE</sup>CSF1R<sup>flx/flx</sup> (CX3CSF1R) and APP<sub>SL</sub>CX3CR1<sup>CRE</sup>CSF1R<sup>flx/flx</sup> (APPCX3), using wildtype (WT) mice with same genetic background (C57BL/6) and age. We also employed human samples classified according to Braak stages (Braak and Braak, 1991); and the *in vitro* models: BV2 microglial line, SH-Tau neuronal line and primary cultures from WT and Trem2KO mice.

Depending on each study, the brain tissue or treated cells were subjected to biochemical and biomolecular studies (total RNA and protein extraction, isolation of soluble fractions S1) and/or to immunohistochemical studies (optical and/or confocal microscopy). For transcriptomic research, qPCR and microarrays (Affymetrix, ThermoScientific) techniques were employed. TAC and GSEA softwares were used for transcriptomic analysis. For protein quantification, western-blots were performed. For metabolic assays, Seahorse technology was chosen. Additionally, we used flow cytometry analysing or

sorting (Fluorescence-activated Cell Sorting) systems to quantify or/and isolate non-active and active microglial cells and to assess microglial death (by using an AnnexinV-PI staining).

To determine ATP concentration in the BV2 cell line, an ATP-Determining Kit, based on bioluminescence detection, was employed. For *in vivo* proliferation assays, mice were injected 3 times with 1.5 mg EdU (a nucleoside analogue that incorporates to DNA during replication), and EdU was detected by flow cytometry using the Edu-Click-iT Kit.

For hypoxia experiments, mice were subjected to a 9% O<sub>2</sub> environment for 21 days and SH-Tau cells or primary microglial cultures were subjected to a 1% O<sub>2</sub> environment for 24 hours. For microglial depletion, CX3CSF1R or APPCX3 mice were injected 75 mg/kg of tamoxifen for 7 days or were treated with a tamoxifen diet (40 mg/kg) for 1, 2 or 4 months. Tamoxifen treatment activated the Cre-recombinase system and led to CSF1R ablation and, consequently, to microglial death.

All experiments were repeated at least three times and were statistically analysed, choosing the corresponding test. Statistically significant differences were considered with  $p < 0.05$ .

### 3. Results and Discussion

Recent GWAS studies have highlighted the importance of neuroinflammation in AD by associating mutations in genes encoding microglial functions, such as Trem2 or ApoE, to a higher risk of developing the disease (Dansokho and Heneka, 2018; Lambert et al., 2013; Shao et al., 2017; Sims et al., 2017). Nevertheless, microglial response to Abeta and Tau pathology has not been clearly elucidated yet. Our group has previously described a clear microglial activation surrounding Abeta plaques and, at later ages, all over the parenchyma in amyloidogenic mouse models (Jimenez et al., 2008, 2011; Moreno-Gonzalez et al., 2009). In contrast, microglial response to Tau pathology has been poorly described, and our group has reported a microglial dystrophic phenotype in hippocampal AD patients (Sanchez-Mejias et al., 2016), where Tau pathology is more prominent than amyloid deposits. Therefore, we characterize microglial phenotype in two models of tauopathy (ThyTAU22 and TAU P301S) (Romero-Molina et al., 2018). While we observed a clear microglial activation in aged TAU P301S mice, non-significant microglial reactivity was reported in matched ThyTAU22 animals. Microglial activation has been widely described in different models of tauopathy (Belluci et al., 2004; Stozika et al., 2010; Wang et al., 2018) and in human patients of FTD (Bellucci et al., 2011), although there is still controversy about which Tau forms are responsible for it (Morales et al., 2013; Nilson et al., 2017; van Olst et al., 2020) and which the mechanism underlying this process is (Bolós et al., 2017; Nagamine et al., 2016).

In contrast, as soluble fractions (S1) isolated from AD human tissue were toxic for microglia *in vitro* (Sanchez-Mejias et al., 2016), we treated BV2 cells with S1 fractions from aged ThyTAU22 and TAU P301S mice. S1 fractions from the hippocampus of ThyTAU22 mice presented a relatively high content of soluble phospho-Tau (AT8+) and were highly toxic for microglial cells *in vitro*, whereas the correspondent S1 fractions from TAU P301S mice displayed low soluble phospho-Tau levels and were not toxic for microglial cells. In cases of toxicity, microglial death was mediated by an apoptotic mechanism, with activation of caspases 3, 8 and 9; but not as a consequence of a depletion of ATP reservoir. This opposite microglia response in the two mouse models of tauopathy is due to the distinct Tau forms. There was a higher expression, phosphorylation and aggregation of Tau in the TAU P301S model compared to the ThyTAU22. This difference is probably a consequence of the prionic promoter that precedes the inserted transgene in TAU P301S animals ([www.alzforum.org/research-models/tau-p301s-line-ps19](http://www.alzforum.org/research-models/tau-p301s-line-ps19)) in contrast to the Thy1 (neuron-specific) promoter of the ThyTAU22 model ([www.alzforum.org/research-models/thy-tau22](http://www.alzforum.org/research-models/thy-tau22)). In short, a high accumulation and aggregation of Tau is required for microglial activation, whereas soluble forms of phospho-Tau cause, as in neurons (Kopeikina et al., 2012), microglial toxicity.

Then, both in the amyloidogenic model APP and in the tauopathy model TAU P301S we have identified microglial reactivity. Next, we were interested in characterizing the profile of active microglia which reacts to Abeta and Tau pathologies. By FACS, we isolated reactive (Clec7a<sup>high</sup>) microglia and performed a transcriptomic analysis (micro-array). By GSEA, we identified which gene sets and functions were enriched in active versus quiescent microglia. As expected (Friedmann et al., 2018; Keren-Shaul et al., 2017; Krasemann et al., 2017), active microglia displayed a DAM phenotype, with an increased expression of activation genes (*Spp1*, *Axl*, *Itgax*, *ApoE*) and a decrease expression of homeostatic genes (*Tmem119*, *P2ry13*, *P2ry12*, *Cx3cr1*). Additionally, we observed that KEGG pathways related to neurodegeneration were significantly enriched in active microglia from APP and TAU P301S mice compared to WT. In concordance with previous studies (Friedman et al. 2018; Rexach et al. 2020), we also identified an enrichment in biological processes related to interferon and LPS response, to phagocytosis and to the complement activation in active microglia. Although microglial transcriptome in AD patients is still being characterized (Del-Aguila et al., 2019; Mathys et al., 2019; Nugent et al., 2020; Olah et al., 2018), our results showed some discrepancies with transcriptomic analysis in human samples (Gerrits et al., 2020; Zhou et al., 2020), which are probably due to the multiple contemporary factors present in AD human brains.

On the other hand, in contrast to the glycolytic metabolism described for immune cells activation (Diskin and Pålsson-McDermott, 2018), our results showed that active microglia from Abeta and Tau mouse models presented an oxidative metabolism, which is actually essential for microglial activation. There was a significant enrichment of the OXPHOS, the biosynthesis and assembly of mitochondrial complexes

and the cellular respiration processes in Clec7a<sup>high</sup> microglia. Additionally, by electron microscopy, in collaboration with Dra. Antonia Gutierrez's lab, we described a mitochondrial elongation in plaque-associated microglia from amyloidogenic models, which is a sign of maximal ATP production under restrictive contexts (Gomes et al., 2011; Li et al., 2017; Rambold et al., 2011; Rambold and Pearce, 2018). What is more, the increment of the maximal respiratory capacity after Abeta exposure was confirmed *in vitro* by metabolic assays (Seahorse experiments). Also, we demonstrated that Trem2 is required for microglial response to Abeta oligomers *in vitro* and we propose that, *in vivo*, microglial aerobic metabolism may be mediated via the Trem2-mTOR pathway, as previously defined (Ulland et al., 2017). The direct comparison of active microglia from APP and TAU P301S models revealed that a 50% of the differentially expressed genes compared to WT differed between them. However, few biological processes were significantly differentially enriched. In active microglia from TAU P301S mice compared to the APP model, there was an enrichment of the response to antigenic stimuli and an increase of the expression of histocompatibility genes, which may be due to the widespread propagation of Tau pathology in contrast to the packed amyloid plaques. On the other hand, the most enriched process in APP active microglia compared to the TAU model was the response to hypoxia (gene set defined by Dr. Pascual's laboratory). Therefore, in plaque-associated microglia, a balance between hypoxia pathways (HIF1 $\alpha$  activation) and the OXPHOS is taking place.

Considering the differences in microglial activation between mouse models and human samples (Gutierrez and Vitorica, 2018), and taking into account the importance of oxidative metabolism for microgliosis, we evaluated oxygen availability in AD brains. We found a significant increase of expression of the genes involved in hypoxia response, such as HIF1 $\alpha$  and its targets, suggesting that aerobic metabolism might be compromised in AD patients. In order to study microglial response under hypoxic conditions, we chronically subjected APP/PS1 (in collaboration with Dr. Pascual's group) and TAU P301S mice to a 9% O<sub>2</sub>, which led to a significant decrease in microglial reactivity in both cases. Actually, there was a significant reduction of plaque-associated microglia in hypoxic APP/PS1 mice, highlighting the role of active microglia in plaque compaction (Casali et al., 2020; Venegas et al., 2017). On the other hand, in TAU P301S mice subjected to hypoxia there was a reduction in Tau pathology, which suggests that active microglia are involved in Tau propagation (Asai et al., 2005; Maphis et al., 2015; Hopp et al., 2018). Back to human samples, in collaboration with Dra. Gutierrez's laboratory, a reduction in plaque-associated microglia was also observed in hypoxic prone areas, such as the dentate gyrus, compared to normoxic areas as the perirrhinal cortex. What is more, this reduction led to an increase of dystrophic neurites which points to the importance of microglia in the contention of pathology.

Apart from vascular alterations, we have shown that other factors such as soluble phospho-Tau forms or Trem2 deletion can affect microglia function. All these components may contribute to the dystrophic

microglial phenotype reported in AD samples (Sanchez-Mejias et al., 2016; Swanson et al., 2020). With the aim of studying the progression of Abeta and Tau pathologies in a context of microglial dysfunction, we have developed a conditional model of specific microglial depletion (CX3CR1<sup>CRE</sup>CSF1R<sup>flx/flx</sup>). In tCX3CSF1R mice, tamoxifen administration was followed by an unfunctional expression of CSF1R, which is essential for microglial viability (Han et al., 2017). We have demonstrated that a 7-days tamoxifen intraperitoneal administration led to a 95% microglial depletion in 2 month-old mice. This depletion was followed by a significant but variable microglia repopulation, a moderate microgliosis and an infiltration of lymphocytes, with no changes in astrocytic activation markers. Further experiments are required to determine if there is also an infiltration of monocyte-derived cells. Same patterns are observed in 12 month-old mice, suggesting that mild aging does not affect microglial capacities.

On the other hand, oral administration of tamoxifen for a month in young CX3CSF1R mice carried out a highly variable microglial depletion and, consistent with the acute treatment, microglial activation was higher as fewer levels of microglia. After two months treatment, there was a stablished balance between microglia depletion and repopulation which led to normal microglial total levels and no reactivity. In contrast, a four months tamoxifen treatment caused a reduction in microglial levels. In eight month-old APPCX3 mice, this microglial reduction led to a moderate increase of microgliosis and a non-significant decrease of Abeta pathology, in accordance with some studies (Casali et al., 2020; Spangenberg et al., 2019). In contrast, APPCX3 mice treated with tamoxifen from eight to twelve month-old showed a reduction of micro- and astrogliosis and no changes in Abeta pathology. As microglia depletion is a state-of-the-art technique, controversial publications are often found and our results are preliminary to draw conclusions (Green et al., 2020; Spangenberg and Green, 2017). However, this model will be enormously useful to determine microglial role in the progression of AD.

In short, microglial phenotype may change across AD progression (Hashemiaghdam et al., 2020; Rexach et al., 2020; Yuan et al., 2020). While active microglia may pack Abeta deposits, containing amyloid toxicity (Wang et al., 2016), it may also contribute to Tau spread (Asai et al., 2015; Hopp et al., 2018). However, different factors, such as Trem2 mutations or low oxygen availability, compromise microglial oxidative metabolism and, then, lead to microglial dysfunction (Gutierrez and Vitorica, 2018). The deep knowledge of microglial heterogeneity is essential to propose efficient therapeutic targets for AD.

## 4. Conclusions

1. In Tau mouse models, distinct Tau forms lead to a different microglial response. In the TAU P301S model, there is a high Tau phosphorylation and aggregation associated with a pronounced microglial activation, whereas in the ThyTAU22 model, there is no microgliosis. In contrast, soluble phospho-Tau species from the ThyTAU22 model, but not from the TAU P301S model, are toxic for microglial cells *in vitro*.
2. Active microglia from Abeta and Tau mouse models present an inflammatory, phagocytic and neurodegeneration-associated transcriptomic profile. Chronic microglial activation is sustained by an oxidative metabolism, accompanied by mitochondrial elongation, and mediated through the Trem2-mTOR pathway. Trem2 impairment alters microglial response to Abeta pathology *in vitro*.
3. In plaque-associated microglia, there is a balance between the oxidative metabolism and the induction of the hypoxic response. Under a diminution of oxygen availability, microglial response to Abeta oligomers *in vitro* is compromised and, in APP/PS1 mice, there is a reduction in plaque-associated microglia. These results confer a protective role to microglia towards Abeta pathology.
4. In Braak V-VI AD samples, there is an increase of hypoxia-related markers. Brain hypoxic regions, such as the dentate gyrus, show a significant diminution of plaque-associated microglia, which leads to an increase of neuritic dystrophies.
5. Under hypoxia, which compromises oxidative metabolism, there is a significant reduction in microglial activation in TAU P301S mice. In this case, it produces a relevant amelioration of Tau pathology, suggesting that active microglia are implied in Tau propagation.
6. The development of a microglial depletion model will allow us to study Abeta and Tau progression when microglial levels are reduced or/and when a microglial continuous replacement is taking place. *In vivo* microglial depletion carries on with microglial, but no astroglial, reactivity and lymphocytes infiltration. It is followed by a variable microglia repopulation, which can be partially compromised by prolonged treatments. In eight month-old APPCX3 mice, microglia depletion leads to a light diminution of Abeta content, although further experiments are required.
7. In AD, microglial phenotype and function depend on the degree of development of Abeta and Tau pathologies, on resources availability and on the presence of risk variants in essential genes for microglial activation, such as Trem2. Thus, designing personalized therapeutics focused on microglia will be a promising strategy for AD patients.





# **H. Anexo: Tablas Suplementarias**



GENE SET	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val
MGnD	23	0.9228303	2.6889203	0	0	0
GO_RESPONSE_TO_TYPE_I_INTERFERON	52	0.7542775	2.6623592	0	0	0
HMM	103	0.65344864	2.6124372	0	0	0
GO_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	78	0.6874395	2.611758	0	0	0
GO_ELECTRON_TRANSPORT_CHAIN	86	0.64532167	2.477285	0	0	0
GO_RESPONSE_TO_VIRUS	203	0.5534401	2.4559107	0	2.79E-04	0.001
GO_ESTABLISHMENT_OF_PROTEIN_LOCALIZATION_TO_ENDOPLASMIC_RETICULUM	82	0.63902855	2.4442043	0	2.39E-04	0.001
GO_NEGATIVE_REGULATION_OF_VIRAL_GENOME_REPLICATION	37	0.73592675	2.4367208	0	2.09E-04	0.001
GO_CELLULAR_RESPIRATION	129	0.5819344	2.4079	0	1.86E-04	0.001
GO_TRANSLATIONAL_TERMINATION	89	0.6158077	2.3817842	0	1.67E-04	0.001
GO_MITOCHONDRIAL_RESPIRATORY_CHAIN_COMPLEX_I_BIOGENESIS	50	0.6692729	2.371788	0	1.52E-04	0.001
GO_TRANSLATIONAL_INITIATION	117	0.5833896	2.3708005	0	1.39E-04	0.001
GO_DEFENSE_RESPONSE_TO_VIRUS	128	0.57058376	2.3646624	0	1.29E-04	0.001
GO_NEGATIVE_REGULATION_OF_TUMOR_NECROSIS_FACTOR_SUPERFAMILY_CYTOKINE_PRODUCTION	38	0.7159937	2.3238938	0	2.35E-04	0.002
GO_PROTEIN_TARGETING_TO_MEMBRANE	134	0.55345684	2.3151295	0	2.19E-04	0.002
GO_REGULATION_OF_VIRAL_GENOME_REPLICATION	60	0.64142233	2.3051248	0	2.06E-04	0.002
GO_NUCLEOSIDE_TRIPHOSPHATE_METABOLIC_PROCESS	206	0.51931566	2.3028426	0	1.94E-04	0.002
GO_REGULATION_OF_MYELOID_CELL_APOPTOTIC_PROCESS	22	0.7875541	2.29638	0	2.73E-04	0.003
GO_CELLULAR_RESPONSE_TO_VIRUS	22	0.77172697	2.2848737	0	2.58E-04	0.003
GO_RESPONSE_TO_INTERFERON_ALPHA	18	0.819603	2.2813299	0	2.45E-04	0.003

**Tabla Suplementaria 1.** Los 20 GeneSet de la categoría “Biological Processes” que más incrementan su expresión en la microglía activa aislada de ratones APP de 12 meses versus WT de 12 meses.

GENE SET	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val
KEGG_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	118	0.679331	2.7828355	0	0	0
KEGG_PARKINSONS_DISEASE	111	0.6742341	2.755289	0	0	0
KEGG_RIBOSOME	67	0.6682183	2.4846323	0	0	0
KEGG_ALZHEIMERS_DISEASE	153	0.58366257	2.4422264	0	0	0
KEGG_HUNTINGTONS_DISEASE	163	0.559629	2.3987067	0	0	0
KEGG_LYSOSOME	114	0.53582966	2.1683395	0	9.79E-05	0.001
KEGG_COMPLEMENT_AND_COAGULATION_CASCADES	60	0.57313347	2.060453	0	7.98E-04	0.009
KEGG_PROTEASOME	43	0.5995316	2.0500093	0	9.25E-04	0.011
KEGG_RIG_I_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	62	0.54792887	1.9877211	0	0.00212041	0.028
KEGG_GLYCOSAMINOGLYCAN_DEGRADATION	18	0.6980467	1.9607701	0	0.00268231	0.037
KEGG_ECM_RECEPTOR_INTERACTION	81	0.5040417	1.9364214	0	0.0030338	0.044
KEGG_CYTOSOLIC_DNA_SENSING_PATHWAY	48	0.5336751	1.8668687	0	0.0074381	0.11
KEGG_PHENYLALANINE_METABOLISM	16	0.6935529	1.8420801	0	0.00900573	0.14
KEGG_OTHER_GLYCAN_DEGRADATION	15	0.6907991	1.8368279	0.00442	0.00922094	0.149
KEGG_LEISHMANIA_INFECTIO	51	0.5030603	1.7673132	0	0.01932805	0.288
KEGG_HEMATOPOIETIC_CELL_LINEAGE	65	0.47645533	1.7542772	0	0.02021372	0.306
KEGG_TOLL_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	95	0.44551805	1.7514067	0.00222	0.02015885	0.315
KEGG_TERPENOID_BACKBONE_BIOSYNTHESIS	15	0.65603393	1.7263702	0.00840	0.02372844	0.365
KEGG_P53_SIGNALING_PATHWAY	60	0.48848727	1.7153679	0.00652	0.02546326	0.393
KEGG_MELANOMA	66	0.45683494	1.6652275	0.0043	0.03868288	0.532

**Tabla Suplementaria 2.** Los 20 GeneSet de la categoría “Rutas Kegg” que más incrementan su expresión en la microglía activa aislada de ratones APP de 12 meses versus WT de 12 meses.

