

Caracterización de la respuesta microglial en el modelo 3xTgAD

JORGE LUCERÓN MORALES
al189442@uji.es

FRANCISCO ROS BERNAL
fros@uji.es

Resumen

La demencia tipo Alzheimer implica un deterioro severo en las funciones cognitivas y ejecutiva y representa un 60-70% del total de los casos. A nivel neuropatológico, se caracteriza por el depósito de péptido β -amiloide en placas neuríticas extracelulares y la formación de ovillos neurofibrilares intraneuronales, cuya eliminación ha sido el infructuoso objetivo de diferentes terapias. Por el contrario, poco se sabe de la neuroinflamación existente, caracterizada por el aumento del número y cambios morfológicos de las células microgliales en estadios avanzados de la enfermedad.

El objetivo de este estudio es caracterizar las diferencias morfológicas de las células de microglía en el hipocampo de un modelo murino añoso de enfermedad de Alzheimer con el fin de dilucidar si, asociado con la edad, existe un fenotipo activo proinflamatorio diferente al patrón fisiológico.

Se utilizaron 12 ratones hembra (dos grupos, $n = 6$ por grupo) de entre 19 y 22 meses. El grupo control fueron animales sanos y, el experimental, animales 3xTgAD. Se seleccionaron aleatoriamente 10 células de cada animal y se usaron las extensiones AnalyzeSkeleton y FracLac del programa Image-J para analizar los distintos parámetros de las células. La ausencia de diferencias significativas nos dice que debemos tener en cuenta la variable edad para entender el funcionamiento de estos grupos celulares en el proceso de neurodegeneración, y que debemos seguir estudiándolos, porque comprender su heterogeneidad morfológica puede ser una de las claves.

Palabras clave: enfermedad de Alzheimer, microglía, neuroinflamación, modelo animal, análisis fractal.

Abstract

Alzheimer's dementia involves severe impairment of cognitive and executive functions and represents 60-70% of all cases. At the neuropathological level, it

is characterized by the deposition of β -amyloid peptide in extracellular neurotic plaques and the formation of intraneuronal neurofibrillary tangles, whose elimination has been the unsuccessful goal of different therapies. In contrast, little is known about the existing neuroinflammation, characterized by an increase in the number and morphological changes of microglial cells in advanced stages of the disease.

The aim of this study is to characterize the morphological differences of microglial cells in the hippocampus of an aged murine model of Alzheimer's disease to elucidate whether, associated with age, there is an active proinflammatory phenotype different from the physiological pattern.

Twelve female mice (two groups, $n = 6$ per group) aged between 19 and 22 months were used. The control group was healthy animals, and the experimental group was 3xTgAD animals. Ten cells were randomly selected from each animal and the AnalyzeSkeleton and FracLac extensions of the Image-J program were used to analyze the different cell parameters. The absence of significant differences tells us that we must consider the age variable to understand the functioning of these cell groups in the neurodegeneration process, and that we must continue to study them, because understanding their morphological heterogeneity may be one of the keys of this neurodegenerative disorder.

Key Words: Alzheimer's disease, microglia, neuroinflammation, animal model, fractal analysis.

Introducción

La demencia es una enfermedad asociada a la edad que implica el deterioro de la memoria, el intelecto, el comportamiento y la capacidad para realizar actividades de la vida cotidiana. Actualmente, afecta a unos 50 millones de personas y se prevé que para el año 2050 afecte a 100 millones más (Alzheimer's Disease International 2019). La Enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo de demencia más común, representando un 60-70% de los casos (Bello-Medina et al. 2019). A nivel neuropatológico, se caracteriza por la presencia de depósitos de péptido β -amiloide ($A\beta$) en placas neuríticas extracelulares y la formación de ovillos neurofibrilares intraneuronales de proteína tau (Zetterberg y Bendlin 2021), una neuroinflamación exacerbada (Calsolaro y Edison 2016; Song 2018), pérdida de sinapsis (Hickman et al. 2018), exceso de estrés oxidativo (Bartels, De Schepper y Hong 2020), y una muerte neuronal selectiva (Hashemiaghdam y Mroczek 2020). Aunque, desde el punto de vista macroscópico, un cerebro con EA no difiere significativamente de otro que haya sufrido un envejecimiento fisiológico, la atrofia cortical y subcortical, afectando selectivamente al hipocampo, acompañada de una dilatación del asta temporal del ventrículo lateral, se postulan como las características específicas y relacionadas con alteraciones microscópicas de la EA (Perl 2010).