Gen	linealFC	P.Val	adj.P.Val
Plekhb2	2.14	0.0005	0.0149
Cox5b	1.92	0.0002	0.0072
Ilf1rl1	2.83	0.001	0.0243
Rpl29	2.17	0.0002	0.0085
Stat1	4.84	2.36E-05	0.0017
Casp8	-2.37	3.99E-05	0.0024
Fzd7	2.27	0.0008	0.0202
Nrp2	2.9	0.0012	0.0264
Eef1b2	2.9	0.0002	0.0066
Cxcr2	-1.71	0.0011	0.0253
Slc11a1	1.95	0.0017	0.0333
Speg	1.82	0.001	0.023
Sp100	7.47	7.45E-08	2.99E-05
Inpp5d	-1.82	0.0018	0.0353
Ugt1a	1.69	0.0022	0.0412
Lrrfip1	1.93	0.0027	0.0471
Ramp1	6.45	8.32E-08	3.13E-05
Fam174a	1.99	0.0024	0.043
Ccnt2	-2.58	0.0013	0.0281
Fam72a	-3.38	1.17E-05	0.0011
Ctse	9.11	4.60E-08	2.22E-05
Rab7b	7.31	4.71E-07	9.87E-05
Adipor1	1.87	0.0022	0.0414
Tmem9	2.4	0.0028	0.0474
Ptgs2	15.46	6.31E-07	0.0001
Ivns1abp	-3.77	2.97E-05	0.002
Glul; Mir8114	-2.02	0.0001	0.0055
Acbd6	1.84	0.0004	0.0126
Creg1	3.07	4.17E-05	0.0025
Ildr2	2.25	0.0006	0.0157
Rxrg	2.1	0.0005	0.0134
Olfml2b	-2.25	0.0018	0.0355
Fcgr4	5.77	8.94E-06	0.0009
Cd244	2.52	0.0002	0.0083
Cd48	3	0.0002	0.0079
Cd84	1.93	0.0002	0.0087
Slamf9	4.74	5.89E-06	0.0006
Tagln2	3.52	0.0007	0.0173
Pyhin1	6.45	3.61E-07	8.57E-05
Pydc3	3.01	0.0004	0.0117
Tlr5	-3.32	0.0003	0.0092
Plxna2	2.06	0.0026	0.046
Cd34	3.08	1.47E-05	0.0012
Coa5	2.05	0.0004	0.011
Mgat4a	-2.81	0.0024	0.0436
Rnf149	5.75	4.13E-05	0.0025
Tgfbrap1	-1.82	0.0008	0.0204
Slc40a1	-3.4	2.45E-05	0.0017
Myo1b	-2.92	0.0002	0.0061
Pgap1	1.72	0.0022	0.0404

Gen	linealFC	P.Val	adj.P.Val
Clk1	-2.01	0.0004	0.0113
Fn1	5.16	0.0026	0.0458
Ap1s3	1.54	0.0014	0.0306
Serpine2	6.9	3.63E-07	8.57E-05
Dock10	-3.62	1.37E-05	0.0012
Hjurp; 6430706D22Rik	-2.53	1.94E-05	0.0015
Myeov2	3.21	2.96E-05	0.002
Pdcd1	2.86	0.0026	0.0456
Bcl2	2.28	0.0019	0.0362
Dbi	2.63	0.0015	0.0313
Tmem163	3.78	0.0001	0.0055
Cxcr4	12.4	1.17E-07	3.77E-05
Mapkapk2	3.13	2.02E-05	0.0015
Srgap2	-3.63	1.25E-06	0.0002
Cdk18	2.91	2.72E-06	0.0004
Snrpe	2.01	5.02E-05	0.0028
Btg2	-2.31	0.0005	0.0132
Adora1	2.54	9.99E-05	0.0047
Rgs2	-3.5	1.57E-06	0.0003
Rgs1	-2.01	0.0025	0.045
Lamc1	1.86	0.002	0.0375
E330020D12Rik	-1.81	0.0022	0.041
Ier5	-2.55	9.72E-05	0.0046
Soat1	4.02	1.26E-05	0.0011
Ralgps2	-2.12	0.0006	0.0166
Prdx6	2.72	0.0001	0.0058
Uck2	2.22	0.0004	0.0113
Mgst3	2.53	0.0011	0.0244
Hsd17b7	2.29	0.0012	0.0266
Fcgr2b	2.4	0.0002	0.0062
Fcer1g	1.86	0.0024	0.0431
Ly9	7.43	1.23E-05	0.0011
Slamf7	4.33	1.79E-05	0.0014
Pea15a	3.19	0.0001	0.0061
Gm4955	3.15	5.50E-05	0.003
BC094916	3.45	2.75E-05	0.0019
Pydc4	4.49	2.20E-05	0.0016
Al607873	48.32	8.40E-11	2.59E-07
Akt3	2.32	0.0012	0.0266
Gm5069	2.18	0.0024	0.043
Ephx1	6.77	1.16E-06	0.0002
Degs1	2.7	0.002	0.0376
Smyd2	1.98	0.0008	0.0191
Fam71a	-4.84	6.73E-05	0.0035
Atf3	-2.92	8.87E-06	0.0009
Nenf	2.8	2.01E-05	0.0015
Gm7694	-2.44	0.0001	0.0053
Nos1ap	-3.51	7.37E-06	0.0008
Ifi204	54.72	4.00E-11	1.78E-07
Mnda	41.93	2.91E-11	1.62E-07

**Tabla suplementaria 3.** Los 100 genes que más se expresan diferencialmente en la microglía activa aislada de ratones APP 12 meses versus WT de 12 meses. FC= fold-change.

Gen	linealFC	P.Val	adj.P.Val
Ramp1	3.18	3.03E-05	0.0108
Ctse	3.68	2.84E-06	0.0025
Slamf9	-2.07	0.0002	0.0367
Plxna2	2.45	7.40E-05	0.0189
Serpine2	3.46	4.59E-07	0.0007
Tmem163	3.3	2.50E-05	0.0097
Etl4	9.26	1.54E-08	5.70E-05
Pdk1	2.56	0.0002	0.0367
Cst7	2.87	1.22E-05	0.0063
Gatm	-3.64	1.32E-06	0.0016
Tgm2	-2.73	3.30E-05	0.0111
Gm20721	2.41	8.96E-05	0.0216
Fabp5	5.28	2.25E-06	0.0022
Postn	-7.89	2.98E-07	0.0006
Tmem154	3.67	0.0002	0.0334
F3	3.39	6.60E-05	0.0172
Dkk2	4.53	1.81E-05	0.0076
Fdps	2.48	3.11E-05	0.0108
Nexn	4.09	0.0002	0.0386
Slc2a1	3.29	4.74E-05	0.0139
Fabp3	6.17	3.18E-06	0.0026
Fgr	-2.91	1.87E-05	0.0077
Sdf4	1.8	0.0002	0.0422
Abca1	-2.66	3.60E-05	0.0114
Actr3b	3.56	9.78E-06	0.0054
Insig1	2.14	0.0002	0.0422
Gm1673	6.83	0.0003	0.05
Cyp51	2.22	0.0002	0.04
Asb10	2.76	0.0002	0.04
Lgi2	6.29	1.08E-06	0.0016
Arap2	2.28	5.53E-05	0.0153
Hpse	3.64	2.63E-05	0.0099
Gusb	2.61	3.16E-05	0.0108
Serpine1	2.77	3.83E-05	0.0118
Zfand2a	2.77	0.0001	0.0319
Gpnmb	11.98	0.0001	0.0299
Clec4a3	-2.85	0.0002	0.0392
Tmsb10	-1.96	0.0002	0.0367
Tpi1	2.97	2.19E-06	0.0022
Lag3	-3.49	2.45E-06	0.0023
Klrb1a	-4.98	1.95E-06	0.0021
BC035044	-2.36	0.0002	0.0367
Clec1a	3.17	5.76E-06	0.0038
Olr1	-19.48	1.75E-05	0.0076
Klrb1c	-4.16	3.55E-05	0.0114
Klrb1b	-2.84	7.28E-05	0.0188
Siglecf	-5.26	1.37E-06	0.0016
Klk8	-5.35	4.52E-07	0.0007
Ldha	1.96	1.00E-04	0.0239
Trpm1	3.93	1.64E-05	0.0076

Gen	linealFC	P.Value	adj.P.Val
Lsp1	2.36	1.39E-05	0.0066
Cpeb1	2.18	5.96E-05	0.016
Gm1966	2.86	8.43E-05	0.0208
Ifitm2	3.66	3.99E-06	0.0029
Mmp2	-4.47	5.58E-06	0.0038
Gas6	4.35	6.96E-06	0.0042
Msmo1	3.28	2.27E-05	0.009
Ldlr	6	6.70E-08	0.0002
Fxyd6	-2.71	3.10E-06	0.0026
Anxa2	3	7.74E-05	0.0193
Myo1e	4.53	8.65E-06	0.0051
Tmem205	2.82	3.37E-05	0.0112
St14	2.54	1.04E-05	0.0055
Aplp2	2.84	3.79E-06	0.0029
Sc5d	4.22	6.90E-08	0.0002
Slc24a1	2.09	0.0001	0.0299
Tln2	2	0.0001	0.0284
Plp2	5.77	4.76E-08	0.0002
Ndufa1	2.89	0.0001	0.0244
Tsc22d3	2.19	0.0002	0.0379
Prdx4	2.89	0.0002	0.04
Il2rg	-2.32	0.0003	0.0482
Igf1	18.06	3.10E-07	0.0006
Adarb1	7.42	1.38E-06	0.0016
Il12b	-4.1	3.77E-06	0.0029
Pmp22	2.52	1.03E-05	0.0055
Wfdc17	5.13	5.19E-05	0.0148
Mrc2	4.02	1.68E-05	0.0076
Slc16a3	2.56	8.88E-05	0.0216
Scimp	-2.84	3.65E-05	0.0114
Ccl9	-4.13	1.19E-06	0.0016
Ccl6	-2.08	0.0001	0.0299
Gfap	3.7	0.0002	0.0367
Cd300lh	-2.33	0.0002	0.0361
Hif1a	2.72	4.06E-05	0.0124
Adssl1	2.3	0.0001	0.024
Egln3	12.61	8.06E-09	4.16E-05
Gcnt2	6.13	1.30E-05	0.0064
Mir23b; Mir27b; Mir24-1	2.41	3.15E-05	0.0108
Arsb	2.15	2.84E-05	0.0103
Plpp1	2.48	2.73E-05	0.0101
Hmgcr	2.52	1.98E-05	0.008
Zswim6	-2.2	0.0001	0.0241
Stab1	-4.7	6.06E-06	0.0038
Ero1l	4.01	6.82E-06	0.0042
Dab2	3.91	8.88E-06	0.0051
Ank; Mir7117	3.53	2.54E-05	0.0097
Dcstamp	4.42	7.54E-08	0.0002
Pick1	2.53	7.55E-05	0.019
Syng1	2.71	3.47E-05	0.0113

**Tabla suplementaria 4.** Los 100 genes que más se sobre-expresan en la microglía activa aislada de ratones APP 12 meses versus TAU P301S de 9 meses. FC= fold-change.

GENE SET	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val
MGnD	23	0.9207887	2.744874	0	0	0
GO_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	78	0.6775043	2.619506	0	0	0
GO_RESPONSE_TO_VIRUS	203	0.55701816	2.5542612	0	0	0
GO_RESPONSE_TO_TYPE_I_INTERFERON	52	0.701858	2.5456405	0	0	0
GO_ELECTRON_TRANSPORT_CHAIN	86	0.6367853	2.505443	0	0	0
GO_DEFENSE_RESPONSE_TO_VIRUS	128	0.57914907	2.4893923	0	0	0
GO_INNATE_IMMUNE_RESPONSE	426	0.49219236	2.4303033	0	0	0
GO_REGULATION_OF_HUMORAL_IMMUNE_RESPONSE	41	0.70449275	2.4189165	0	2.15E-04	0.001
GO_RESPONSE_TO_INTERFERON_GAMMA	101	0.5891966	2.3989692	0	1.91E-04	0.001
GO_NEGATIVE_REGULATION_OF_MULTI_ORGANISM_PROCESS	130	0.55365926	2.37414	0	1.72E-04	0.001
GO_POSITIVE_REGULATION_OF_LEUKOCYTE_MIGRATION	99	0.5695264	2.3589447	0	3.08E-04	0.002
GO_MITOCHONDRIAL_TRANSLATION	102	0.56856257	2.3295555	0	4.27E-04	0.003
GO_TRANSLATIONAL_TERMINATION	89	0.5755684	2.3284492	0	3.94E-04	0.003
GO_HUMORAL_IMMUNE_RESPONSE	113	0.5510709	2.327858	0	3.66E-04	0.003
GO_POSITIVE_REGULATION_OF_LYMPHOCYTE_MIGRATION	23	0.75173855	2.325868	0	3.41E-04	0.003
GO_CELLULAR_RESPIRATION	129	0.5432847	2.320308	0	3.20E-04	0.003
GO_MITOCHONDRIAL_RESPIRATORY_CHAIN_COMPLEX_I_BIOGENESIS	50	0.64401394	2.3139634	0	3.01E-04	0.003
GO_IMMUNE_EFFECTOR_PROCESS	374	0.47052345	2.3068929	0	2.84E-04	0.003
GO_HYDROGEN_ION_TRANSMEMBRANE_TRANSPORT	94	0.55342185	2.2439282	0	9.02E-04	0.01
GO_RESPONSE_TO_INTERFERON_BETA	21	0.76018727	2.2371962	0	9.44E-04	0.011

**Tabla Suplementaria 5.** Los 20 GeneSet de la categoría “Biological Processes” que más incrementan su expresión en la microglía activa aislada de ratones TAU P301S de 9 meses versus WT de 12 meses.



GENE SET	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val	FWER p-val
KEGG_OXIDATIVE_PHOSPHORYLATION	118	0.653765	2.725836	0	0	0
KEGG_PARKINSONS_DISEASE	111	0.630847	2.631332	0	0	0
KEGG_HUNTINGTONS_DISEASE	163	0.549809	2.443982	0	0	0
KEGG_RIBOSOME	67	0.630046	2.402821	0	0	0
KEGG_ALZHEIMERS_DISEASE	153	0.527733	2.283746	0	0	0
KEGG_COMPLEMENT_AND_COAGULATION_CASCADES	60	0.587416	2.120962	0	0.000778	0.008
KEGG_RIG_I_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	62	0.534162	2.033476	0	0.001314	0.015
KEGG_PROTEASOME	43	0.588214	2.005944	0	0.002006	0.024
KEGG_TOLL_LIKE_RECEPTOR_SIGNALING_PATHWAY	95	0.491128	1.987224	0	0.002541	0.031
KEGG_HEMATOPOIETIC_CELL_LINEAGE	65	0.520002	1.951910	0	0.003441	0.041
KEGG_ECM_RECEPTOR_INTERACTION	81	0.483996	1.936878	0	0.004178	0.052
KEGG_CYTOKINE_CYTOKINE_RECEPTOR_INTERACTION	221	0.413145	1.882135	0	0.007278	0.094
KEGG_PPAR_SIGNALING_PATHWAY	60	0.491464	1.832343	0	0.011627	0.151
KEGG_CARDIAC_MUSCLE_CONTRACTION	73	0.448982	1.776844	0	0.017747	0.252
KEGG_CYTOSOLIC_DNA_SENSING_PATHWAY	48	0.499437	1.760600	0.002457	0.020568	0.296
KEGG_LYSOSOME	114	0.414351	1.741845	0	0.023382	0.331
KEGG_LEISHMANIA_INFECTION	51	0.476766	1.724411	0.007194	0.025907	0.376
KEGG_CELL_ADHESION_MOLECULES_CAMS	108	0.410309	1.718731	0	0.026905	0.394
KEGG_GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL_GPI_ANCHOR_BIOSYNTHESIS	23	0.571761	1.706027	0.011710	0.029030	0.421
KEGG_CHEMOKINE_SIGNALING_PATHWAY	168	0.373615	1.680499	0	0.035168	0.5

**Tabla Suplementaria 6.** Los 20 GeneSet de la categoría “Rutas Kegg” que más incrementan su expresión en la microglía activa aislada de ratones TAU P301S de 9 meses versus WT de 12 meses.

Gen	linealFC	P.Val	adj.P.Val
Cox5b	1.67	0.0019	0.0386
Il1r1	2.02	0.0006	0.0183
Rpl29	2.4	5.65E-05	0.0042
Tpp2	-1.94	0.0019	0.0387
Stat1	5.56	1.68E-05	0.002
Spats2l	1.93	0.0012	0.0286
Ndufb3	2.31	0.0023	0.0446
Casp8	-2.5	8.44E-06	0.0013
Nbeal1	-2.49	0.0006	0.0184
Eef1b2	3.62	0.0006	0.0181
Slc11a1	2.24	0.0004	0.0135
Speg	1.89	0.0016	0.0342
Sp100	7.2	8.92E-07	0.0003
Inpp5d	-1.88	0.0007	0.0208
Ramp1	1.98	8.95E-05	0.0058
Ccnt2	-2.3	0.0001	0.008
Fam72a	-2.92	2.61E-06	0.0005
Ctse	2.79	1.49E-05	0.0018
Rab7b	3.39	1.47E-05	0.0018
Tmem9	1.8	0.0025	0.047
Ptgs2	15.76	2.20E-06	0.0005
Ivns1abp	-4.08	3.89E-06	0.0007
Glul; Mir8114	-2.45	0.0001	0.0074
Gm2000	2.06	0.0021	0.0419
Creg1	2.51	0.0002	0.0096
Fcgr4	13.85	3.83E-07	0.0002
Cd48	4.61	4.08E-05	0.0036
Cd84	2.59	4.38E-06	0.0008
Slamf9	9.49	8.25E-07	0.0003
Pyhin1	4.47	0.0001	0.0077
Tlr5	-3.99	0.0005	0.0156
Cd34	4.41	6.30E-07	0.0002
Ptp4a1; Gm13363	-1.68	0.0015	0.0338
Rnf149	5.86	1.20E-05	0.0017
Tgfbra1	-1.51	0.0024	0.0458
Mettl21c	-2.25	0.0003	0.0125
Slc40a1	-2.19	0.0012	0.0287
Myo1b	-3.01	5.62E-05	0.0042
Stk17b	-1.67	0.0027	0.0487
Pgap1	2.91	0.0001	0.0061
Ankrd44	-1.81	0.0022	0.0439
Clk1	-1.86	0.0006	0.0188
Fn1	2.7	0.0011	0.0275
Serpine2	2.06	0.0019	0.0396
Dock10	-2.48	0.0004	0.0148
Slc19a3	-1.93	0.0005	0.0158
Hjrp; 6430706D22Rik	-2.7	2.40E-05	0.0026
Myeov2	3.5	4.88E-05	0.004
Pdcd1	2.91	0.0005	0.0156
Cxcr4	7.27	1.83E-06	0.0004

Gen	linealFC	P.Value	adj.P.Val
Mapkapk2	3.39	0.0002	0.0087
Srgap2	-2.81	1.55E-05	0.0019
Cdk18	2.35	0.0001	0.008
Snrpe	2.26	1.19E-05	0.0017
Zbed6; Zc3h11a	-1.86	0.0026	0.0482
Btg2	-2.07	0.0006	0.0183
Ppfia4	2.36	0.0015	0.0338
Rnf2	-1.82	0.0021	0.0418
Ier5	-2.01	0.0024	0.0452
Soat1	3.04	3.91E-05	0.0035
Tor3a	2.27	0.0009	0.0241
Ralgps2	-2.23	5.27E-05	0.0041
Fcer1g	2.24	0.0002	0.0086
Ppox	-2.04	0.0002	0.009
Ly9	6.67	7.00E-05	0.005
Slamf7	6.57	1.49E-05	0.0018
Pea15a	3.06	8.27E-05	0.0055
Slamf8	2.53	0.0005	0.0158
Gm4955	2.43	0.0013	0.0307
BC094916	3.88	8.99E-06	0.0013
AI607873	33.31	1.83E-08	1.94E-05
Cep170	-2.11	0.0004	0.0135
Akt3	2.3	0.0011	0.0267
Ephx1	9.83	4.65E-08	3.56E-05
Lbr	-1.71	0.0021	0.0419
DeGs1	1.98	0.0012	0.0287
Gm3837	1.57	0.0023	0.0446
Fam71a	-4.11	0.0009	0.0236
Atf3	-1.82	0.0014	0.0314
Nenf	2.05	0.0005	0.0165
Gm7694	-1.84	0.0014	0.0325
Nos1ap	-4.01	7.60E-05	0.0053
Ifi204	67.71	1.23E-10	5.47E-07
Mnda	51.23	6.24E-10	1.39E-06
Mndal	5.24	6.50E-06	0.001
Slc39a12	-2.66	0.0023	0.0441
Cacnb2	-2.27	0.0002	0.0097
Mllt10	-1.77	0.0026	0.0474
Etl4	8.01	8.19E-07	0.0003
Il1rn	27.3	5.62E-07	0.0002
Rpl7a	1.84	0.0022	0.0426
Cacfd1	1.71	0.0007	0.0211
Setx	2.38	0.0016	0.0347
Ass1; Gm5424	3.51	0.0024	0.0454
Abl1	-2.17	0.0019	0.0396
Rpl12; Snora65	5.59	1.34E-05	0.0018
Hspa5	-2.33	7.44E-05	0.0052
Ptgs1	-4.51	7.22E-07	0.0002
Arhgap15	2.89	8.49E-05	0.0056
Epc2	-1.53	0.0024	0.0459

**Tabla suplementaria 7.** Los 100 genes que más se expresan diferencialmente en la microglía activa aislada de ratones TAU P301S de 9 meses versus WT de 12 meses. FC= fold-change.

Gen	linealFC	P.Val	adj.P.Val
H2-Ab1	9.1	2.02E-09	2.48E-05
H2-Eb1	21.09	3.34E-09	2.48E-05
Cd74; Mir5107	8.12	3.34E-09	2.48E-05
Postn	7.89	2.98E-07	0.0006
Klk8	5.35	4.52E-07	0.0007
Ccl9	4.13	1.19E-06	0.0016
Gatm	3.64	1.32E-06	0.0016
Siglecf	5.26	1.37E-06	0.0016
H2-Aa	6.03	1.85E-06	0.0021
Klrb1a	4.98	1.95E-06	0.0021
Lag3	3.49	2.45E-06	0.0023
Fxyd6	2.71	3.10E-06	0.0026
Il12b	4.1	3.77E-06	0.0029
Mmp2	4.47	5.58E-06	0.0038
Stab1	4.7	6.06E-06	0.0038
C3	4.06	1.28E-05	0.0064
Tmem173	2.18	1.72E-05	0.0076
Olr1	19.48	1.75E-05	0.0076
Cfb	9.07	1.82E-05	0.0076
Fgr	2.91	1.87E-05	0.0077
Tgm2	2.73	3.30E-05	0.0111
Klrb1c	4.16	3.55E-05	0.0114
Abca1	2.66	3.60E-05	0.0114
Scimp	2.84	3.65E-05	0.0114
H2-DMa	2.81	4.46E-05	0.0134
Tnf	4.21	4.66E-05	0.0138
Ms4a6d	3.21	5.00E-05	0.0144
Lst1	2.84	5.91E-05	0.016
Klrb1b	2.84	7.28E-05	0.0188
Zswim6	2.2	0.0001	0.0241
Ccl6	2.08	0.0001	0.0299
Gm11710; Gm11711; Cd300lh	2.33	0.0002	0.0361
Slamf9	2.07	0.0002	0.0367
Tmsb10	1.96	0.0002	0.0367
BC035044	2.36	0.0002	0.0367
Clec4a3	2.85	0.0002	0.0392
Il2rg	2.32	0.0003	0.0482

**Tabla suplementaria 8.** Genes, con un p-valor ajustado <0.05, que se sobre-expresan en la microglía activa aislada de ratones TAU P301S de 9 meses versus APP de 12 meses. FC= fold-change

# **I. Abreviaturas**



- a2-M:** a2-macroglobulina
- AD:** *Alzheimer's Disease*
- ADAM:** *A desintegrin and metalloprotease*
- ADN:** ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)
- ALDH:** aldehido deshidrogenasa
- AICD:** dominio/fragmento intracelular del APP
- AMPA:** *a-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*
- ANOVA:** *one-way analysis of variance*
- APC:** *Allophycocyanin*
- ApoE:** apolipoproteína E
- ApoJ:** apolipoproteína J (clusterina)
- APP:** Proteína precursora amiloide (*amyloid precursor protein*)
- APP-CTF:** fragmento C-terminal del APP
- AQP:** aquaporina
- ARN:** ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)
- ARNm:** ARN mensajero
- BACE:** *beta-site APP cleaving enzyme* (b-secretasa)
- BHE:** Barrera hematoencefálica
- BSA:** albúmina de suero bovina (*bovine serum albumin*)
- BTIN:** Banco de Tejido para Investigación Neurológica
- CA1:** región CA1 del hipocampo
- CAA:** angiopatía amiloide cerebral (*cerebral amyloid angiopathy*)
- CaCl<sub>2</sub>:** cloruro de calcio
- Cdk5:** *Cyclin dependent kinase 5*
- CD33:** *cluster of differentiation 33*
- CD:** células dendríticas
- CDM:** células derivadas de monocitos
- CE:** corteza entorrinal
- CIEN:** Fundación Centro de Investigación Enfermedades Neurológicas
- CITIUS:** Centro de Investigación Tecnológica e Innovación de la Universidad de Sevilla
- CLU:** Clusterina
- CNS:** *Central Nervous System*
- CR1:** receptor del complemento 1 (*complement receptor 1*)
- CR3:** receptor del complemento 3 (*complement receptor 3*)
- C<sub>t</sub>:** ciclo *threshold*
- C83:** fragmento C-terminal del APP (APP-CTF) de 83 aminoácidos
- C99:** fragmento C-terminal del APP (APP-CTF) de 99 aminoácidos
- DAB:** 3-3'diaminobencidina tetrahidro-clorhídrico
- DAM:** *disease-associated microglia*
- DAMPs:** damage associated molecular patterns
- DEPC:** dietilpirocarbonato
- DG:** giro dentado (*dentate gyrus*)
- DMSO:** dimetilsulfóxido
- dNTP:** desoxirribonucleótidos
- DPX:** dibutil ftalato
- EA:** Enfermedad de Alzheimer
- ECAR:** *extracellular acidification rate*
- ECE:** enzima convertidora de endotelina (*Endothelin converting enzyme 1*)
- EDTA:** ácido etilendiaminotetraacético (*ethylene diamine tetra acetate*)
- EOAD:** Early onset Alzheimer's Disease
- FACS:** clasificación de células activada por fluorescencia (*Fluorescence-activated Cell Sorting*)

**FAD:** Alzheimer Familiar (*Familial Alzheimer's Disease*)

**FAO:** oxidación de ácidos grasos (*fatty acid oxidation*)

**FCCP:** *carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone*

**FDR:** *false discovery rate*

**FC:** *fold change*

**FTD:** *frontotemporal dementia*

**FITC:** fluoresceína-5-isotiocianato

**GABA:** ácido g-aminobutírico

**Gfap:** *Glial fibrillary acidic protein*

**GDNF:** *glial cell line-derived neurotrophic factor*

**GSEA:** *Gene Set Enrichment Analysis*

**Gfap:** *Glial fibrillary acidic protein*

**GFP:** *green fluorescent protein*

**GLUT1:** transportador de glucosa 1 (*Slc2a1*)

**GO:** *gene ontology*

**GS:** glutamina sintetasa

**GSK-3b:** *glycogen synthase kinase 3*

**GWAS:** *Genome wide association studies*

**G418:** genética

**HAM:** human Alzheimer's microglia

**HBSS:** *Hanks' Balanced Salt solution*

**HCl:** ácido clorhídrico

**HDL:** lipoproteínas de alta densidad (*High Density Lipoprotein*)

**HEPES:** *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

**HFIP:** 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol

**HPGs:** heparan sulfate proteoglycans

**HRP:** peroxidasa de rábano

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** peróxido de hidrógeno

**IBiS:** Instituto de Biomedicina de Sevilla

**IDE:** enzima de degradación de insulina (*Insulin degrading enzyme*)

**IDIBAPS:** Institut d'investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer

**IDIBELL:** Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge

**IGF1:** *Insulin Growth Factor-1*

**IL:** interleuquinas

**IP:** yoduro de propidio

**IFN:** Interferón

**iNOS:** enzima inducible óxido nítrico sintasa

**KCl:** cloruro potásico

**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** fosfato de potasio monobásico

**LCR:** líquido cefalorraquídeo

**LDL:** lipoproteínas de baja densidad (*Low Density Lipoprotein*)

**LOAD:** Late-onset Alzheimer's Disease

**LPS:** lipopolisacárido

**LTP:** potenciación a largo plazo (*long term potentiation*)

**LRP:** receptores de lipoproteínas (*low density lipoprotein receptor-related protein*)

**MAPs:** proteínas asociadas a microtubulos (*Microtubule associated proteins*)

**DCL:** **deterioro cognitivo leve**

**MCP-1:** chemoattractan protein 1

**MGnD:** microglia neurodegenerative phenotype

**MMSE:** *Mini-Mental Status Examination*

**MMPs:** metaloproteinasas de la matriz

**MoCA:** *Montreal Cognitive Assessment*

**MRC1:** mannose receptor C-type 1

**MRI:** imagen de resonancia magnética

**MTs:** microtúbulos

**NaCl:** cloruro sódico

**NaHCO<sub>3</sub>:** bicarbonato sódico

<b>NaOH:</b> hidróxido sódico	<b>PHF:</b> pares de filamentos helicoidales
<b>Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>:</b> borato sódico	<b>pHRodo:</b> <i>pHRodo™ Red succinimidyl (NHS) ester</i>
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:</b> carbonato sódico	<b>PLA2:</b> fosfolipasa A2 ( <i>Lipoprotein-Associated Phospholipase A2</i> )
<b>NCT:</b> nicastrina	<b>PLD3:</b> fosfolipasa D3 ( <i>Lipoprotein-Associated Phospholipase D3</i> )
<b>NEP:</b> neprilisina	<b>PLP:</b> solución fijadora
<b>NES:</b> factor de enriquecimiento normalizado	<b>PSP:</b> parálisis supranuclear progresiva
<b>NFTs:</b> ovillos neurofibrilares intracelulares ( <i>Neurofibrillary Tangles</i> )	<b>PI:</b> yoduro de propidio ( <i>propidium iodide</i> )
<b>NMDA:</b> <i>N-methyl-D-aspartate receptor</i>	<b>PIPES:</b> <i>piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)</i>
<b>NS:</b> neurosinaptosomas ( <i>neurosynaptosomes</i> )	<b>PP2A:</b> fosfatasa 2A ( <i>protein phosphatase 2A</i> )
<b>NTs:</b> filamentos de neuropilo ( <i>neuropil threads</i> )	<b>PP1:</b> fosfatasa 1 ( <i>protein phosphatase 1</i> )
<b>OCR:</b> <i>oxygen consumption rate</i>	<b>PRRs:</b> pattern recognition receptors
<b>OMS:</b> Organización Mundial de la Salud	<b>PSA:</b> persulfato de amonio
<b>OXPHOS:</b> Oxidative phosphorylation	<b>PSD95:</b> Proteína de Densidad Postsináptica
<b>P1:</b> proteínas insolubles aisladas bioquímicamente	<b>PS1:</b> Presenilina 1 ( <i>presenilin 1</i> )
<b>PAGE:</b> electroforesis en gel de poliacrilamida	<b>PS2:</b> Presenilina 2 ( <i>presenilin 2</i> )
<b>PAM:</b> plaque-associated microglia	<b>RAGE:</b> <i>receptor for advanced glycation end products</i>
<b>PAMPs:</b> pathogen associated molecular patterns	<b>RIN:</b> Número de Integridad del ARN ( <i>RNA Integrity Number</i> )
<b>PB:</b> tampón fosfato	<b>RMA:</b> <i>Robust Multi-Array</i>
<b>PBS:</b> tampón fosfato salino	<b>RNA:</b> <i>ribonucleic acid</i>
<b>PBT:</b> tampón salino con 0.1% Tritón X-100 (v/v)	<b>roGFP:</b> biosensor de estrés oxidativo ( <i>oxidative stress biosensor</i> )
<b>PCR:</b> reacción en cadena de la polimerasa ( <i>polymerase chain reaction</i> )	<b>ROS:</b> especies reactivas de oxígeno ( <i>reactive oxygen species</i> )
<b>PE:</b> <i>R-phycoerythrin</i>	<b>sAPPa:</b> fragmento APP soluble alfa
<b>PEIBA:</b> Portal de Ética de la Investigación Biomédica de Andalucía	<b>sAPPb:</b> fragmento APP soluble beta
<b>PEN2:</b> potenciador de presenilina ( <i>presenilin enhancer 2</i> )	<b>SDS:</b> detergente aniónico dodecilsulfato sódico
<b>PET:</b> tomografía de emisión positrónica ( <i>Positron Emission Tomography</i> )	<b>SFB:</b> suero fetal bovino
<b>PFA:</b> paraformaldehído	<b>SNC:</b> sistema nervioso central
<b>PFs:</b> Protofibrillas	<b>SR:</b> <i>scavenger receptors</i>



- S1:** fracción soluble de proteínas aisladas bioquímicamente (*soluble fraction*)
- TAC:** *Transcriptome Analysis Console* (*Affymetrix*)
- TAMRA:** *5(6)-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester*
- TEM:** *transmission electronic microscopy*
- TEMED:** Tetrametiletiléndiamina
- TGFb:** *Transforming Growth Factor-beta*
- ThioS:** Tioflavina S
- TLR:** *toll-like receptors*
- TNF:** factor de necrosis tumoral (*tumor necrosis factor*)
- TPBS:** tampón salino con 0.1% Tween-20 (v/v)
- Trem2:** *triggering receptor expressed on myeloid cells 2*
- VEGF:** *Vascular endothelial growth factor*
- Vim:** Vimentina
- WB:** Western Blot
- WT:** ratón silvestre (*wild type*)

# J. Bibliografía



- Absinta, M., Ha, S.-K., Nair, G., Sati, P., Luciano, N.J., Palisoc, M., Louveau A., et al. (2017). Human and nonhuman primate meninges harbor lymphatic vessels that can be visualized noninvasively by MRI. *ELife* 6:e29738.
- Acharya, M., Green, K., Allen, B., Najafi, A., Syage, A., Minasyan, H., et al. Elimination of microglia improves cognitive function following cranial irradiation. *Sci Rep* 6, 31545 (2016).
- Acosta, C., Anderson, H.D., Anderson, C.M. (2017). Astrocyte dysfunction in Alzheimer disease. *J. Neurosci. Res.* 95, 2430–2447.
- Aletrino, M.A., Vogels, O.J., Van Domburg, P.H., Ten Donkelaar, H.J. (1992). Cell loss in the nucleus raphes dorsalis in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 13, 461–468.
- Alzheimer A, Stelzmann RA, Schnitzlein HN, Murtagh FR. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde". (1995) *Clin Anat.* 8(6):429-31.
- Andersen P. (2007). *The hippocampus book*. Oxford University Press.
- Andreeva, T.V., Lukiw, W.J., and Rogaeve, E.I. (2017). Biological Basis for Amyloidogenesis in Alzheimer's Disease. *Biochem. Biokhimiia* 82, 122–139.
- Andrew, R.J., Kellett, K.A.B., Thinakaran, G., and Hooper, N.M. (2016). A Greek Tragedy: The Growing Complexity of Alzheimer Amyloid Precursor Protein Proteolysis. *J. Biol. Chem.* 291, 19235–19244.
- Arnold, S.E., Arvanitakis, Z., Macauley-Rambach, S.L., Koenig, A.M., Wang, H.-Y., Ahima, R.S., et al. (2018). Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums. *Nat. Rev. Neurol.* 14, 168–181.
- Artyomov, M.N., and Bossche, J.V. den (2020). Immunometabolism in the Single-Cell Era. *Cell Metabolism* 0.
- Asai, H., Ikezu, S., Tsunoda, S., Medalla, M., Luebke, J., Haydar, T., et al. (2015). Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat. Neurosci.* 18, 1584–1593.
- Askew, K., Li, K., Olmos-Alonso, A., Garcia-Moreno, F., Liang, Y., Richardson, P., et al. (2017). Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain. *Cell Rep.* 18, 391–405.
- Askew K, Gomez-Nicola D. A story of birth and death: Insights into the formation and dynamics of the microglial population. (2018). *Brain Behav Immun.* 69, 9-17.
- Aspelund, A., Antila, S., Proulx, S.T., Karlsen, T.V., Karaman, S., Detmar, M., et al. (2015). A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *J. Exp. Med.* 212, 991–999.
- Atri, A. (2019). *The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum: Diagnosis and Management*. *Med. Clin. North Am.* 103, 263–293.
- Atwood, C.S., Martins, R.N., Smith, M.A., Perry, G. (2002). Senile plaque composition and posttranslational modification of amyloid-beta peptide and associated proteins. *Peptides* 23, 1343–1350.

- Avila, J., Lucas, J.J., Perez, M., and Hernandez, F. (2004). Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol. Rev.* 84, 361–384.
- Baglietto-Vargas, D., Sánchez-Mejias, E., Navarro, V., Jimenez, S., Trujillo-Estrada, L., Gómez-Arboledas, A., et al. (2017). Dual roles of A $\beta$  in proliferative processes in an amyloidogenic model of Alzheimer's disease. *Sci Rep.* 7, 10085.
- Bagyinszky, E., Youn, Y.C., An, S.S.A., Kim, S. (2014). The genetics of Alzheimer's disease. *Clin. Interv. Aging* 9, 535–551.
- Baik, S.H., Kang, S., Lee, W., Choi, H., Chung, S., Kim, J.-I., Mook-Jung, I. (2019). A Breakdown in Metabolic Reprogramming Causes Microglia Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Cell Metab.* 30, 493-507.e6.
- Bancher, C., Lassmann, H., Budka, H., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Wiche, G., Seitelberger, F., Wisniewski, H.M. (1987). Neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and progressive supranuclear palsy: antigenic similarities and differences. Microtubule-associated protein tau antigenicity is prominent in all types of tangles. *Acta Neuropathol.* 74, 39–46.
- Bantug G.R., Galluzzi L., Kroemer G., Hess C. The spectrum of T cell metabolism in health and disease. (2018) *Nat Rev Immunol.* 18, 19-34.
- Barbero-Camps, E., Roca-Agüjetas, V., Bartolessis, I., de Dios, C., Fernández-Checa, J.C., Marí, M., Morales, A., Hartmann, T., and Colell, A. (2018). Cholesterol impairs autophagy-mediated clearance of amyloid beta while promoting its secretion. *Autophagy* 14, 1129–1154.
- Barrera-Ramírez, L.M., Drago Serrano, M.E., Pérez Ramos, J., Sainz Espuñes, T.D.R., Zamora, A.C., Gómez Arroyo, F., Mendoza Pérez, F. (2004). Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex.* 17, 42–55.
- Bartels T., De Schepper S., Hong S. (2020). Microglia modulate neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Science.* 370, 66-69.
- Barthélemy, N.R., Li, Y., Joseph-Mathurin, N., Gordon, B.A., Hassenstab, J., Benzinger, T.L.S., et al. (2020). A soluble phosphorylated tau signature links tau, amyloid and the evolution of stages of dominantly inherited Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 26, 398–407.
- Bayer, T.A., Wirths, O. (2010). Intracellular accumulation of amyloid-Beta - a predictor for synaptic dysfunction and neuron loss in Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* 2, 8.
- Benilova, I., Karran, E., De Strooper, B. (2012). The toxic A $\beta$  oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat. Neurosci.* 15, 349–357.
- Bernier, L. P., York, E. M., Kamyabi, A., Choi, H. B., Weilinger, N. L., & MacVicar, B. A. (2020). Microglial metabolic flexibility supports immune surveillance of the brain parenchyma. *Nature communications.* 11, 1559.
- Bernier L.P., York E.M., MacVicar B.A. (2020 B). Immunometabolism in the Brain: How Metabolism Shapes Microglial Function. *Trends Neurosci.* 43, 854-869.