Hasta hace unos años, la hipótesis de la cascada de $A\beta$, descrita en 1992 por John Hardy y Gerald Higgins, y que defendía que es la acumulación de esta proteína la

que desencadena la disfunción sináptica y el incremento de la fosforilación y secreción de tau (Hardy y Higgins 1992) fue la que predominó, por lo que las terapias se centraron en intentar eliminar la formación de estos depósitos sin obtenerse grandes resultados (Lue, Beach y Walker 2019). Así pues, gracias a la observación del gran aumento en el número de células microgliales con una morfología activa en áreas de neurodegeneración (McGeer, Itagaki, Tago y McGeer 1987), surge una nueva corriente que sugiere que la producción excesiva de citoquinas citotóxicas, especies reactivas de oxígeno o enzimas de degradación por parte de estas células pueden ser eventos tempranos en la patogénesis de la EA y acelerar el proceso neurodegenerativo (Leng y Edison 2020). Las células de microglía, una población especializada de células similares a los macrófagos, consideradas centinelas inmunitarios en el sistema nervioso central (SNC), desempeñan una función esencial en el mantenimiento de la homeostasis (Li y Barres 2018), participando en la regulación del desarrollo cerebral, el mantenimiento de las redes neuronales y la reparación de lesiones (Bohlen, Friedman, Dejanovic y Sheng 2019). Además, como fuente principal de citoquinas proinflamatorias, son las mediadoras fundamentales de la neuroinflamación y pueden inducir o modular un amplio espectro de respuestas celulares (Yuan et al. 2020).

Durante la patogénesis de la EA, la microglía, que en su estado fisiológico acumula A β , muestra reducción de la expresión de receptores de fagocitosis de A β y de enzimas para su degradación, pero mantiene su capacidad para producir citoquinas proinflamatorias, lo que sugiere que la acumulación de A β se debe, en parte, a un fallo en estas células para eliminar el péptido neurotóxico (Hickman et al. 2008). También se ha descrito cómo las células microgliales forman una barrera física para contener la expansión de las placas seniles y proteger a las neuronas (Condello, Yuan, Schain y Grutzendler 2015). La función de estas células se asemejaría a la famosa moneda de dos caras del dios Jano, mientras su activación temprana es beneficiosa para eliminar el A β tóxico del cerebro, con el tiempo, la estimulación crónica se convierte en perjudicial y conduce a una neuroinflamación prolongada, a una deposición excesiva de A β y a una aceleración del proceso neurodegenerativo (Wang y Colonna 2019). Sin embargo, aunque la investigación realizada hasta la fecha ha evidenciado diferencias morfológicas entre animales controles y modelos murinos de EA, la mayoría de ellos han sido realizados en etapas tempranas de la patología, sin tener en cuenta la variable de edad.

En relación con estos modelos murinos, y especialmente relevante para este trabajo, las características de la EA se han recapitulado en el modelo de ratón 3xTgAD. Este modelo desarrolla patologías A β y tau dependientes de la edad (Oddo et al. 2003), junto con un aumento de la microglía y los astrocitos activados en respuesta a la deposición de placas (Kitazawa et al. 2005), y un deterioro cognitivo progresivo (Billings, Oddo, Green, McLaugh y LaFerla 2005). También ha sido especialmente útil para dilucidar varias vías por las que la patología A β controla el desarrollo de la patología tau. En este sentido la inmunoterapia que elimina A β también demostró ser efectiva contra la acumulación somatodendrítica de tau (Oddo et al. 2004), lo que sugiere que los niveles de A β se encuentran en la fase previa a la acumulación de tau, al menos en este modelo. Además, se ha demostrado que los aspectos de una respuesta inflamatoria desregulada, tanto en los modelos de ratón transgénico de la EA (Parachikova y Cotman 2007) como en los pacientes con EA (Parachikova et al. 2007), pueden conducir a un deterioro cognitivo. Por lo tanto, este es un modelo de neuroinflamación asociado con EA muy

preciso y útil para nuestro objetivo, que es caracterizar las diferencias morfológicas de las células de microglía del hipocampo de un modelo murino añoso de EA, con el fin de dilucidar si, asociada con la edad, existe un fenotipo activo proinflamatorio diferente al patrón fisiológico.