- Bhaskar, K., Konerth, M., Kokiko-Cochran, O.N., Cardona, A., Ransohoff, R.M., Lamb, B.T. (2010). Regulation of tau pathology by the microglial fractalkine receptor. *Neuron* 68, 19–31.
- Bi, X., Gall, C., Zhou, J. (2002). Uptake and pathogenic effects of amyloid beta peptide 1-42 are enhanced by integrin antagonists and blocked by NMDA receptor antagonists. *Neuroscience* 112, 827–840.
- Billings, L.M., Oddo, S., Green, K.N., McGaugh, J.L., LaFerla, F.M. (2005). Intraneuronal A $\beta$  causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 45, 675–688.
- Binek, A., Rojo, D., Godzien, J., Rupérez, F.J., Nuñez, V., Jorge, I., et al. (2019). Flow Cytometry Has a Significant Impact on the Cellular Metabolome. *J. Proteome Res.* 18, 169–181.
- Bisht, K., Sharma, K.P., Lecours, C., Sánchez, M.G., El Hajj, H., Milior, G., et al. (2016). Dark microglia: A new phenotype predominantly associated with pathological states. *Glia* 64, 826–839.
- Blennow, K., Wallin, A., Agren, H., Spenger, C., Siegfried J., Vanmechelen E. (1995). Tau protein in cerebrospinal fluid: a biochemical marker for axonal degeneration in Alzheimer disease? *Mol. Chem. Neuropathol.* 26, 231–45.
- Bloom, G.S. (2014). Amyloid- $\beta$  and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis. *JAMA Neurol.* 71, 505–508.
- Bolmont, T., Haiss, F., Eicke, D., Radde, R., Mathis, C.A., Klunk, W.E., et al. (2008). Dynamics of the microglial/amyloid interaction indicate a role in plaque maintenance. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 4283–4292.
- Bolós, M., Llorens-Martín, M., Jurado-Arjona, J., Hernández, F., Rábano, A., Avila, J. (2015). Direct Evidence of Internalization of Tau by Microglia In Vitro and In Vivo. *J. Alzheimers Dis.* 50, 77–87.
- Borst, K., Schwabenland, M., Prinz, M. (2019). Microglia metabolism in health and disease. *Neurochem. Int.* 130, 104331.
- Bossche, J.V. den, O' Neill, L.A., Menon, D. (2017). Macrophage Immunometabolism: Where Are We (Going)? *Trends Immunol.* 38, 395–406.
- Böttcher, C., Schlickeiser, S., Sneeboer, M.A.M., Kunkel, D., Knop, A., Paza, E., et al. (2019). Human microglia regional heterogeneity and phenotypes determined by multiplexed single-cell mass cytometry. *Nat. Neurosci.* 22, 78–90.
- Bouvier, D.S., Jones, E.V., Quesseveur, G., Davoli, M.A., A Ferreira, T., Quirion, R., et al. (2016). High Resolution Dissection of Reactive Glial Nets in Alzheimer's Disease. *Sci. Rep.* 6, 24544.
- Boza-Serrano, A., Ruiz, R., Sanchez-Varo, R., García-Revilla, J., Yang, Y., Jimenez-Ferrer, I., et al. (2019). Galectin-3, a novel endogenous Trem2 ligand, detrimentally regulates inflammatory response in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 138, 251–273.

- Braak, H., Braak, E., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K. (1986). 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.* 65, 351–355.
- Braak, H., Braak, E. (1991). Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol.* 1, 213–216.
- Braak, H., Alafuzoff, I., Arzberger, T., Kretschmar, H., Del Tredici, K. (2006). Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol.* 112, 389–404.
- Bradshaw, E.M., Chibnik, L.B., Keenan, B.T., Ottoboni, L., Raj, T., Tang, A., et al. (2013). CD33 Alzheimer's disease locus: altered monocyte function and amyloid biology. *Nat. Neurosci.* 16, 848–850.
- Brezovakova, V., Valachova, B., Hanes, J., Novak, M., Jadhav, S. (2018). Dendritic Cells as an Alternate Approach for Treatment of Neurodegenerative Disorders. *Cell. Mol. Neurobiol.* 38, 1207–1214.
- Broce, I., Karch, C.M., Wen, N., Fan, C.C., Wang, Y., Hong Tan, C., et al. (2018). Immune-related genetic enrichment in frontotemporal dementia: An analysis of genome-wide association studies. *PLoS Med.* 15.
- Brosseron, F., Kolbe, C.-C., Santarelli, F., Carvalho, S., Antonell, A., Castro-Gomez, S., et al. (2019). Multicenter Alzheimer's and Parkinson's disease immune biomarker verification study. *Alzheimers Dement.* 2, 292-304.
- Brunello, C.A., Merezko, M., Uronen, R.-L., Huttunen, H.J. (2019). Mechanisms of secretion and spreading of pathological tau protein. *Cell. Mol. Life Sci.* 9, 1721-1744.
- Bruttger, J., Karam, K., Wörtge, S., Regen, T., Marini, F., Hoppmann, N., et al. (2015). Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System. *Immunity* 43, 92–106.
- Bustin, S.A. (2002). Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* 29, 23–39.
- Buck, M.D., O'Sullivan, D., Klein Geltink, R.I., Curtis, J.D., Chang, C.H., Sanin, D.E., et al (2016). Mitochondrial Dynamics Controls T Cell Fate through Metabolic Programming. *Cell*, 166, 63–76.
- Busch, C., Bohl, J., Ohm, T.G. (1997). Spatial, temporal and numeric analysis of Alzheimer changes in the nucleus coeruleus. *Neurobiol. Aging* 18, 401–406.
- Busche, M.A., Wegmann, S., Dujardin, S., Commins, C., Schiantarelli, J., Klickstein, N., et al. (2019). Tau impairs neural circuits, dominating amyloid- $\beta$  effects, in Alzheimer models in vivo. *Nat. Neurosci.* 22, 57–64.
- Butowski, N., Colman, H., De Groot, J.F., Omuro, A.M., Nayak, L., Wen, P.Y., et al. (2016). Orally administered colony stimulating factor 1 receptor inhibitor PLX3397 in recurrent glioblastoma: an Ivy Foundation Early Phase Clinical Trials Consortium phase II study. *Neuro Oncol* 18, 557–564.

- Butovsky, O., Kunis, G., Koronyo-Hamaoui, M., Schwartz, M. (2007). Selective ablation of bone marrow-derived dendritic cells increases amyloid plaques in a mouse Alzheimer's disease model. *Eur. J. Neurosci.* 26, 413–416.
- Butovsky, O., Jedrychowski, M.P., Moore, C.S., Cialic, R., Lanser, A.J., Gabriely, G., et al. (2014). Identification of a unique TGF- $\beta$ -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat. Neurosci.* 17, 131–143.
- Butterfield, D.A., Halliwell, B. (2019). Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci* 20, 148–160.
- Cacace, R., Sleegers, K., Van Broeckhoven, C. (2016). Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimers Dement.* 2016 12, 733–48.
- Cai, Z., Zhao, Y., Zhao, B. (2012). Roles of glycogen synthase kinase 3 in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* 9, 864–879.
- Cai, Z., Wan, C.-Q., Liu, Z. (2017). Astrocyte and Alzheimer's disease. *J. Neurol.* 264, 2068–2074.
- Cai, Z., Qiao, P.-F., Wan, C.-Q., Cai, M., Zhou, N.-K., Li, Q. (2018). Role of Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* 63, 1223–1234.
- Calero, M., Gómez-Ramos, A., Calero, O., Soriano, E., Avila, J., Medina, M. (2015). Additional mechanisms conferring genetic susceptibility to Alzheimer's disease. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 138.
- Calvo-Rodriguez, M., Hou, S. S., Snyder, A. C., Kharitonova, E. K., Russ, A. N., Das, S., et al. (2020). Increased mitochondrial calcium levels associated with neuronal death in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Commun* 11, 2146.
- Calvo-Rodriguez, M., Kharitonova, E. K., Bacskai, B. J. (2020). Therapeutic Strategies to Target Calcium Dysregulation in Alzheimer's Disease. *Cells*, 9, 2513.
- Casali, B.T., MacPherson, K.P., Reed-Geaghan, E.G., Landreth, G.E. (2020). Microglia depletion rapidly and reversibly alters amyloid pathology by modification of plaque compaction and morphologies. *Neurobiol Dis* 142, 104956.
- Castanho, I., Murray, T.K., Hannon, E., Jeffries, A., Walker, E., Laing, E., et al. (2020). Transcriptional Signatures of Tau and Amyloid Neuropathology. *Cell Rep.* 30, 2040–2054.e5.
- Castro, M.A., Hadziselimovic, A., Sanders, C.R. (2019). The vexing complexity of the amyloidogenic pathway. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 28, 1177–1193.
- Cassel JC, Duconseille E, Jeltsch H, Will B. 1997. The fimbria-fornix/cingular bundle pathways: A review of neurochemical and behavioural approaches using lesions and transplantation techniques. *Prog Neurobiol* 51: 663–716.
- Chai, H., Diaz-Castro, B., Shigetomi, E., Monte, E., Oceau, J.C., Yu, X., et al. (2017). Neural Circuit-Specialized Astrocytes: Transcriptomic, Proteomic, Morphological, and Functional Evidence. *Neuron* 95, 531–549.e9.



- Chang, Y.-J., Chen, Y.-R. (2014). The coexistence of an equal amount of Alzheimer's amyloid- $\beta$  40 and 42 forms structurally stable and toxic oligomers through a distinct pathway. *FEBS J.* 281, 2674–2687.
- Chételat, G., Arbizu, J., Barthel, H., Garibotto, V., Law, I., Morbelli, S., van de Giessen, E., et al. (2020). Amyloid-PET and 18F-FDG-PET in the diagnostic investigation of Alzheimer's disease and other dementias. *The Lancet Neurol.* 19, 951–962.
- Chen, X.-Q., Mobley, W.C. (2019). Alzheimer Disease Pathogenesis: Insights From Molecular and Cellular Biology Studies of Oligomeric A $\beta$  and Tau Species. *Front. Neurosci.* 13, 659.
- Cheng, Y., and Bai, F. (2018). The Association of Tau With Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci.* 12, 163.
- Chénais, B., Morjani, H., Drapier, J.-C. (2002). Impact of endogenous nitric oxide on microglial cell energy metabolism and labile iron pool. *J. Neurochem.* 81, 615–623.
- Cherry, J.D., Olschowka, J.A., O'Banion, M.K. (2014). Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J. Neuroinflammation* 11, 98.
- Chiu, I.M., Morimoto, E.T., Goodarzi, H., Liao, J.T., O'Keeffe, S., Phatnani, H.P., et al. (2013). A neurodegeneration-specific gene-expression signature of acutely isolated microglia from an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Cell report.*, 4, 385–401.
- Choi, M.L., Gandhi, S. (2018). Crucial role of protein oligomerization in the pathogenesis of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *FEBS J.* 285, 3631–3644.
- Cline, E.N., Bicca, M.A., Viola, K.L., Klein, W.L. (2018). The Amyloid- $\beta$  Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade. *J. Alzheimers Dis.* 64, S567–S610.
- Colom-Cadena, M., Spires-Jones, T., Zetterberg, H., Blennow, K., Caggiano, A., DeKosky, S.T., et al. (2020). The clinical promise of biomarkers of synapse damage or loss in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* 12, 21.
- Colonna, M., Butovsky, O. (2017). Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu Rev Immunol.* 35, 441-468.
- Colonna, M., y Wang, Y. (2016). Trem2 variants: new keys to decipher Alzheimer disease pathogenesis. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 201–207.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Risch, N.J., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., et al. (1994). Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat. Genet.* 7, 180–184.
- Cortés, N., Guzmán-Martínez, L., Andrade, V., González, A., Maccioni, R.B. (2019). CDK5: A Unique CDK and Its Multiple Roles in the Nervous System. *J. Alzheimers Dis.* 68, 843–855.
- Covarrubias, A.J., Aksoylar, H.I., Yu, J., Snyder, N.W., Worth, A.J., Iyer, S.S., et al. (2016). Akt-mTORC1 signaling regulates Acly to integrate metabolic input to control of macrophage activation. *ELife* 5.
- Covelo, A., Araque, A. (2018). Stimulating Astrocytes to Remember. *Cell* 174, 12–13.

- Cragolini, A.B., Lampitella, G., Virtuoso, A., Viscovo, I., Panetsos, F., Papa, M., Cirillo, G. (2019). Regional brain susceptibility to neurodegeneration: what is the role of glial cells? *Neural Regen. Res.* 15, 838–842.
- Cronk, J.C., Filiano, A.J., Louveau, A., Marin, I., Marsh, R., Ji, E., et al. (2018). Peripherally derived macrophages can engraft the brain independent of irradiation and maintain an identity distinct from microglia. *J. Exp. Med.* 215, 1627–1647.
- D’Andrea, M.R., Nagele, R.G. (2010). Morphologically distinct types of amyloid plaques point the way to a better understanding of Alzheimer’s disease pathogenesis. *Biotech. Histochem. Off. Publ. Biol. Stain Comm.* 85, 133–147.
- Dagher, N.N., Najafi, A.R., Kayala, K.M.N., Elmore, M.R.P., White, T.E., Medeiros, R., et al. (2015). Colony-stimulating factor 1 receptor inhibition prevents microglial plaque association and improves cognition in 3xTg-AD mice. *J Neuroinflammation* 12, 139.
- Dansokho, C., Ait Ahmed, D., Aid, S., Toly-Ndour, C., Chaigneau, T., Calle, V., et al. (2016). Regulatory T cells delay disease progression in Alzheimer-like pathology. *Brain J. Neurol.* 139, 1237–1251.
- Dansokho, C., Heneka, M.T. (2018). Neuroinflammatory responses in Alzheimer’s disease. *J. Neural Transm.* 1–9.
- DaRocha-Souto, B., Scotton, T.C., Coma, M., Serrano-Pozo, A., Hashimoto, T., Serenó, L., et al. (2011). Brain oligomeric  $\beta$ -amyloid but not total amyloid plaque burden correlates with neuronal loss and astrocyte inflammatory response in amyloid precursor protein/tau transgenic mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 70, 360–376.
- Dardiotis, E., Siokas, V., Pantazi, E., Dardioti, M., Rikos, D., Xiromerisiou, G., et al. (2017). A novel mutation in Trem2 gene causing Nasu-Hakola disease and review of the literature. *Neurobiol Aging.* 53, 194.e13-194.e22.
- De Castro, F. (2019). Cajal and the Spanish Neurological School: Neuroscience Would Have Been a Different Story Without Them. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 187.
- De Dios, C., Bartolessis, I., Roca-Agujetas, V., Barbero-Camps, E., Mari, M., Morales, A., Colell, A. (2019). Oxidative inactivation of amyloid beta-degrading proteases by cholesterol-enhanced mitochondrial stress. *Redox Biol.* 26, 101283.
- De Strooper, B. (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron* 38, 9–12.
- De Strooper, B. (2010). Proteases and proteolysis in Alzheimer disease: a multifactorial view on the disease process. *Physiol. Rev.* 90, 465–494.
- De Strooper, B., Iwatsubo, T., and Wolfe, M.S. (2012). Presenilins and  $\gamma$ -secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006304.
- De Strooper, B., Karran, E. (2016). The Cellular Phase of Alzheimer’s Disease. *Cell* 164, 603–615.

- DeSimone, C.V., Graff-Radford, J., El-Harasis, M.A., Rabinstein, A.A., Asirvatham, S.J., Holmes, D.R. (2017). Cerebral Amyloid Angiopathy: Diagnosis, Clinical Implications, and Management Strategies in Atrial Fibrillation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 70, 1173–1182.
- Del-Aguila, J.L., Li, Z., Dube, U., Mihindikulasuriya, K.A., Budde, J.P., Fernandez, M.V., et al. (2019). A single-nuclei RNA sequencing study of Mendelian and sporadic AD in the human brain. *Alzheimers Res. Ther.* 11, 71.
- Di Marco, L.Y., Venneri, A., Farkas, E., Evans, P.C., Marzo, A., Frangi, A.F. (2015). Vascular dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease-A review of endothelium-mediated mechanisms and ensuing vicious circles. *Neurobiol. Dis.* 82, 593–606.
- Dickson, D.W. (1997). The pathogenesis of senile plaques. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 321–339.
- Diskin, C., Pålsson-McDermott, E.M. (2018). Metabolic Modulation in Macrophage Effector Function. *Front. Immunol.* 9, 270.
- Doens, D., Fernández, P.L. (2014). Microglia receptors and their implications in the response to amyloid  $\beta$  for Alzheimer's disease pathogenesis. *J. Neuroinflammation* 11, 48.
- Domínguez, R.O., Pagano, M.A., Marschoff, E.R., González, S.E., Repetto, M.G., Serra, J.A. (2014). Alzheimer disease and cognitive impairment associated with diabetes mellitus type 2: associations and a hypothesis. *Neurol. Barc. Spain* 29, 567–572.
- Dringen, R. (2005). Oxidative and Antioxidative Potential of Brain Microglial Cells. *Antioxidants & Redox Signaling* 7, 1223–1233.
- Dumurgier, J., Tzourio, C. (2020). Epidemiology of neurological diseases in older adults. *Rev. Neurol. (Paris)*. 176, 642–648.
- Dujardin, S., Commins, C., Lathuiliere, A., Beerepoot, P., Fernandes, A.R., Kamath, T.V., et al. (2020). Tau molecular diversity contributes to clinical heterogeneity in Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 8, 1256–1263.
- Efthymiou, A.G., Goate, A.M. (2017). Late onset Alzheimer's disease genetics implicates microglial pathways in disease risk. *Mol. Neurodegener.* 12, 43
- Elder, G.A., Gama Sosa, M.A., De Gasperi, R., Dickstein, D.L., Hof, P.R. (2010). Presenilin transgenic mice as models of Alzheimer's disease. *Brain Struct. Funct.* 214, 127–143.
- Elmore, M.R.P., Najafi, A.R., Koike, M.A., Dagher, N.N., Spangenberg, E.E., Rice, R.A., Kitazawa, M., Matusow, B., Nguyen, H., West, B.L., et al. (2014). CSF1 receptor signaling is necessary for microglia viability, which unmasks a cell that rapidly repopulates the microglia-depleted adult brain. *Neuron* 82, 380–397.
- Elmore, M.R.P., Lee, R.J., West, B.L., Green, K.N. (2015). Characterizing newly repopulated microglia in the adult mouse: impacts on animal behavior, cell morphology, and neuroinflammation. *PLoS ONE* 10, e0122912.