Método

1. Animales

Se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, a 23 °C y 60% de humedad, con comida y agua disponibles *ad libitum*. Su cuidado y mantenimiento se realizó según las directrices establecidas por la legislación española (RD 53/2013) y el reglamento de la Unión Europea (2010/63/UE). Los procedimientos siguieron la directiva 86/609/EEC de la Comunidad Europea sobre la protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universitat Jaume I (número de aprobación 2015 / VSC / PEA/00213). Se emplearon un total de 12 animales hembras, de entre 19 y 22 meses, y se separaron en dos grupos (n = 6 por grupo). Se eligieron ratonas hembras porque son más susceptibles a una patología tipo Alzheimer y más longevas que los machos. Para el grupo control se utilizaron animales de la cepa B6129SF2/J y, para el grupo experimental, animales 3xTgAD (Psen1<tm1Mpm>Tg (APPSwe, tauP301L)1Lfa/Mmja).

2. Obtención de las muestras de tejido

Los animales se anestesiaron y sacrificaron mediante la administración intraperitoneal de pentobarbital sódico (Dolethal, 200 mg/kg i.p; Vetoquinol S.A., Madrid, Spain), se perfundieron transcardíacamente con una solución de suero salino al 0.9% (50 ml) y se fijaron con paraformaldehído (4% en PB 0.1 M, ph = 7.4) durante 12 min (\cong 60 ml). Finalmente, se extrajeron los cerebros y se almacenaron a 4 °C en la misma solución fijadora durante toda la noche. A la mañana siguiente, fueron crioprotegidos con soluciones crecientes de sacarosa hasta la solución final del 30% en PBS 0.1 M (durante 48 h a 4 °C) y se conservaron en solución crioprotectora a -20 °C. Se obtuvieron secciones coronales (40 μ m) empleando un micrótopo de congelación (Leica SM2000R, Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). De cada cerebro se obtuvieron 6 series que fueron conservadas en solución crioprotectora a -20 °C hasta el día de la inmunohistoquímica.

3. Inmunohistoquímica

Se seleccionaron cortes que incluían hipocampo dorsal (2 por animal) y se realizó la inmunohistoquímica para la proteína de unión al calcio (Iba1) específica de macrófagos y microglía. Brevemente, los cortes se lavaron con PBS 0.1M (3 x 10min) y se introdujeron en una solución de bloqueo (NGS 10% y PBS 0.1M+0.3% Tritón) durante 1

hora. Las secciones se incubaron con el anticuerpo primario Rabbit Anti-Iba1 (1:1000, Wako Chemicals, United States) diluido en PBS 0.1M+0.3% Tritón durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se volvieron a lavar en PBS 0.1M (3 x 10 min) y se incubaron durante 2 horas con el anticuerpo secundario Alexa 488 goat anti-rabbit (1:500, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, United States). Transcurrido ese tiempo, se volvieron a lavar con PBS 0.1M (2 x 10min) y se marcaron los núcleos mediante la incubación con DAPI (1:1000 en dH₂O) durante 1 minuto. Finalmente, se lavaron con PB 0.1M, se montaron sobre portas y se cubrieron con el medio de montaje Fluorsave (Merck Millipore).

4. Obtención y análisis de las imágenes

Cada corte se analizó con una unidad de exploración confocal láser TCSSP2, equipada con rayos láser de argón y helio-neón acoplada a un microscopio Leica invertido DMIRB (Leica Microsystems). Para el fluoróforo Alexa 488, la excitación fue de 488 nm para una emisión de 510-570 nm y para DAPI la excitación de 405 nm para una emisión de 463-491 nm. Se capturaron secciones seriadas de 0,4 μ m utilizando el software Leica Confocal (V 2.61). Los detalles de las células se tomaron con un aumento de 40 \times y las imágenes se adquirieron de manera secuencial.

Se obtuvieron tres imágenes de la región CA1 del hipocampo que fueron analizadas con el programa Image-J (<https://imagej.net/Fiji/Downloads>) siguiendo el protocolo de la Universidad de Arizona (Young y Morrison 2018) (para más información sobre los pasos a seguir para el procesamiento de las imágenes consultar fig. 1 y la revisión). Se seleccionaron aleatoriamente 10 células de cada animal y se usaron las extensiones AnalyzeSkeleton y FracLac para analizar los distintos parámetros de las células. El proceso requiere una notable inversión de tiempo, pero proporciona muy buenos resultados con respecto a la complejidad de las ramificaciones, forma y tamaño de la célula microglial.

- *Análisis del esqueleto (AnalyzeSkeleton)* (<http://imagej.net/AnalyzeSkeleton>)
Analiza múltiples células dentro de una región de interés y nos proporciona una imagen “etiquetada” con la longitud de las ramificaciones. Es necesario convertir la imagen en binaria y aplicar una serie de filtros para que pueda ser analizada por el programa (consultar Young y Morrison 2018).
- *Análisis fractal* (<https://imagej.nih.gov/ij/plugins/fractal/fractal.html>)

Es una medida de la complejidad de la microglía que cuantifica el contorno de cada célula teniendo en cuenta los puntos finales y las longitudes de las ramificaciones. El programa se basa en un protocolo *box plot* que determina la cantidad de píxeles con una escala creciente (Young y Morrison 2018). De los datos obtenidos, en base a la literatura, nos centramos en los siguientes:

- A. La *dimensión fractal*. Mide la complejidad de los patrones celulares. Valores más altos indican una mayor complejidad.

- B. La *lacunaridad*. Se asocia con cambios en el soma. Valores altos implican heterogeneidad, que la imagen contiene muchos espacios o “lagunas” de diferentes tamaños.
- C. La *densidad* (solidez). Se calcula dividiendo el área de la célula entre el área de su forma. Valores altos implican formas ameboides.
- D. El *área* de la célula. Se cuantifica como el número total de píxeles presentes en la forma rellena de la imagen, que luego se transforma en micrómetros cuadrados. Valores altos indican largas prolongaciones.
- E. El *perímetro*. Mide el número de píxeles que representan el contorno de la célula. Valores más altos indican ramificaciones mayores.
- F. La *forma* (*Span Ratio*). Es la relación entre el eje mayor y el eje menor. Valores más altos indican células más ramificadas, menos compactas.
- G. La *circularidad*. Este parámetro varía entre 0 (polígono lineal) a 1 (círculo perfecto). Como con la densidad, valores más altos indican formas ameboides.

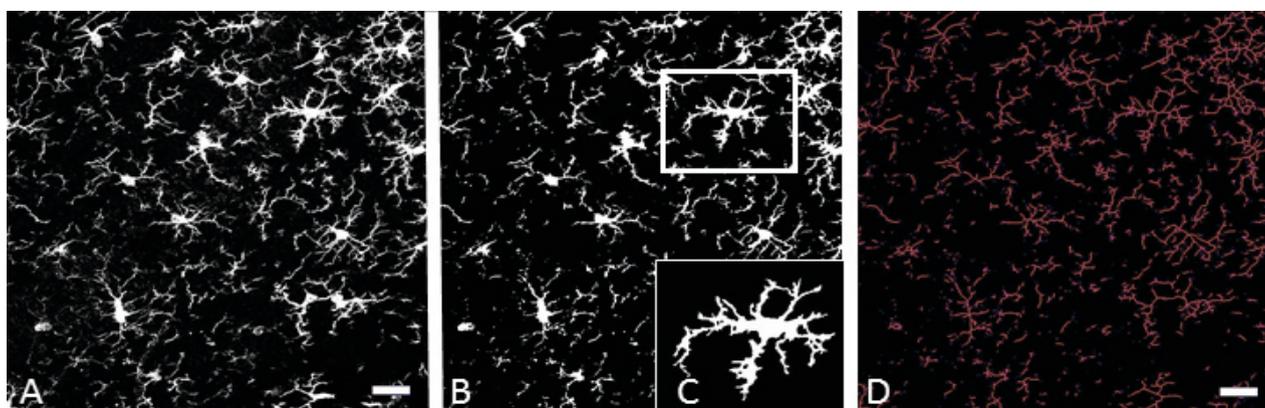


Figura 1. Representación del método de procesamiento de la imagen. Se aplican una serie de filtros a la imagen original (A) para que el programa pueda interpretarla. Desde la imagen binaria (B) se seleccionan las células (C) para su posterior análisis. El análisis del esqueleto proporciona una imagen (D) con la longitud de las ramificaciones. Escala = 20 μm .

5. Análisis estadístico

Los datos se muestran como media \pm SEM y se analizan usando GraphPad Prism 9.1.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) con significación estadística asignada cuando $p < 0,05$. La normalidad y la homocedasticidad de los datos fueron evaluadas mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene respectivamente. Todos los parámetros anteriores se analizaron mediante un análisis de varianza bidireccional (ANOVA) y ambos grupos mediante una prueba t con muestras independientes.