- Eskildsen, S.F., Coupé, P., Fonov, V.S., Pruessner, J.C., Collins, D.L., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2015). Structural imaging biomarkers of Alzheimer's disease: predicting disease progression. *Neurobiol. Aging* 36 Suppl 1, S23-31.
- Evin, G., Weidemann, A. (2002). Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides. *Peptides* 23, 1285–1297.
- Ewers, M., Biechele, G., Suárez-Calvet, M., Sacher, C., Blume, T., Morenas-Rodriguez, E., et al. (2020). Higher CSF sTrem2 and microglia activation are associated with slower rates of beta-amyloid accumulation. *EMBO Molecular Medicine* 12, e12308.
- Fang, H., Zhang, L.-F., Meng, F.-T., Du, X., Zhou, J.-N. (2010). Acute hypoxia promote the phosphorylation of tau via ERK pathway. *Neurosci. Lett.* 474, 173–177.
- Fani Maleki, A., Rivest, S. (2019). Innate Immune Cells: Monocytes, Monocyte-Derived Macrophages and Microglia as Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease and Multiple Sclerosis. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 355.
- Farris, W., Schütz, S.G., Cirrito, J.R., Shankar, G.M., Sun, X., George, A., et al. (2007). Loss of neprilysin function promotes amyloid plaque formation and causes cerebral amyloid angiopathy. *Am. J. Pathol.* 171, 241–251.
- Faustino, J.V., Wang, X., Johnson, C.E., Klivanov, A., Derugin, N., Wendland, M.F., Vexler, Z.S. (2011). Microglial cells contribute to endogenous brain defenses after acute neonatal focal stroke. *J. Neurosci.* 31, 12992–13001.
- Fernández-Botrán R., Ahmed Z., Crespo F.A., Gatenbee C., Gonzalez J., Dickson DW., Litvan I. (2011). Cytokine expression and microglial activation in progressive supranuclear palsy. *Parkinsonism Relat Disord.* 17(9), 683–688.
- Flanary, B.E., Sammons, N.W., Nguyen, C., Walker, D., Streit, W.J. (2007). Evidence that aging and amyloid promote microglial cell senescence. *Rejuvenation Res.* 10, 61–74.
- Fodelianaki, G., Lansing, F., Bhattarai, P., Troullinaki, M., Zeballos, M.A., Charalampopoulos, I., et al. (2019). Nerve Growth Factor modulates LPS - induced microglial glycolysis and inflammatory responses. *Exp Cell Res.* 377, 10-16.
- Forner, S., Baglietto-Vargas, D., Martini, A.C., Trujillo-Estrada, L., LaFerla, F.M. (2017). Synaptic Impairment in Alzheimer's Disease: A Dysregulated Symphony. *Trends Neurosci.* 40, 347–357.
- Franklin K.B.J., Paxinos G. (2008). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3rd ed. Academic Press, New York, NY.
- Friedman, B.A., Srinivasan, K., Ayalon, G., Meilandt, W.J., Lin, H., Huntley, M.A., et al. (2018). Diverse Brain Myeloid Expression Profiles Reveal Distinct Microglial Activation States and Aspects of Alzheimer's Disease Not Evident in Mouse Models. *Cell Rep.* 22, 832–847.
- Frosch, M.P. (2017). Tau aggregates: Where, When, Why and What consequences? *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 43, 371-372

- Frost, B., Jacks, R.L., Diamond, M.I. (2009). Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J. Biol. Chem.* 284, 12845–12852.
- Fryer, H.J.L., Davis, G.E., Manthorpe, M., Varon, S. (1986). Lowry protein assay using an automatic microtiter plate spectrophotometer. *Anal. Biochem.* 153, 262–266.
- Füger, P., Hefendehl, J.K., Veeraraghavalu, K., Wendeln, A.C., Schlosser, C., Obermüller, U., et al. (2017). Microglia turnover with aging and in an Alzheimer's model via long-term in vivo single-cell imaging. *Nat Neurosci.* 20, 1371–1376.
- Gao, Y.-L., Wang, N., Sun, F.-R., Cao, X.-P., Zhang, W., Yu, J.-T. (2018). Tau in neurodegenerative disease. *Ann. Transl. Med.* 6.
- Garwood, C.J., Ratcliffe, L.E., Simpson, J.E., Heath, P.R., Ince, P.G., Wharton, S.B. (2017). Review: Astrocytes in Alzheimer's disease and other age-associated dementias: a supporting player with a central role. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 43, 281–298.
- Gauthier, S., Aisen, P.S., Cummings, J., Detke, M.J., Longo, F.M., Raman, R., et al. (2020). Non-Amyloid Approaches to Disease Modification for Alzheimer's Disease: An EU/US CTAD Task Force Report. *J. Prev. Alzheimers Dis.* 1–6.
- Gerhard, A., Watts, J., Trender-Gerhard, I., Turkheimer, F., Banati, R.B., Bhatia, K., Brooks, D.J. (2004). In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in corticobasal degeneration. *Mov. Disord.* 19, 1221–1226.
- Gerrits, E., Heng, Y., Boddeke, E.W.G.M., Eggen, B.J.L. (2020). Transcriptional profiling of microglia; current state of the art and future perspectives. *Glia* 68, 740–755.
- Ghosh, S., Castillo, E., Frias, E.S., Swanson, R.A. (2018). Bioenergetic regulation of microglia. *Glia* 66, 1200–1212.
- Gimeno-Bayón, J., López-López, A., Rodríguez, M.J., and Mahy, N. (2014). Glucose pathways adaptation supports acquisition of activated microglia phenotype. *J. Neurosci. Res.* 92, 723–731.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010). Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science* 330, 841–845.
- Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., Huber, T. (2013). Origin and differentiation of microglia. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 45.
- Ginzinger, D.G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp. Hematol.* 30, 503–512.
- Glenner, G.G., Wong, C.W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 885–890.
- Goedert, M., Spillantini, M.G. (2017). Propagation of Tau aggregates. *Mol. Brain* 10, 18.

- Golde, T.E. (2019). Harnessing Immunoproteostasis to Treat Neurodegenerative Disorders. *Neuron* 101, 1003–1015.
- Gomes, L.C., Di Benedetto, Gra., Scorrano, L. (2011). During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat. Cell Biol.* 13, 589–598.
- Gomez-Arboleda, Angela. Patología glial en el hipocampo de modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer: un enfoque ultraestructural. (2017) Tesis Doctoral, Universidad de Málaga.
- Gomez-Isla, T., Price, J.L., McKeel, D.W., Morris, J.C., Growdon, J.H., Hyman, B.T. (1996). Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 4491–4500.
- Gomez-Nicola, D., Perry, V.H. (2015). Microglial dynamics and role in the healthy and diseased brain: a paradigm of functional plasticity. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 21, 169–184.
- González, H., Elgueta, D., Montoya, A., Pacheco, R. (2014). Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *J. Neuroimmunol.* 274, 1–13.
- Gouras, G.K., Olsson, T.T., Hansson, O. (2015).  $\beta$ -Amyloid peptides and amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 12, 3–11.
- Grathwohl, S.A., Kälin, R.E., Bolmont, T., Prokop, S., Winkelmann, G., Kaeser, S.A., et al. (2009). Formation and maintenance of Alzheimer's disease beta-amyloid plaques in the absence of microglia. *Nat. Neurosci.* 12, 1361–1363.
- Gratuze, M., Leyns, C.E.G., Sauerbeck, A.D., St-Pierre, M.-K., Xiong, M., Kim, N., et al. (2020). Impact of Trem2R47H variant on tau pathology-induced gliosis and neurodegeneration. *J Clin Invest* 130, 4954–4968.
- Gratuze, M., Leyns, C.E.G., Holtzman, D.M. (2018). New insights into the role of Trem2 in Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* 13, 66.
- Green, K.N., Crapser, J.D., Hohsfield, L.A. (2020). To Kill a Microglia: A Case for CSF1R Inhibitors. *Trends Immunol.* 41, 771–784.
- Greenberg, S.M., Bacskai, B.J., Hernandez-Guillamon, M., Pruzin, J., Sperling, R., van Veluw, S.J. (2020). Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease - one peptide, two pathways. *Nat. Rev. Neurol.* 16, 30–42.
- Greenhalgh, A.D., David, S., Bennett, F.C. (2020). Immune cell regulation of glia during CNS injury and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 21, 139–152.
- Griciuc A., Serrano-Pozo A., Parrado A.R., Lesinski A.N., Asselin C.N., Mullin K., et al. Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of amyloid beta. *Neuron* 78, 631-643.
- Grimm, M.O.W., Mett, J., Grimm, H.S., Hartmann, T. (2017). APP Function and Lipids: A Bidirectional Link. *Front Mol Neurosci* 10, 63.

- Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeve, E., Majounie, E., et al. (2013). Trem2 variants in Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 368, 117–127.
- Guo, T., Noble, W., Hanger, D.P. (2017). Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol.* 133, 665–704.
- Guo, T., Zhang, D., Zeng, Y., Huang, T.Y., Xu, H., Zhao, Y. (2020). Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 15, 40.
- Gupta, K.K., Singh, S.K. (2019). Cdk5: A main culprit in neurodegeneration. *Int. J. Neurosci.* 129, 1192–1197.
- Gutierrez, A., Vitorica, J. (2018). Toward a New Concept of Alzheimer's Disease Models: A Perspective from Neuroinflammation. *J. Alzheimers Dis.* 64, S329–S338.
- Gyoneva, S., Swanger, S.A., Zhang, J., Weinshenker, D., Traynelis, S.F. (2016). Altered motility of plaque-associated microglia in a model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 330, 410–420.
- Haass, C., Hung, A.Y., Selkoe, D.J. (1991). Processing of beta-amyloid precursor protein in microglia and astrocytes favors an internal localization over constitutive secretion. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 11, 3783–3793.
- Haass, C., Selkoe, D.J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 101–112.
- Hamdane M., Sambo A.V., Delobel P., Bégard S., Violleau A., Delacourte A., et al. (2003). Mitotic like tau phosphorylation by p25-Cdk5 kinase complex. *J Biol Chem.* 278, 34026–34.
- Hampel, H., Lista, S., Mango, D., Nisticò, R., Perry, G., Avila, J., et al. (2019). Lithium as a Treatment for Alzheimer's Disease: The Systems Pharmacology Perspective. *J. Alzheimers Dis.* 69, 615–629.
- Han, J., Harris, R.A., Zhang, X.-M. (2017). An updated assessment of microglia depletion: current concepts and future directions. *Molecular Brain* 10, 25.
- Han, J., Zhu, K., Zhang, X.-M., Harris, R.A. (2019). Enforced microglial depletion and repopulation as a promising strategy for the treatment of neurological disorders. *Glia* 67, 217–231.
- Hane, F.T., Robinson, M., Lee, B.Y., Bai, O., Leonenko, Z., Albert, M.S. (2017). Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 3: Diagnosis and Treatment. *J. Alzheimers Dis.* 57, 645–665.
- Hanger, D.P., Byers, H.L., Wray, S., Leung, K.-Y., Saxton, M.J., Seereeram, A., et al. (2007). Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis. *J. Biol. Chem.* 282, 23645–23654.
- Hansen, D.V., Hanson, J.E., Sheng, M. (2018). Microglia in Alzheimer's disease. *J. Cell Biol.* 217, 459–472.
- Hanslik, K.L., Ulland, T.K. (2020). The Role of Microglia and the Nlrp3 Inflammasome in Alzheimer's Disease. *Front. Neurol.* 11, 570711.

- Hardy, J., Allsop, D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 383–388.
- Hardy, J.A., Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184–185.
- Hasel, P., Dando, O., Jiwaji, Z., Baxter, P., Todd, A.C., Heron, S., et al. (2017). Neurons and neuronal activity control gene expression in astrocytes to regulate their development and metabolism. *Nat. Commun.* 8, 15132.
- Hashemiaghdam, A., Mroczek, M. (2020). Microglia heterogeneity and neurodegeneration: The emerging paradigm of the role of immunity in Alzheimer's disease. *J. Neuroimmunol.* 341, 577185.
- Hays, C.C., Zlatar, Z.Z., Wierenga, C.E. (2016). The Utility of Cerebral Blood Flow as a Biomarker of Preclinical Alzheimer's Disease. *Cell. Mol. Neurobiol.* 36, 167–179.
- He, Z., Guo, J.L., McBride, J.D., Narasimhan, S., Kim, H., Changolkar, L., et al. (2018). Amyloid- $\beta$  plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation. *Nat. Med.* 24, 29–38.
- Heneka, M.T., Nadrigny, F., Regen, T., Martinez-Hernandez, A., Dumitrescu-Ozimek, L., Terwel, D., et al. (2010). Locus ceruleus controls Alzheimer's disease pathology by modulating microglial functions through norepinephrine. *PNAS* 107, 6058–6063.
- Heneka, M.T., Golenbock, D.T., Latz, E. (2015a). Innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat. Immunol.* 16, 229–236.
- Heneka, M.T., Carson, M.J., El Khoury, J., Landreth, G.E., Brosseron, F., Feinstein, D.L., et al. (2015b). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 14, 388–405.
- Heneka, M.T., McManus, R.M., Latz, E. (2018). Inflammasome signalling in brain function and neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 19, 610–621.
- Henkel, K., Karitzky, J., Schmid, M., Mader, I., Glatting, G., Unger, J.W., et al. (2004). Imaging of activated microglia with PET and [11C]PK 11195 in corticobasal degeneration. *Mov. Disord.* 19, 817–821.
- Heppner, F.L., Ransohoff, R.M., Becher, B. (2015). Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 358–372.
- Hickman, S.E., Kingery, N.D., Ohsumi, T.K., Borowsky, M.L., Wang, L.C., Means, T.K., El Khoury, J. (2013). The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nature neuroscience*, 16, 1896–1905.
- Hickman, S.E., Khoury, J.E. (2014). Trem2 and the neuroimmunology of Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.* 88, 495–498.
- Hiltunen, M., van Groen, T., Jolkonen, J. (2009). Functional roles of amyloid-beta protein precursor and amyloid-beta peptides: evidence from experimental studies. *J. Alzheimers Dis.* 18, 401–412.
- Holmes, B.B., Diamond, M.I. (2014). Prion-like properties of Tau protein: the importance of extracellular Tau as a therapeutic target. *J. Biol. Chem.* 289, 19855–19861.



- Holmes, C., Cunningham, C., Zotova, E., Woolford, J., Dean, C., Kerr, S., et al. (2009). Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. *Neurology*. 73, 768–74.
- Holtman, I.R., Skola, D., Glass, C.K. (2017). Transcriptional control of microglia phenotypes in health and disease. *J. Clin. Invest.* 127, 3220–3229.
- Hopp, S.C., Lin, Y., Oakley, D., Roe, A.D., DeVos, S.L., Hanlon, D., Hyman, B.T. (2018). The role of microglia in processing and spreading of bioactive tau seeds in Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* 15, 269.
- Hort, J., Vališ, M., Kuča, K., Angelucci, F. (2019). Vascular Cognitive Impairment: Information from Animal Models on the Pathogenic Mechanisms of Cognitive Deficits. *Int. J. Mol. Sci.* 20 (10), 2405.
- Hu, Y., Mai, W., Chen, L., Cao, K., Zhang, B., Zhang, Z., et al. (2020) mTOR-mediated metabolic reprogramming shapes distinct microglia functions in response to lipopolysaccharide and ATP. *Glia*. 68, 1031-1045.
- Huang, Y., Xu, Z., Xiong, S., Sun, F., Qin, G., Hu, G., et al. (2018). Repopulated microglia are solely derived from the proliferation of residual microglia after acute depletion. *Nat. Neurosci.* 21, 530–540.
- Hunt, C.E., Turner, A.J. (2009). Cell biology, regulation and inhibition of beta-secretase (BACE-1). *FEBS J.* 276, 1845–1859.
- Hwang, J.J., Jiang, L., Hamza, M., Dai, F., Belfort-DeAguiar, R., Cline, G., et al. (2017). The human brain produces fructose from glucose. *JCI Insight*. 2, e90508.
- Iadanza, M.G., Jackson, M.P., Hewitt, E.W., Ranson, N.A., Radford, S.E. (2018). A new era for understanding amyloid structures and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 755–773.
- Iadecola, C. (2016). Vascular and metabolic factors in Alzheimer's diseases and related dementias: Introduction. *Cell. Mol. Neurobiol.* 36, 151–154.
- Ishibashi, M., Egawa, K., Fukuda, A. (2019). Diverse Actions of Astrocytes in GABAergic Signaling. *Int J. Mol. Sci.* 20, 2964.
- Ishizuka, K., Kimura, T., Igata-Yi, R., Katsuragi, S., Takamatsu, J., Miyakawa, T. (1997). Identification of monocyte chemoattractant protein-1 in senile plaques and reactive microglia of Alzheimer's disease. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 51, 135–138.
- Ising, C., Venegas, C., Zhang, S., Scheiblich, H., Schmidt, S.V., Vieira-Saecker, A., et al. (2019). NLRP3 inflammasome activation drives tau pathology. *Nature* 575, 669–673.
- Ittner, A., Ittner, L.M. (2018). Dendritic Tau in Alzheimer's Disease. *Neuron* 99, 13–27.
- Iturria-Medina, Y., Sotero, R.C., Toussaint, P.J., Mateos-Pérez, J.M., Evans, A.C., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2016). Early role of vascular dysregulation on late-onset Alzheimer's disease based on multifactorial data-driven analysis. *Nat. Commun.* 7, 11934.

- Jack, C.R., Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Feldman, H. H., Frisoni, G. B., et al. (2016). A/T/N: An unbiased descriptive classification scheme for Alzheimer disease biomarkers. *Neurology*. 87, 539–547.
- Jakubauskienė, E., Vilyš, L., Pečiulienė, I., Kanopka, A. (2021). The role of hypoxia on Alzheimer's disease-related APP and Tau mRNA formation. *Gene* 766, 145146.
- Jeong, S. (2017). Molecular and Cellular Basis of Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *Mol. Cells* 40, 613–620.
- Jernberg, J N., Bowman, C.E., Wolfgang, M.J., Scafidi, S. (2017). Developmental regulation and localization of carnitine palmitoyltransferases (CPTs) in rat brain. *J. Neurochem.* 14, 407–419.
- Jha, A.K., Huang, S.C.-C., Sergushichev, A., Lampropoulou, V., Ivanova, Y., Loginicheva, E., et al. (2015). Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. *Immunity* 42, 419–430.
- Jha M.K., Kim J.H., Song G.J., Lee W.H., Lee I.K., Lee H.W., An S.S.A., et al. Functional dissection of astrocyte-secreted proteins: Implications in brain health and diseases. (2018) *Prog Neurobiol.* 162, 37-69.
- Jimenez, S., Baglietto-Vargas, D., Caballero, C., Moreno-Gonzalez, I., Torres, M., Sanchez-Varo, R., et al. (2008). Inflammatory response in the hippocampus of PS1M146L/APP751SL mouse model of Alzheimer's disease: age-dependent switch in the microglial phenotype from alternative to classic. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 11650–11661.
- Jimenez, S., Torres, M., Vizuete, M., Sanchez-Varo, R., Sanchez-Mejias, E., Trujillo-Estrada, L., et al. (2011). Age-dependent accumulation of soluble amyloid beta (A $\beta$ ) 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.* 286, 18414–18425.
- Jimenez, S., Navarro, V., Moyano, J., Sanchez-Mico, M., Torres, M., Davila, J.C., et al. (2014). Disruption of amyloid plaques integrity affects the soluble oligomers content from Alzheimer disease brains. *PLoS ONE* 9, e114041.
- John Lin, C.-C., Yu, K., Hatcher, A., Huang, T.-W., Lee, H.K., Carlson, J., et al. (2017). Identification of diverse astrocyte populations and their malignant analogs. *Nat. Neurosci.* 20, 396–405.
- Jonsson, T., Stefansson, H., Steinberg, S., Jonsdottir, I., Jonsson, P.V., Snaedal, J., Bjornsson, S., Huttenlocher, J., Levey, A.I., Lah, J.J., et al. (2013). Variant of Trem2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 368, 107–116.
- Jordão, M.J.C., Sankowski, R., Brendecke, S.M., Sagar, Locatelli, G., Tai, Y.-H., Tay, T.L., Schramm, E., Armbruster, S., Hagemeyer, N., et al. (2019). Single-cell profiling identifies myeloid cell subsets with distinct fates during neuroinflammation. *Science* 363.
- Jung, J., Zeng, H., Horng, T. (2019). Metabolism as a guiding force for immunity. *Nat. Cell Biol.* 21, 85–93.

- Jung, Y., Isaacs, J.S., Lee, S., Trepel, J., Liu, Z., Neckers, L. (2003a). Hypoxia-inducible factor induction by tumor necrosis factor in normoxic cells requires receptor-interacting protein dependent nuclear factor  $\kappa$ B activation. *Biochem. J.* 370, 1011-1017.
- Jung, Y., Isaacs, J.S., Lee, S., Trepel, J., Liu, Z., Neckers, L. (2003b). IL-1 $\beta$  mediated up-regulation of HIF-1 $\alpha$  via an NF $\kappa$ B/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J.* 17, 1-22.
- Kalaria, R. N. (1997). Cerebrovascular degeneration is related to amyloid-beta protein deposition in Alzheimer's disease. *Ann. N.T. Acad. Sci.* 826, 263-271.
- Kamphuis, W., Kooijman, L., Schetters, S., Orre, M., Hol, E.M. (2016). Transcriptional profiling of CD11c-positive microglia accumulating around amyloid plaques in a mouse model for Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1862, 1847-1860.
- Kantarci, K., Gunter, J.L., Tosakulwong, N., Weigand, S.D., Senjem, M.S., Petersen, R.C., et al. (2013). Focal hemosiderin deposits and  $\beta$ -amyloid load in the ADNI cohort. *Alzheimers Dement.* 9, S116-23.
- Karanfilian, L., Tosto, M.G., Malki, K. (2020). The role of Trem2 in Alzheimer's disease; evidence from transgenic mouse models. *Neurobiol. Aging* 86, 39-53.
- Karch, C.M., Cruchaga, C., Goate, A.M. (2014). Alzheimer's disease genetics: from the bench to the clinic. *Neuron* 83, 11-26.
- Karran, E., De Strooper, B. (2016). The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *J. Neurochem.* 139 Suppl 2, 237-252.
- Katoh, M., Wu, B., Nguyen, H.B., Thai, T.Q., Yamasaki, R., Lu, H., et al. (2017). Polymorphic regulation of mitochondrial fission and fusion modifies phenotypes of microglia in neuroinflammation. *Sci. Rep.* 7, 4942.
- Katsouri, L., Birch, A.M., Renziehausen, A.W.J., Zach, C., Aman, Y., Steeds, H., et al. (2020). Ablation of reactive astrocytes exacerbates disease pathology in a model of Alzheimer's disease. *Glia* 68, 1017-1030.
- Kelly, S.C., He, B., Perez, S.E., Ginsberg, S.D., Mufson, E.J., Counts, S.E. (2017). Locus coeruleus cellular and molecular pathology during the progression of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun* 5, 8.
- Kenney, P.M., Bennett, J.P. (2019). Alzheimer's Disease Frontal Cortex Mitochondria Show a Loss of Individual Respiratory Proteins but Preservation of Respiratory Supercomplexes. *Int J Alzheimers Dis* 2019, 4814783.
- Keren-Shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-Natan, O., Dvir-Szternfeld, R., Ulland, et al. (2017). A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell* 169, 1276-1290.e17.
- Kerridge, C., Kozlova, D.I., Nalivaeva, N.N., and Turner, A.J. (2015). Hypoxia Affects Neprilysin Expression Through Caspase Activation and an APP Intracellular Domain-dependent Mechanism. *Front. Neurosci.* 9, 426.

- Kierdorf, K., Masuda, T., Jordão, M.J.C., Prinz, M. (2019). Macrophages at CNS interfaces: ontogeny and function in health and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 20, 547–562.
- Kim, H., Kim, M., Im, S.-K., Fang, S. (2018). Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res* 34, 147–159.
- Kimura, A., Yoshikura, N., Hayashi, Y., Inuzuka, T. (2018). Cerebrospinal Fluid C-C Motif Chemokine Ligand 2 Correlates with Brain Atrophy and Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 61, 581–588.
- Kimura, T., Sharma, G., Ishiguro, K., Hisanaga, S. (2018). Phospho-Tau Bar Code: Analysis of Phosphoisoforms of Tau and Its Application to Tauopathy. *Front. Neurosci.* 12, 44.
- Kishita, N., Backhouse, T., Mioshi, E. (2020). Nonpharmacological Interventions to Improve Depression, Anxiety, and Quality of Life (QoL) in People With Dementia: An Overview of Systematic Reviews. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 33, 28–41.
- Klohs J. (2019). An Integrated View on Vascular Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Neurodegener Dis.* 19, 109-127.
- Kockelkoren, R., De Vis, J.B., Mali, W.P., Hendrikse, J., de Jong, P.A., Rozemuller, A.M., Koek, H.L. (2016). Hippocampal Calcification on Computed Tomography in Relation to Cognitive Decline in Memory Clinic Patients: A Case-Control Study. 11, e0167444.
- Konishi, H., Okamoto, T., Hara, Y., Komine, O., Tamada, H., Maeda, M., et al. (2020). Astrocytic phagocytosis is a compensatory mechanism for microglial dysfunction. *The EMBO Journal* 39, e10446.
- Kopeikina, K.J., Carlson, G.A., Pitstick, R., Ludvigson, A.E., Peters, A., Luebke, J.I., et al. (2011). Tau Accumulation Causes Mitochondrial Distribution Deficits in Neurons in a Mouse Model of Tauopathy and in Human Alzheimer's Disease Brain. *Am J Pathol* 179, 2071–2082.
- Kopeikina, K.J., Hyman, B.T., Spires-Jones, T.L. (2012). Soluble forms of tau are toxic in Alzheimer's disease. *Transl. Neurosci.* 3, 223–233.
- Korvatska, O., Leverenz, J.B., Jayadev, S., McMillan, P., Kurtz, I., Guo, X., et al. (2015). R47H Variant of Trem2 Associated With Alzheimer Disease in a Large Late-Onset Family: Clinical, Genetic, and Neuropathological Study. *JAMA Neurol.* 72, 920–927.
- Kosik, K.S. (1990). Tau protein and neurodegeneration. *Mol. Neurobiol.* 4, 171–179.
- Kovac, A., Zilka, N., Kazmerova, Z., Cente, M., Zilkova, M., Novak, M. (2011). Misfolded Truncated Protein  $\tau$  Induces Innate Immune Response via MAPK Pathway. *J. Immunol.* 187, 2732-2739.
- Kovacs, G.G. (2017). Tauopathies. *Handb. Clin. Neurol.* 145, 355–368.
- Krabbe, G., Halle, A., Matyash, V., Rinnenthal, J.L., Eom, G.D., Bernhardt, U., et al. (2013). Functional impairment of microglia coincides with Beta-amyloid deposition in mice with Alzheimer-like pathology. *PLoS One* 8, e60921.

- Krasemann, S., Madore, C., Cialic, R., Baufeld, C., Calcagno, N., El Fatimy, R., et al. (2017). The Trem2-ApoE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity* 47, 566–581.e9.
- Kumar, A., Tsao, J.W. (2020). Alzheimer Disease. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing).
- Kuruva, C.S., Reddy, P.H. (2017). Amyloid beta modulators and neuroprotection in Alzheimer's disease: a critical appraisal. *Drug Discov. Today* 22, 223–233.
- Kyrkanides, S., Tallents, R.H., Miller, J.N., Olschowka, M.E., Johnson, R., Yang, M., et al. (2011). Osteoarthritis accelerates and exacerbates Alzheimer's disease pathology in mice. *J. Neuroinflammation*. 8, 112.
- LaFerla, F.M., Green, K.N., Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 499–509.
- Lall, R., Mohammed, R., Ojha, U. (2019). What are the links between hypoxia and Alzheimer's disease? *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 15, 1343–1354.
- Lambert, J.C., Ibrahim-Verbaas, C.A., Harold, D., Naj, A.C., Sims, R., Bellenguez, C., et al. (2013). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 45, 1452–1458.
- Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., et al. (1998). Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6448–6453.
- Laurent C, Buée L, Blum D. Tau and neuroinflammation: What impact for Alzheimer's Disease and Tauopathies? (2018) *Biomed J.* 41, 21–33.
- Lauretti, E., Dincer, O., Praticò, D. (2020). Glycogen synthase kinase-3 signaling in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1867, 118664.
- Lawson L.J., Perry V.H., Dri P., Gordon S. (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience.* 39, 151-70
- Le, Q.-T., Courter, D. (2008). Clinical Biomarkers for Hypoxia Targeting. *Cancer Metastasis Rev* 27, 351–362.
- Le Douce, J., Maugard, M., Veran, J., Matos, M., Jégo, P., Vigneron, P.-A., et al. (2020). Impairment of Glycolysis-Derived l-Serine Production in Astrocytes Contributes to Cognitive Deficits in Alzheimer's Disease. *Cell Metab.* 31, 503–517.e8.
- Lee, C.Y.D., Landreth, G.E. (2010). The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J. Neural Transm. Vienna* 117, 949–960.
- Lee, S.J., Chung, Y.H., Joo, K.M., Lim, H.C., Jeon, G.S., Kim, D., et al. (2006). Age-related changes in glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) immunoreactivity in the central nervous system of rats. *Neurosci. Lett.* 409, 134–139.

- Lesné, S., Koh, M.T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C.G., Yang, A., et al. (2006). A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* 440, 352–357.
- Lesné, S.E., Sherman, M.A., Grant, M., Kuskowski, M., Schneider, J.A., Bennett, D.A., Ashe, K.H. (2013). Brain amyloid- $\beta$  oligomers in ageing and Alzheimer's disease. *Brain J. Neurol.* 136, 1383–1398.
- Leyns, C.E.G., and Holtzman, D.M. (2017). Glial contributions to neurodegeneration in tauopathies. *Mol. Neurodegener.* 12, 50.
- Leyns, C., Gratuze, M., Narasimhan, S., Jain, N., Koscal, L., Jiang H et al. (2019). Trem2 Function Impedes Tau Seeding in Neuritic Plaques. *Nat Neurosci.* 22, 1217-1222.
- Li, J., Huang, Q., Long, X., Guo, X., Sun, X., Jin, X., et al. (2017). Mitochondrial elongation-mediated glucose metabolism reprogramming is essential for tumour cell survival during energy stress. *Oncogene* 36, 4901–4912.
- Li, S., Selkoe, D.J. (2020). A mechanistic hypothesis for the impairment of synaptic plasticity by soluble Ab oligomers from Alzheimer brain. *J. Neurochem.* 154, 583-597.
- Li, Y., He, Y., Miao, K., Zheng, Y., Deng, C., Liu, T. M. (2020). Imaging of macrophage mitochondria dynamics in vivo reveals cellular activation phenotype for diagnosis. *Theranostics.* 10, 2897-2917.
- Lian, H., Litvinchuk, A., Chiang, A.C.-A., Aithmitti, N., Jankowsky, J.L., Zheng, H. (2016). Astrocyte-Microglia Cross Talk through Complement Activation Modulates Amyloid Pathology in Mouse Models of Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* 36, 577–589.
- Liddel, S.A., Barres, B.A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity* 46, 957–967.
- Liddel, S.A., Guttenplan, K.A., Clarke, L.E., Bennett, F.C., Bohlen, C.J., Schirmer, L., et al. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541, 481–487.
- Liu, C., Götz, J. (2013). How it all started: tau and protein phosphatase 2A. *J. Alzheimers Dis.* 37, 483–494.
- Liu, C., Cui, G., Zhu, M., Kang, X., Guo, H. (2014). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: chemokines produced by astrocytes and chemokine receptors. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7, 8342–8355.
- Liu, Y., Xu, R., Gu, H., Zhang, E., Qu, J., Cao, W., et al. (2021). Metabolic reprogramming in macrophage responses. *Biomark. Res.* 9, 1
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25, 402–408.
- Lloyd, A.F., Davies, C.L., Holloway, R.K., Labrak, Y., Ireland, G., Carradori, D., et al. (2019). Central nervous system regeneration is driven by microglia necroptosis and repopulation. *Nat. Neurosci.* 22, 1046–1052.
- Lopes, K.O., Sparks, D.L., Streit, W.J. (2008). Microglial dystrophy in the aged and Alzheimer's disease brain is associated with ferritin immunoreactivity. *Glia* 56, 1048–1060.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Ludewig, P., Gallizioli, M., Urra, X., Behr, S., Brait, V.H., Gelderblom, M., et al. (2016). Dendritic cells in brain diseases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1862, 352–367.
- Lund, H., Pieber, M., Parsa, R., Han, J., Grommisch, D., Ewing, E., et al. (2018). Competitive repopulation of an empty microglial niche yields functionally distinct subsets of microglia-like cells. *Nat Commun* 9, 4845.
- Luo, W., Liu, W., Hu, X., Hanna, M., Caravaca, A., Paul, S.M. (2015). Microglial internalization and degradation of pathological tau is enhanced by an anti-tau monoclonal antibody. *Sci. Rep.* 5, 11161.
- Ly, P.T.T., Wu, Y., Zou, H., Wang, R., Zhou, W., Kinoshita, A., et al. (2013). Inhibition of GSK3 $\beta$ -mediated BACE1 expression reduces Alzheimer-associated phenotypes. *J. Clin. Invest.* 123, 224–235.
- Lynch M. A. (2009). The multifaceted profile of activated microglia. *Molecular neurobiology*, 40, 139–156.
- Ma, K.-G., Qian, Y.-H. (2019). Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor and its effects on Alzheimer's disease. *Neuropeptides* 73, 96–106.
- Ma, R.-H., Zhang, Y., Hong, X.-Y., Zhang, J.-F., Wang, J.-Z., Liu, G.-P. (2017). Role of microtubule-associated protein tau phosphorylation in Alzheimer's disease. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* 37, 307–312.
- Majerova, P., Zilkova, M., Kazmerova, Z., Kovac, A., Paholikova, K., Kovacech, B., et al. (2014). Microglia display modest phagocytic capacity for extracellular tau oligomers. *J. Neuroinflammation* 11, 161.
- Majmundar, A.J., Wong, W. J., Simon, M. C. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell*, 40, 294–309.
- Makin, S. (2018). The amyloid hypothesis on trial. *Nature* 559, S4–S7.
- Malek-Ahmadi, M., Perez, S.E., Chen, K., Mufson, E.J. (2020). Braak Stage, Cerebral Amyloid Angiopathy, and Cognitive Decline in Early Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* 74, 189–197.
- Malm, T.M., Koistinaho, M., Pärepallo, M., Vatanen, T., Ooka, A., Karlsson, S., Koistinaho, J. (2005). 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.* 18, 134–142.
- Mancuso, R., Fryatt, G., Cleal, M., Obst, J., Pippi, E., Monzón-Sandoval, et al. (2019). CSF1R inhibitor JNJ-40346527 attenuates microglial proliferation and neurodegeneration in P301S mice. *Brain* 142, 3243–3264.
- Mandrekar, S., Jiang, Q., Lee, C.Y.D., Koenigsnecht-Talboo, J., Holtzman, D.M., Landreth, G.E. (2009). Microglia mediate the clearance of soluble A $\beta$  through fluid phase macropinocytosis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 4252–4262.

- Mangialasche, F., Solomon, A., Winblad, B., Mecocci, P., Kivipelto, M. (2010). Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol.* 9, 702–716.
- Maphis, N., Xu, G., Kokiko-Cochran, O.N., Jiang, S., Cardona, A., Ransohoff, R.M., et al. (2015). Reactive microglia drive tau pathology and contribute to the spreading of pathological tau in the brain. *Brain J. Neurol.* 138, 1738–1755.
- Masliah, E., Mallory, M., Hansen, L., Alford, M., Albricht, T., DeTeresa, R., et al. (1991). Patterns of aberrant sprouting in Alzheimer's disease. *Neuron* 6, 729–739.
- Masters, C.L., Simms, G., Weinman, N.A., Multhaup, G., McDonald, B.L., Beyreuther, K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 4245–4249.
- Masgrau, R., Guaza, C., Ransohoff, R.M., Galea, E. (2017). Should We Stop Saying 'Glia' and 'Neuroinflammation'? *Trends Mol. Med.* 23, 486–500.
- Masoud, G. N., & Li, W. (2015). HIF-1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B.* 5, 378–389.
- Mathys, H., Adaikkan, C., Gao, F., Young, J.Z., Manet, E., Hemberg, M., et al. (2017). Temporal Tracking of Microglia Activation in Neurodegeneration at Single-Cell Resolution. *Cell Rep* 21, 366–380.
- Mathys, H., Davila-Velderrain, J., Peng, Z., Gao, F., Mohammadi, S., Young, J.Z., Menon, M., He, L., Abdurrob, F., Jiang, X., et al. (2019). Single-cell transcriptomic analysis of Alzheimer's disease. *Nature* 570, 332–337.
- Matthews, F.E., Brayne, C., Lowe, J., McKeith, I., Wharton, S.B., Ince, P. (2009) Epidemiological pathology of dementia: attributable-risks at death in the medical research council cognitive function and ageing study. *PLoS Medicine* 6: e1000180.
- McGettrick, A. F., O'Neill, L. (2020). The Role of HIF in Immunity and Inflammation. *Cell Metab.* 32, 524–536.
- McQuade, A., Kang, Y.J., Hasselmann, J., Jairaman, A., Sotelo, A., Coburn, M., et al. (2020). Gene expression and functional deficits underlie Trem2-knockout microglia responses in human models of Alzheimer's disease. *Nat Commun* 11, 1–17.
- Medeiros, R., LaFerla, F.M. (2013). Astrocytes: conductors of the Alzheimer disease neuroinflammatory symphony. *Exp. Neurol.* 239, 133–138.
- Medina, M. (2018). An Overview on the Clinical Development of Tau-Based Therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* 19.
- Mehta, M.M., Weinberg, S.E., Chandel, N.S. (2017). Mitochondrial control of immunity: beyond ATP. *Nature reviews. Nat Rev Immunol*, 17, 608–620.
- Meilandt, W.J., Ngu, H., Gogineni, A., Lalehzadeh, G., Lee, S.-H., Srinivasan, K., et al. (2020). Trem2 Deletion Reduces Late-Stage Amyloid Plaque Accumulation, Elevates the A $\beta$ 42:A $\beta$ 40 Ratio, and



- Exacerbates Axonal Dystrophy and Dendritic Spine Loss in the PS2APP Alzheimer's Mouse Model. *J Neurosci* 40, 1956–1974.
- Merlini, M., Kirabali, T., Kulic, L., Nitsch, R.M., Ferretti, M.T. (2018). Extravascular CD3+ T Cells in Brains of Alzheimer Disease Patients Correlate with Tau but Not with Amyloid Pathology: An Immunohistochemical Study. *Neurodegener. Dis.* 18, 49–56.
- Mirbaha, H., Holmes, B.B., Sanders, D.W., Bieschke, J., Diamond, M.I. (2015). Tau Trimers Are the Minimal Propagation Unit Spontaneously Internalized to Seed Intracellular Aggregation. *J. Biol. Chem.* 290, 14893–14903.
- Miyazaki T., Ishikawa E., Matsuda M., Sugii N., Kohzuki H., Akutsu H., et al. (2020). Infiltration of Cd163-positive macrophages in glioma tissues after treatment with anti-PD-L1 antibody and role of PI3Ky inhibitor as a combination therapy with anti-PD-L1 antibody in in vivo model using temozolomide-resistant murine glioma-initiating cells. *Brain Tumor Pathol.* 37, 41-49.
- Montagne, A., Nation, D.A., Pa, J., Sweeney, M.D., Toga, A.W., Zlokovic, B.V. (2016). Brain imaging of neurovascular dysfunction in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 131, 687–707.
- Montine, T.J., Phelps, C.H., Beach, T.G., Bigio, E.H., Cairns, N.J., Dickson, D.W., et al. (2012). National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: a practical approach. *Acta Neuropathol.* 123, 1–11.
- Moore, S., Evans, L.D.B., Andersson, T., Portelius, E., Smith, J., Dias, T.B., Saurat, N., et al. (2015). APP metabolism regulates tau proteostasis in human cerebral cortex neurons. *Cell Rep.* 11, 689–696.
- Morgan, B.P. (2018). Complement in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Semin. Immunopathol.* 40, 113–124.
- Mosconi, L., Pupi, A., De Leon, M.J. (2008). Brain Glucose Hypometabolism and Oxidative Stress in Preclinical Alzheimer's Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1147, 180–195.
- Mosher, K.I., Wyss-Coray, T. (2014). Microglial dysfunction in brain aging and Alzheimer's disease. *Biochem. Pharmacol.* 88, 594–604.
- Moss, D.W., Bates, T.E. (2001). Activation of murine microglial cell lines by lipopolysaccharide and interferon-gamma causes NO-mediated decreases in mitochondrial and cellular function. *Eur. J. Neurosci.* 13, 529–538.
- Mrdjen, D., Pavlovic, A., Hartmann, F.J., Schreiner, B., Utz, S.G., Leung, B.P., et al. (2018). High-Dimensional Single-Cell Mapping of Central Nervous System Immune Cells Reveals Distinct Myeloid Subsets in Health, Aging, and Disease. *Immunity* 48, 380–395.e6.
- Mroczo, B., Groblewska, M., Litman-Zawadzka, A. (2019). The Role of Protein Misfolding and Tau Oligomers (TauOs) in Alzheimer's Disease (AD). *Int. J. Mol. Sci.* 20.
- Mueller-Steiner, S., Zhou, Y., Arai, H., Roberson, E.D., Sun, B., Chen, J., et al. (2006). Anti-amyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease. *Neuron* 51, 703–714.

- Muñoz-Castro, C., Romero-Molina, C., Vitorica, J. (2020) Redirigiendo las estrategias terapéuticas en la Enfermedad de Alzheimer. *Rev Esp Cien Farm.* 1, 18-33.
- Muñoz-Castro, C. (2021). Implicación de la disfunción glial en la evolución de la patología en pacientes de Alzheimer. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Na, R., Yang, J.-H., Yeom, Y., Kim, Y.J., Byun, S., Kim, K., Kim, K.W. (2019). A Systematic Review and Meta-Analysis of Nonpharmacological Interventions for Moderate to Severe Dementia. *Psychiatry Investig.* 16, 325–335.
- Naert, G., Rivest, S. (2013). A deficiency in CCR2+ monocytes: the hidden side of Alzheimer's disease. *J. Mol. Cell Biol.* 5, 284–293.
- Nagamine, S., Yamazaki, T., Makioka, K., Fujita, Y., Ikeda, M., Takatama, M., et al. (2016). Hypersialylation is a common feature of neurofibrillary tangles and granulovacuolar degenerations in Alzheimer's disease and tauopathy brains. *Neuropathology* 36, 333–345.
- Najafi, A.R., Crapser, J., Jiang, S., Ng, W., Mortazavi, A., West, B.L., Green, K.N. (2018). A limited capacity for microglial repopulation in the adult brain. *Glia* 66, 2385-2396.
- Navarro, V., Sanchez-Mejias, E., Jimenez, S., Muñoz-Castro, C., Sanchez-Varo, R., Davila, J.C., et al. (2018). Microglia in Alzheimer's Disease: Activated, Dysfunctional or Degenerative. *Front. Aging Neurosci.* 10, 140.
- Nebel, R.A., Aggarwal, N.T., Barnes, L.L., Gallagher, A., Goldstein, J.M., Kantarci, K., et al. (2018). Understanding the impact of sex and gender in Alzheimer's disease: A call to action. *Alzheimers Dement.* 14, 1171–1183.
- Neddens, J., Temmel, M., Flunkert, S., Kerschbaumer, B., Hoeller, C., Loeffler, T., et al. (2018). Phosphorylation of different tau sites during progression of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. Commun.* 6, 52.
- Nelson, P.T., Alafuzoff, I., Bigio, E.H., Bouras, C., Braak, H., Cairns, N.J., et al. (2012). Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 71, 362–381.
- Neve, R.L., Harris, P., Kosik, K.S., Kurnit, D.M., Donlon, T.A. (1986). Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Brain Res.* 387, 271–280.
- Nguyen, K.V. (2015). The human  $\beta$ -amyloid precursor protein: biomolecular and epigenetic aspects. *Biomol. Concepts* 6, 11–32.
- Nguyen, A.T., Wang, K., Hu, G., Wang, X., Miao, Z., Azevedo, J.A., et al. (2020). ApoE and Trem2 regulate amyloid-responsive microglia in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 140, 477-493.
- Nixon, R.A., Yang, D.-S. (2011). Autophagy failure in Alzheimer's disease - locating the primary defect. *Neurobiol. Dis.* 43, 38–45.

- Nissl, F. Über einige Beziehungen zwischen Nervenzellerkrankungen und gliösen Erscheinungen bei verschiedenen Psychosen (1899). *Arch f Psychiatr* 32, 656-676.
- Noguchi, A., Matsumura, S., Dezawa, M., Tada, M., Yanazawa, M., Ito, A., et al. (2009). Isolation and characterization of patient-derived, toxic, high mass amyloid beta-protein (A $\beta$ ) assembly from Alzheimer disease brains. *J. Biol. Chem.* 284, 32895–32905.
- Nugent, A.A., Lin, K., van Lengerich, B., Lianoglou, S., Przybyla, L., Davis, S.S., et al. (2020). Trem2 Regulates Microglial Cholesterol Metabolism upon Chronic Phagocytic Challenge. *Neuron* 105, 837–854.e9.
- Nuñez-Díaz, C. (2019). Caracterización de la patología amiloide y su relación con la microglía en modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer. Tesis Doctoral. Universidad de Málaga.
- Ofengeim, D., Mazzitelli, S., Ito, Y., DeWitt, J.P., Mifflin, L., Zou, C., et al. (2017). RIPK1 mediates a disease-associated microglial response in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, E8788–E8797.
- Oikawa, N., Walter, J. (2019). Presenilins and  $\gamma$ -Secretase in Membrane Proteostasis. *Cells* 8, 209.
- Ojha J, Masilamoni G, Dunlap D, Udoff RA and Cashikar G. (2011) Sequestration of Toxic Oligomers by HspB1 as a Cytoprotective Mechanism. *Mol Cell Biol.* 31(15):3146-57.
- Olah, M., Patrick, E., Villani, A.-C., Xu, J., White, C.C., Ryan, K.J., et al. (2018). A transcriptomic atlas of aged human microglia. *Nat. Commun.* 9, 539.
- Olah, M., Menon, V., Habib, N., Taga, M.F., Ma, Y., Yung, C.J., et al. (2020). Single cell RNA sequencing of human microglia uncovers a subset associated with Alzheimer's disease. *Nat Commun.* 11, 6129.
- Oliveira, J., Costa, M., de Almeida, M.S.C., da Cruz E Silva, O.A.B., Henriques, A.G. (2017). Protein Phosphorylation is a Key Mechanism in Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* 58, 953–978.
- Olmos-Alonso, A., Schettters, S.T.T., Sri, S., Askew, K., Mancuso, R., Vargas-Caballero, M., Holscher, C., et al. (2016). Pharmacological targeting of CSF1R inhibits microglial proliferation and prevents the progression of Alzheimer's-like pathology. *Brain* 139, 891–907.
- Olszewska, D.A., Lonergan, R., Fallon, E.M., Lynch, T. (2016). Genetics of Frontotemporal Dementia. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 16, 107.
- Ono, K., Tsuji, M. (2020). Protofibrils of Amyloid- $\beta$  are Important Targets of a Disease-Modifying Approach for Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 21.
- Orre, M., Kamphuis, W., Osborn, L.M., Melief, J., Kooijman, L., Huitinga, I., et al. (2014). Acute isolation and transcriptome characterization of cortical astrocytes and microglia from young and aged mice. *Neurobiol. Aging* 35, 1–14.
- Orihuela, R., McPherson, C.A., Harry, G.J. (2016). Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br. J. Pharmacol.* 173, 649–665.
- Overk, C.R., Masliah, E. (2014). Pathogenesis of synaptic degeneration in Alzheimer's disease and Lewy body disease. *Biochem. Pharmacol.* 88, 508–516.

- Palmieri, E.M., Gonzalez-Cotto, M., Baseler, W.A., Davies, L.C., Ghesquière, B., Maio, N., et al. (2020). Nitric oxide orchestrates metabolic rewiring in M1 macrophages by targeting aconitase 2 and pyruvate dehydrogenase. *Nat. Commun.* 11, 1–17.
- Parmentier, F., Etcheto, A., Missling, C.U., Williams, C., Afshar, M. (2019). Exploring Gut Microbiota as a Source of Potential Biomarkers: Initial Results from the ANAVEX®2-73. AAIC 2019.
- Pearce, E.L., Pearce, E.J. (2013). Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity* 38, 633–643.
- Perea J.R., Ávila J., Bolós M. (2018). Dephosphorylated rather than hyperphosphorylated Tau triggers a pro-inflammatory profile in microglia through the p38 MAPK pathway. *Exp Neurol.* 310, 14-21.
- Perea, J.R., Bolós, M., Avila, J. (2020). Microglia in Alzheimer's Disease in the Context of Tau Pathology. *Biomolecules* 10, 1439.
- Perez-Nievas, B.G., Stein, T.D., Tai, H.-C., Dols-Icardo, O., Scotton, T.C., Barroeta-Espar, I., et al. (2013). Dissecting phenotypic traits linked to human resilience to Alzheimer's pathology. *Brain J. Neurol.* 136, 2510–2526.
- Perez-Nievas, B.G., Serrano-Pozo, A. (2018). Deciphering the Astrocyte Reaction in Alzheimer's Disease. *Front. Aging Neurosci.* 10, 114.
- Perl, D.P. (2010). Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt. Sinai J. Med. N. Y.* 77, 32–42.
- Perosa, V., Priester, A., Ziegler, G., Cardenas-Blanco, A., Dobisch, L., Spallazzi, M., et al. (2020). Hippocampal vascular reserve associated with cognitive performance and hippocampal volume. *Brain J. Neurol.* 143, 622–634.
- Pestana, F., Edwards-Faret, G., Belgard, T.G., Martirosyan, A., Holt, M.G. (2020). No Longer Underappreciated: The Emerging Concept of Astrocyte Heterogeneity in Neuroscience. *Brain Sci.* 10.
- Phillips, E.C., Croft, C.L., Kurbatskaya, K., O'Neill, M.J., Hutton, M.L., Hanger, D.P., et al. (2014). Astrocytes and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 1321–1325.
- Piers, T.M., Cosker, K., Mallach, A., Johnson, G.T., Guerreiro, R., Hardy, J., Pocock, J.M. (2020). A locked immunometabolic switch underlies Trem2 R47H loss of function in human iPSC-derived microglia. *FASEB J* 34, 2436–2450.
- Pietronigro, E., Zenaro, E., Bianca, V.D., Dusi, S., Terrabuio, E., Iannoto, G., et al. (2019). 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.* 9, 12055.
- Plemel, J.R., Stratton, J.A., Michaels, N.J., Rawji, K.S., Zhang, E., Sinha, S., et al. (2020). Microglia response following acute demyelination is heterogeneous and limits infiltrating macrophage dispersion. *Sci Adv* 6.
- Pluvinage, J.V., Haney, M.S., Smith, B.A.H., Sun, J., Iram, T., Bonanno, L., et al. (2019). CD22 blockade restores homeostatic microglial phagocytosis in aging brains. *Nature* 568, 187–192.

- Poliani, P.L., Wang, Y., Fontana, E., Robinette, M.L., Yamanishi, Y., Gilfillan, S., y Colonna, M. (2015). Trem2 sustains microglial expansion during aging and response to demyelination. *J. Clin. Invest.* 125, 2161–2170.
- Pottier, C., Hannequin, D., Coutant, S., Rovelet-Lecrux, A., Wallon, S., Rousseau, S., et al. (2012) High frequency of potentially pathogenic SORL1 mutations in autosomal dominant early-onset Alzheimer disease. *Mol Psychiatry* 17, 875–87
- Price, B.R., Sudduth, T.L., Weekman, E.M., Johnson, S., Hawthorne, D., Woolums, A., Wilcock, D.M. (2020). Therapeutic Trem2 activation ameliorates amyloid-beta deposition and improves cognition in the 5XFAD model of amyloid deposition. *J. Neuroinflammation* 17, 238.
- Price, J.L., Ko, A.I., Wade, M.J., Tsou, S.K., McKeel, D.W., Morris, J.C. (2001). Neuron number in the entorhinal cortex and CA1 in preclinical Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 58, 1395–1402.
- Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., Ferri, C.P. (2013). The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 9, 63–75.e2.
- Prinz, M., Priller, J., Sisodia, S.S., Ransohoff, R.M. (2011). Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nat. Neurosci.* 14, 1227–1235.
- Prokop, S., Lee, V.M.Y., Trojanowski, J.Q. (2019). Neuroimmune interactions in Alzheimer' s disease- New frontier with old challenges? *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 168, 183–201.
- Quiroz, Y.T., Sperling, R.A., Norton, D.J., Baena, A., Arboleda-Velasquez, J.F., Cosio, D., et al. (2018). Association Between Amyloid and Tau Accumulation in Young Adults With Autosomal Dominant Alzheimer Disease. *JAMA Neurol.* 75, 548–556.
- Radde, R., Bolmont, T., Kaeser, S.A., Coomaraswamy, J., Lindau, D., Stoltze, L., et al. (2006)- Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep.* 7, 940–6.
- Rajan W.D., Wojtas B., Gielniewski B., Miró-Mur F., Pedragosa J., Zawadzka M., et al. (2020). Defining molecular identity and fates of CNS-border associated macrophages after ischemic stroke in rodents and humans. *Neurobiol Dis.* 137:104722.
- Rajendran, L., Paolicelli, R.C. (2018). Microglia-Mediated Synapse Loss in Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.* 38, 2911–2919.
- Rambold A.S., Kostecky B., Elia N., Lippincott-Schwartz J. (2011) Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108, 10190-5.
- Rambold, A.S., Pearce, E.L. (2018). Mitochondrial Dynamics at the Interface of Immune Cell Metabolism and Function. *Trends Immunol.* 39, 6–18.
- Ransohoff, R.M. (2016). A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat. Neurosci.* 19, 987–991.

- Rathinam, V.A.K., Fitzgerald, K.A. (2016). Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions. *Cell* 165, 792–800.
- Rauchmann, B.-S., Sadlon, A., Pernecky, R., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2020). Soluble Trem2 and Inflammatory Proteins in Alzheimer's Disease Cerebrospinal Fluid. *J. Alzheimers Dis.* 73, 1615–1626.
- Reed-Geaghan, E.G., Croxford, A.L., Becher, B., Landreth, G.E. (2020). Plaque-associated myeloid cells derive from resident microglia in an Alzheimer's disease model. *J. Exp. Med.* 217.
- Reiss, A.B., Arain, H.A., Stecker, M.M., Siegart, N.M., Kasselmann, L.J. (2018). Amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *Rev. Neurosci.* 29, 613–627.
- Réu, P., Khosravi, A., Bernard, S., Mold, J.E., Salehpour, M., Alkass, K., Perl, S., et al. (2017). The Lifespan and Turnover of Microglia in the Human Brain. *Cell Rep.* 20, 779–784.
- Rexach, J.E., Polioudakis, D., Yin, A., Swarup, V., Chang, T.S., Nguyen, T., Sarkar, A., et al. (2020). Tau Pathology Drives Dementia Risk-Associated Gene Networks toward Chronic Inflammatory States and Immunosuppression. *Cell Rep.* 33, 108398.
- Ricciarelli, R., Fedele, E. (2017). The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. *Curr. Neuropharmacol.* 15, 926–935.
- Rice, R.A., Pham, J., Lee, R.J., Najafi, A.R., West, B.L., Green, K.N. (2017). Microglial repopulation resolves inflammation and promotes brain recovery after injury. *Glia* 65, 931–944.
- Ries, M., Sastre, M. (2016). Mechanisms of A $\beta$  Clearance and Degradation by Glial Cells. *Front. Aging Neurosci.* 8, 160.
- Robinson, M., Lee, B.Y., Hanes, F.T. (2017). Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 2: Genetics and Epidemiology. *J. Alzheimers Dis.* 61, 459.
- Rodríguez-Gómez, J.A., Kavanagh, E., Engskog-Vlachos, P., Engskog, M., Herrera, A.J., Espinosa-Oliva, A.M., et al. (2020). Microglia: Agents of the CNS Pro-Inflammatory Response. *Cells*, 9, 1717.
- Romero-Molina, C., Navarro, V., Sanchez-Varo, R., Jimenez, S., Fernandez-Valenzuela, J.J., Sanchez-Mico, M.V., et al. (2018). Distinct Microglial Responses in Two Transgenic Murine Models of TAU Pathology. *Front. Cell. Neurosci.* 12, 421.
- Sadleir, K.R., Kandalepas, P.C., Buggia-Prévot, V., Nicholson, D.A., Thinakaran, G., Vassar, R. (2016). Presynaptic dystrophic neurites surrounding amyloid plaques are sites of microtubule disruption, BACE1 elevation, and increased A $\beta$  generation in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 132, 235–256.
- Sakono, M., Zako, T. (2010). Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers. *FEBS J.* 277, 1348–1358.
- Sala Frigerio, C., Wolfs, L., Fattorelli, N., Thrupp, N., Voytyuk, I., Schmidt, I., et al. (2019). The Major Risk Factors for Alzheimer's Disease: Age, Sex, and Genes Modulate the Microglia Response to A $\beta$  Plaques. *Cell Rep.* 27, 1293–1306.e6.

- Salminen, A., Kauppinen, A., Kaarniranta, K. (2017). Hypoxia/ischemia activate processing of Amyloid Precursor Protein: impact of vascular dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 140, 536–549.
- Sancesario, G.M., and Bernardini, S. (2018). Alzheimer's disease in the omics era. *Clin. Biochem.* 59, 9–16.
- Sanchez-Mejias, E., Navarro, V., Jimenez, S., Sanchez-Mico, M., Sanchez-Varo, R., Nuñez-Diaz, C., et al. (2016). Soluble phospho-tau from Alzheimer's disease hippocampus drives microglial degeneration. *Acta Neuropathol.* 132, 897–916.
- Sanchez-Mico, M.V. (2019). Caracterización de la respuesta y función astrogial en modelos y pacientes de la Enfermedad de Alzheimer. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Sanchez-Varo, R., Trujillo-Estrada, L., Sanchez-Mejias, E., Torres, M., Baglietto-Vargas, D., Moreno-Gonzalez, I., et al. (2012). Abnormal accumulation of autophagic vesicles correlates with axonal and synaptic pathology in young Alzheimer's mice hippocampus. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 123, 53–70.
- Sankowski, R., Böttcher, C., Masuda, T., Geirsdottir, L., Sagar, Sindram, E., et al. (2019). Mapping microglia states in the human brain through the integration of high-dimensional techniques. *Nat. Neurosci.* 22, 2098–2110.
- Sato, N., Morishita, R. (2014). Brain Alterations and Clinical Symptoms of Dementia in Diabetes: A $\beta$ /Tau-Dependent and Independent Mechanisms. *Front. Endocrinol.* 5, 143.
- Savage, J.C., Carrier, M., and Tremblay, M.-È. (2019). Morphology of Microglia Across Contexts of Health and Disease. *Methods Mol. Biol.* 2034, 13–26.
- Scarmeas, N., Luchsinger, J.A., Schupf, N., Brickman, A.M., Cosentino, S., Tang, M.X., Stern, Y. (2009). Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease. *JAMA* 302, 627–637.
- Scearce-Levie, K., Sanchez, P.E., Lewcock, J.W. (2020). Leveraging preclinical models for the development of Alzheimer disease therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 19, 447–462.
- Schafer, D.P., Lehrman, E.K., Kautzman, A.G., Koyama, R., Mardinly, A.R., Yamasaki, R., et al. (2012). prevent. *Neuron* 74, 691–705.
- Scheiblich, H., Schlütter, A., Golenbock, D.T., Latz, E., Martinez-Martinez, P., Heneka, M. T. (2017). Activation of the NLRP3 inflammasome in microglia: the role of ceramide. *J. Neurochem.* 143, 534–550.
- Scheltens, P., Blennow, K., Breteler, M.M.B., Strooper, B. de, Frisoni, G.B., Salloway, S., Flier, W.M.V. der (2016). Alzheimer's disease. *The Lancet* 388, 505–517.
- Schindowski, K., Bretteville, A., Leroy, K., Bégard, S., Brion, J.-P., Hamdane, M., Buée, L. (2006). Alzheimer's Disease-Like Tau Neuropathology Leads to Memory Deficits and Loss of Functional Synapses in a Novel Mutated Tau Transgenic Mouse without Any Motor Deficits. *Am J Pathol* 169, 599–616.



- Selkoe, D.J. (2004). Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat. Cell Biol.* 6, 1054–1061.
- Selkoe, D.J. (2008). Biochemistry and molecular biology of amyloid beta-protein and the mechanism of Alzheimer's disease. *Handb. Clin. Neurol.* 89, 245–260.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M.P., Masliah, E., Hyman, B.T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 1, a006189.
- Shao, W., Peng, D., Wang, X. (2017). Genetics of Alzheimer's disease: From pathogenesis to clinical usage. *J. Clin. Neurosci.* 45, 1–8.
- Shi, Y., Yamada, K., Liddelow, S.A., Smith, S.T., Zhao, L., Luo, W., et al. (2017). ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. *Nature* 549, 523–527.
- Sheffield, L.G., Marquis, J.G., Berman, N.E. (2000). Regional distribution of cortical microglia parallels that of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 285, 165–168.
- Shukla, A.K., McIntyre, L.L., Marsh, S.E., Schneider, C.A., Hoover, E.M., Walsh, C.M., et al. (2019). CD11a expression distinguishes infiltrating myeloid cells from plaque-associated microglia in Alzheimer's disease. *Glia* 67, 844–856.
- Sierksma, A., Lu, A., Mancuso, R., Fattorelli, N., Thrupp, N., Salta, E., et al. (2020). Novel Alzheimer risk genes determine the microglia response to amyloid- $\beta$  but not to TAU pathology. *EMBO Mol Med* 12, e10606.
- Sierra, A., de Castro, F., Del Río-Hortega, J., Rafael Iglesias-Rozas, J., Garrosa, M., Kettenmann, H. (2016). The “Big-Bang” for modern glial biology: Translation and comments on Pío del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia* 64, 1801–1840.
- Sims, R., van der Lee, S.J., Naj, A.C., Bellenguez, C., Badarinarayan, N., Jakobsdottir, J., et al. (2017). Rare coding variants in *PLCG2*, *ABI3*, and *Trem2* implicate microglial-mediated innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 49, 1373–1384.
- Sofroniew, M.V., Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119, 7–35.
- Sosna, J., Philipp, S., Albay, R., Reyes-Ruiz, J.M., Baglietto-Vargas, D., LaFerla, F.M., Glabe, C.G. (2018). Early long-term administration of the CSF1R inhibitor PLX3397 ablates microglia and reduces accumulation of intraneuronal amyloid, neuritic plaque deposition and pre-fibrillar oligomers in 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 13, 11.
- Sosunov, A.A., Wu, X., Tsankova, N.M., Guilfoyle, E., McKhann, G.M., Goldman, J.E. (2014). Phenotypic heterogeneity and plasticity of isocortical and hippocampal astrocytes in the human brain. *J. Neurosci.* 34, 2285–2298.
- Spangenberg, E.E., Lee, R.J., Najafi, A.R., Rice, R.A., Elmore, M.R.P., Blurton-Jones, M., et al. (2016). Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid- $\beta$  pathology. *Brain* 139, 1265–1281.



- Spangenberg, E.E., Green, K.N. (2017). Inflammation in Alzheimer's disease: Lessons learned from microglia-depletion models. *Brain Behav. Immun.* 61, 1–11.
- Spangenberg, E.E., Severson, P.L., Hohsfield, L.A., Crapser, J., Zhang, J., Burton, E.A., et al. (2019). Sustained microglial depletion with CSF1R inhibitor impairs parenchymal plaque development in an Alzheimer's disease model. *Nat Commun* 10, 3758.
- Späni, C., Suter, T., Derungs, R., Ferretti, M.T., Welt, T., Wirth, F., et al. (2015). Reduced  $\beta$ -amyloid pathology in an APP transgenic mouse model of Alzheimer's disease lacking functional B and T cells. *Acta Neuropathol. Commun.* 3, 71.
- Spillantini, M.G., Goedert, M. (2013). Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol.* 12, 609–622.
- Spiller, K.J., Restrepo, C.R., Khan, T., Dominique, M.A., Fang, T.C., Canter, R.G., et al. (2018). Microglia-mediated recovery from ALS-relevant motor neuron degeneration in a mouse model of TDP-43 proteinopathy. *Nat. Neurosci.* 21, 329–340.
- Spires-Jones, T.L., Hyman, B.T. (2014). The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron* 82, 756–771.
- Srinivasan, K., Friedman, B.A., Etxeberria, A., Huntley, M.A., Brug, M.P. van der, Foreman, O., et al. (2019). Alzheimer's patient brain myeloid cells exhibit enhanced aging and unique transcriptional activation. *BioRxiv* 610345.
- St-Pierre, M.-K., Šimončíčová, E., Bögi, E., Tremblay, M.-È. (2020). Shedding Light on the Dark Side of the Microglia. *ASN Neuro* 12, 1759091420925335.
- Stansley, B., Post, J., Hensley, K. (2012). A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation* 9, 115.
- Stratoulis V., Venero J.L., Tremblay M.È., Joseph B. (2019). Microglial subtypes: diversity within the microglial community. *EMBO J.* 38:e101997.
- Streit, W.J., Braak, H., Xue, Q.-S., Bechmann, I. (2009). Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 118, 475–485.
- Streit WJ, Xue QS. Microglial senescence. (2013) *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 12, 763-7.
- Streit, W.J., Xue, Q.-S., Braak, H., del Tredici, K. (2014). Presence of severe neuroinflammation does not intensify neurofibrillary degeneration in human brain. *Glia* 62, 96–105.
- Streit, W.J., Khoshbouei, H., Bechmann, I. (2020). Dystrophic microglia in late-onset Alzheimer's disease. *Glia* 68, 845–854.
- Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., Roses, A.D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 1977–1981.

- Suárez-Calvet, M., Kleinberger, G., Araque Caballero, M.Á., Brendel, M., Rominger, A., Alcolea, D., et al. (2016). sTREM2 cerebrospinal fluid levels are a potential biomarker for microglia activity in early-stage Alzheimer's disease and associate with neuronal injury markers. *EMBO Mol. Med.* 8, 466–476.
- Subramanian, A., Kuehn, H., Gould, J., Tamayo, P., Mesirov, J.P. (2007). GSEA-P: a desktop application for Gene Set Enrichment Analysis. *Bioinformatics* 23, 3251–3253.
- Sun, X., Chen, W.-D., Wang, Y.-D. (2015).  $\beta$ -Amyloid: the key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Front. Pharmacol.* 6, 221.
- Swanson, M.E.V., Scotter, E.L., Smyth, L.C.D., Murray, H.C., Ryan, B., Turner, C., et al. (2020). Identification of a dysfunctional microglial population in human Alzheimer's disease cortex using novel single-cell histology image analysis. *Acta Neuropathol. Commun.* 8, 170.
- Sweeney, M. D., Sagare, A. P., & Zlokovic, B. V. (2018). Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol.* 14, 133–150.
- Sweeney, M.D., Montagne, A., Sagare, A.P., Nation, D.A., Schneider, L.S., Chui, H.C., et al. (2019). Vascular dysfunction—The disregarded partner of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 15, 158–167.
- Tai, L.M., Ghura, S., Koster, K.P., Liakaite, V., Maienschein-Cline, M., Kanabar, P., et al. (2015). ApoE-modulated A $\beta$ -induced neuroinflammation in Alzheimer's disease: current landscape, novel data, and future perspective. *J. Neurochem.* 133, 465–488.
- Takahashi, R.H., Nagao, T., Gouras, G.K. (2017). Plaque formation and the intraneuronal accumulation of  $\beta$ -amyloid in Alzheimer's disease. *Pathol. Int.* 67, 185–193.
- Tannahill, G.M., Curtis, A.M., Adamik, J., Palsson-McDermott, E.M., McGettrick, A.F., Goel, G., et al. (2013). Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ . *Nature* 496, 238–242.
- Tay, T.L., Savage, J.C., Hui, C.W., Bisht, K., Tremblay, M.-È. (2017). Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition. *J. Physiol.* 595, 1929–1945.
- Tenner, A.J., Stevens, B., Woodruff, T.M. (2018). New Tricks for an Ancient System: Physiological and Pathological Roles of Complement in the CNS. *Mol Immunol* 102, 3–13.
- Ter Laak, H.J., Renkawek, K., van Workum, F.P. (1994). The olfactory bulb in Alzheimer disease: a morphologic study of neuron loss, tangles, and senile plaques in relation to olfaction. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 8, 38–48.
- Thal, D.R., Griffin, W.S.T., Braak, H. (2008). Parenchymal and vascular A $\beta$ -deposition and its effects on the degeneration of neurons and cognition in Alzheimer's disease. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 1848–1862.
- Thériault, P., ElAli, A., Rivest, S. (2015). The dynamics of monocytes and microglia in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* 7, 41.

- Thrupp, N., Sala Frigerio, C., Wolfs, L., Skene, N.G., Fattorelli, N., Poovathingal, S., et al. (2020). Single-Nucleus RNA-Seq Is Not Suitable for Detection of Microglial Activation Genes in Humans. *Cell Reports* 32, 108189.
- Tischer, J., Krueger, M., Mueller, W., Staszewski, O., Prinz, M., Streit, W.J., Bechmann, I. (2016). Inhomogeneous distribution of Iba-1 characterizes microglial pathology in Alzheimer's disease. *Glia* 64, 1562–1572.
- Tondo, G., Iaccarino, L., Caminiti, S.P., Presotto, L., Santangelo, R., Iannaccone, S., et al. (2020). The combined effects of microglia activation and brain glucose hypometabolism in early-onset Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 12, 50.
- Torres, M., Jimenez, S., Sanchez-Varo, R., Navarro, V., Trujillo-Estrada, L., Sanchez-Mejias, E., et al. (2012). 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.* 7, 59.
- Tremblay, M.-È., Lecours, C., Samson, L., Sánchez-Zafra, V., Sierra, A. (2015). From the Cajal alumni Achúcarro and Río-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia. *Front. Neuroanat.* 9, 45.
- Tripathi, T., Kalita, P. (2019). Synergistic Effect of Amyloid- $\beta$  and Tau Disrupts Neural Circuits. *ACS Chem. Neurosci.* 10, 1129–1130.
- Trushina, N.I., Bakota, L., Mulikjanian, A.Y., Brandt, R. (2019). The Evolution of Tau Phosphorylation and Interactions. *Front. Aging Neurosci.* 11.
- Ulland, T.K., Song, W.M., Huang, S.C.-C., Ulrich, J.D., Sergushichev, A., Beatty, W.L., et al. (2017). Trem2 Maintains Microglial Metabolic Fitness in Alzheimer's Disease. *Cell* 170, 649–663.e13.
- Unger, M.S., Scherthner, P., Marschallinger, J., Mrowetz, H., Aigner, L. (2018). Microglia prevent peripheral immune cell invasion and promote an anti-inflammatory environment in the brain of APP-PS1 transgenic mice. *J. Neuroinflammation* 15, 274.
- Vainchtein, I.D., Molofsky, A.V. (2020). Astrocytes and Microglia: In Sickness and in Health. *Trends Neurosci.* 43, 144–154.
- Van Hove, H., Martens, L., Scheyltjens, I., De Vlaminck, K., Pombo Antunes, A.R., De Prijck, S., et al. (2019). A single-cell atlas of mouse brain macrophages reveals unique transcriptional identities shaped by ontogeny and tissue environment. *Nat. Neurosci.* 22, 1021–1035.
- Van Olst, L., Verhaege, D., Franssen, M., Kamermans, A., Roucourt, B., Carmans, S., et al. (2020) Microglial activation arises after aggregation of phosphorylated-tau in a neuron-specific P301S tauopathy mouse model. *Neurobiol Aging.* 89, 89-98.
- Varvel, N.H., Grathwohl, S.A., Degenhardt, K., Resch, C., Bosch, A., Jucker, M., Neher, J.J. (2015). Replacement of brain-resident myeloid cells does not alter cerebral amyloid- $\beta$  deposition in mouse models of Alzheimer's disease. *J. Exp. Med.* 212, 1803–1809.
- Vereecken, T.H., Vogels, O.J., Nieuwenhuys, R. (1994). Neuron loss and shrinkage in the amygdala in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 15, 45–54.

- Verkhatsky, A., Parpura, V., Pekna, M., Pekny, M., Sofroniew, M. (2014). Glia in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 1291–1301.
- Verkhatsky, A., Parpura, V., Rodriguez-Arellano, J.J., Zorec, R. (2019). Astroglia in Alzheimer's Disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1175, 273–324.
- Viola, K.L., and Klein, W.L. (2015). Amyloid  $\beta$  oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 129, 183–206.
- Vogels, O.J., Broere, C.A., ter Laak, H.J., ten Donkelaar, H.J., Nieuwenhuys, R., Schulte, B.P. (1990). Cell loss and shrinkage in the nucleus basalis Meynert complex in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 11, 3–13.
- Vogels, T., Leuzy, A., Cicognola, C., Ashton, N.J., Smolek, T., Novak, M., et al. (2019). Propagation of Tau Pathology: Integrating Insights From Postmortem and In Vivo Studies. *Biol. Psychiatry*.
- Walsh, D.M., Selkoe, D.J. (2020). Amyloid  $\beta$ -protein and beyond: the path forward in Alzheimer's disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 61, 116–124.
- Walsh, D.M., Lomakin, A., Benedek, G.B., Condron, M.M., Teplow, D.B. (1997). Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J. Biol. Chem.* 272, 22364–22372.
- Wang, H., Li, Y., Ryder, J.W., Hole, J.T., Ebert, P.J., Airey, D.C., et al. (2018). Genome-wide RNAseq study of the molecular mechanisms underlying microglia activation in response to pathological tau perturbation in the rTg4510 tau transgenic animal model. *Mol. Neurodegener.* 13, 65.
- Wang, H.Y., Lee, D.H., D'Andrea, M.R., Peterson, P.A., Shank, R.P., Reitz, A.B. (2000). beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J. Biol. Chem.* 275, 5626–5632.
- Wang, S., Mustafa, M., Yuede, C.M., Salazar, S.V., Kong, P., Long, H., et al. (2020). Anti-human Trem2 induces microglia proliferation and reduces pathology in an Alzheimer's disease model. *J Exp Med* 217.
- Wang, Y., Cella, M., Mallinson, K., Ulrich, J.D., Young, K.L., Robinette, M.L., et al. (2015). Trem2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model. *Cell* 160, 1061–1071.
- Wang, Y., Mandelkow, E. (2016). Tau in physiology and pathology. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 22–35.
- Wang, Y., Ulland, T.K., Ulrich, J.D., Song, W., Tzaferis, J.A., Hole, J.T., et al. (2016). Trem2-mediated early microglial response limits diffusion and toxicity of amyloid plaques. *J Exp Med* 213, 667–675.
- Watanabe, S., Kawamoto, S., Ohtani, N., Hara, E. (2017). Impact of senescence-associated secretory phenotype and its potential as a therapeutic target for senescence-associated diseases. *Cancer Sci.* 108, 563–569.
- Weichhart, T., Hengstschläger, M., Linke, M. (2015). Regulation of innate immune cell function by mTOR. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 599–614.

- Wilkins, H.M., Swerdlow, R.H. (2017). Amyloid precursor protein processing and bioenergetics. *Brain Res. Bull.* 133, 71–79.
- Wu, Y., Dissing-Olesen, L., MacVicar, B.A., Stevens, B. (2015). Microglia: Dynamic Mediators of Synapse Development and Plasticity. *Trends Immunol.* 36, 605–613.
- Xia, Y., Prokop, S., Gorion, K.-M.M., Kim, J.D., Sorrentino, Z.A., Bell, B.M., et al. (2020). Tau Ser208 phosphorylation promotes aggregation and reveals neuropathologic diversity in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Acta Neuropathol. Commun.* 8.
- Xie, N., Wu, C., Wang, C., Cheng, X., Zhang, L., Zhang, H., Lian, Y. (2017). Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter inhibits A $\beta$ -induced apoptosis by reducing reactive oxygen species-mediated endoplasmic reticulum stress in cultured microglia. *Brain Res.* 1676, 100-106.
- Shinozaki Y., Shibata K., Yoshida K., Shigetomi E., Gachet C., Ikenaka K., et al. (2017) Transformation of Astrocytes to a Neuroprotective Phenotype by Microglia via P2Y1 Receptor Downregulation. *Cell Rep.* 19, 1151-1164.
- Yamada, D., Kawabe, K., Tosa, I., Tsukamoto, S., Nakazato, R., Kou, M., et al. (2019) Inhibition of the glutamine transporter SNAT1 confers neuroprotection in mice by modulating the mTOR-autophagy system. *Commun. Biol.* 2, 346.
- Yang, L., Zhou, Y., Jia, H., Qi, Y., Tu, S., Shao, A. (2020). Affective Immunology: The Crosstalk Between Microglia and Astrocytes Plays Key Role? *Front. Immunol.* 11.
- Yeh, F.L., Wang, Y., Tom, I., Gonzalez, L.C., and Sheng, M. (2016). Trem2 Binds to Apolipoproteins, Including ApoE and CLU/APOJ, and Thereby Facilitates Uptake of Amyloid-Beta by Microglia. *Neuron* 91, 328–340.
- Yeh, F.L., Hansen, D.V., Sheng, M. (2017). Trem2, Microglia, and Neurodegenerative Diseases. *Trends Mol. Med.*
- Yiannopoulou, K.G., Papageorgiou, S.G. (2020). Current and Future Treatments in Alzheimer Disease: An Update. *J. Cent. Nerv. Syst. Dis.* 12, 1179573520907397.
- Yin, Z., Raj, D., Saiepour, N., Van Dam, D., Brouwer, N., Holtman, I.R., et al. (2017). Immune hyperreactivity of A $\beta$  plaque-associated microglia in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 55, 115–122.
- Yokogami, K., Wakisaka, S., Avruch, J., Reeves, S.A. (2000). Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Curr. Biol.* 10, 47–50.
- Yoshiyama, Y., Higuchi, M., Zhang, B., Huang, S.-M., Iwata, N., Saido, T.C., et al. (2007). Synapse Loss and Microglial Activation Precede Tangles in a P301S Tauopathy Mouse Model. *Neuron* 53, 337–351.
- Yuan, P., Condello, C., Keene, C.D., Wang, Y., Bird, T.D., Paul, S.M., et al. (2016). Trem2 Haplodeficiency in Mice and Humans Impairs the Microglia Barrier Function Leading to Decreased Amyloid Compaction and Severe Axonal Dystrophy. *Neuron* 90, 724–739.

- Zamanian, J.L., Xu, L., Foo, L.C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R.G., Barres, B.A. (2012). Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J. Neurosci.* 32, 6391–6410.
- Zempel, H., Thies, E., Mandelkow, E., Mandelkow, E.-M. (2010). A $\beta$  Oligomers Cause Localized Ca<sup>2+</sup> Elevation, Missorting of Endogenous Tau into Dendrites, Tau Phosphorylation, and Destruction of Microtubules and Spines. *J. Neurosci.* 30, 11938–11950.
- Zenaro, E., Piacentino, G., Constantin, G. (2017). The blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 107, 41–56.
- Zerbinatti, C.V., Wahrle, S.E., Kim, H., Cam, J.A., Bales, K., Paul, S.M., et al. (2006). Apolipoprotein E and low density lipoprotein receptor-related protein facilitate intraneuronal Abeta42 accumulation in amyloid model mice. *J. Biol. Chem.* 281, 36180–36186.
- Zhang, X., Zhou, K., Wang, R., Cui, J., Lipton, S.A., Liao, F.-F., et al. (2007). Hypoxia-inducible Factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )-mediated Hypoxia Increases BACE1 Expression and  $\beta$ -Amyloid Generation. *J. Biol. Chem.* 282, 10873–10880.
- Zhang, Y., Thompson, R., Zhang, H., Xu, H. (2011). APP processing in Alzheimer's disease. *Mol. Brain* 4, 3.
- Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S.A., Bennett, M.L., Scholze, A.R., O'Keeffe, S., et al. (2014). An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J. Neurosci.* 34, 11929–11947.
- Zhang, Y., Zhao, L., Wang, X., Ma, W., Lazere, A., Qian, H.-H., et al. (2018). Repopulating retinal microglia restore endogenous organization and function under CX3CL1-CX3CR1 regulation. *Sci Adv* 4, eaap8492.
- Zhao, J., Chen, Y., Xu, Y., Pi, G. (2016). Effects of PTEN inhibition on the regulation of Tau phosphorylation in rat cortical neuronal injury after oxygen and glucose deprivation. *Brain Inj.* 30, 1150-9.
- Zhao, L. (2019). CD33 in Alzheimer's Disease - Biology, Pathogenesis, and Therapeutics: A Mini-Review. *Gerontology* 65, 323–331.
- Zhao, X., Liao, Y., Morgan, S., Mathur, R., Feustel, P., Mazurkiewicz, J., Qian, J., Chang, J., Mathern, G.W., Adamo, M.A., et al. (2018a). Noninflammatory Changes of Microglia Are Sufficient to Cause Epilepsy. *Cell Rep* 22, 2080–2093.
- Zhao, Y., Wu, X., Li, X., Jiang, L.-L., Gui, X., Liu, Y., Sun, Y., Zhu, B., Piña-Crespo, J.C., Zhang, M., et al. (2018). Trem2 Is a Receptor for  $\beta$ -Amyloid that Mediates Microglial Function. *Neuron* 97, 1023–1031.e7.
- Zhong, L., Chen, X.-F., Wang, T., Wang, Z., Liao, C., Wang, Z., et al. (2017). Soluble Trem2 induces inflammatory responses and enhances microglial survival. *J. Exp. Med.* 214, 597–607.
- Zhou, Y., Song, W.M., Andhey, P.S., Swain, A., Levy, T., Miller, K.R., et al. (2020). Human and mouse single-nucleus transcriptomics reveal Trem2-dependent and - independent cellular responses in Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 26, 131–142.

Zhu, K., Pieber, M., Han, J., Blomgren, K., Zhang, X.-M., Harris, R.A., Lund, H. (2020). Absence of microglia or presence of peripherally-derived macrophages does not affect tau pathology in young or old hTau mice. *Glia* 67, 1466-1478.