Resultados

Los cambios morfológicos de las células de microglía son dependientes del envejecimiento normal (figuras 2 y 3).

La investigación de los últimos años ha relacionado cambios en los patrones de los parámetros morfológicos y fenotípicos de las células de microglía con distintas condiciones patológicas, y, en base a estas investigaciones, quisimos evaluar estas diferencias teniendo en cuenta la variable edad. Las diferencias que obtuvimos en nuestro modelo añoso fueron significativas ($p < 0,05$) solo en cuanto al parámetro circularidad ($p = 0,0072$). En cambio, en el resto de los parámetros evaluados (dimensión fractal, lacunaridad, densidad, área, perímetro y forma), no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) (fig. 2).

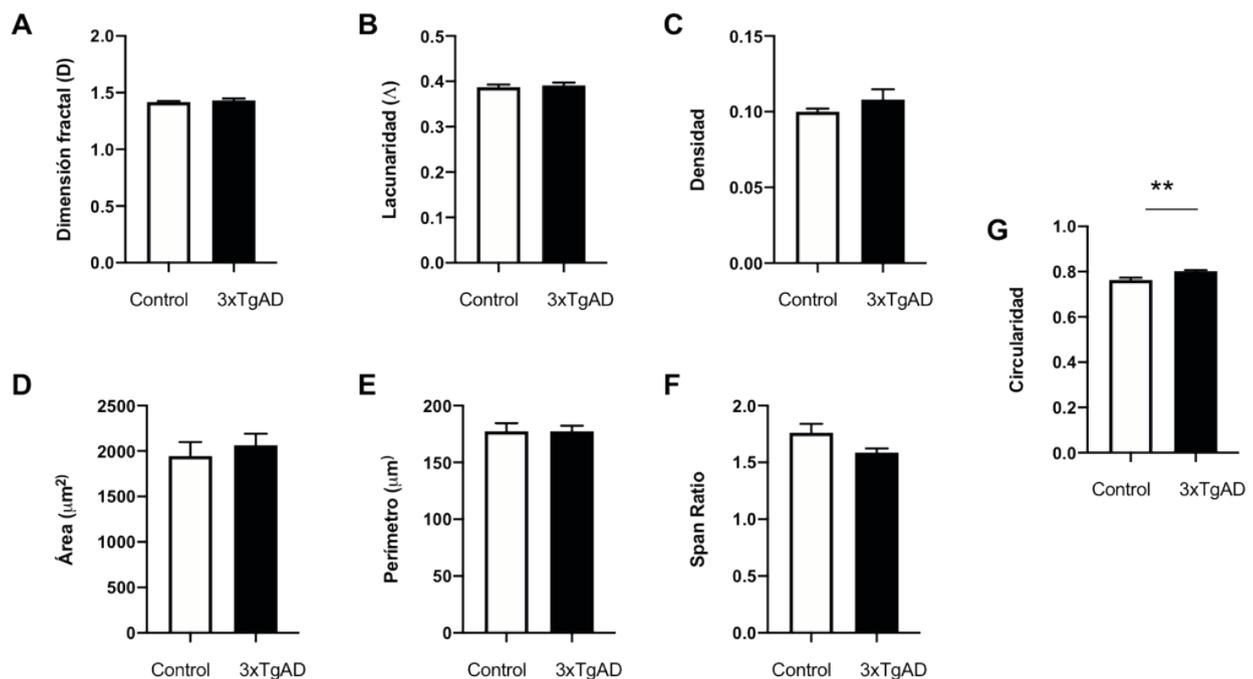


Figura 2. Resultados del análisis fractal de las células microgliales del hipocampo de animales añosos 3xTgAD y controles. No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en dimensión fractal (A), lacunaridad (B), densidad (C), área (D), perímetro (E) ni forma (F). Encontramos diferencias significativas ($p = 0,0072$) solo en cuanto a la circularidad (G).

La siguiente tabla muestra el resumen de los resultados:

	D. Fractal	Lacunaridad	Densidad	Área	Perímetro	Forma	Circularidad
Controles	1.4177	0.3871	0.1000	1945.035	177.4302	1.7602	0.7636
3xTgAD	1.4325	0.3912	0.1080	2064.4845	177.3993	1.5852	0.8016
p	0.44	0.64	0.31	0.56	0.99	0.07	<u>0.01</u>

Estos datos nos indica que, a edades avanzadas, ambos grupos presentan microglía con un fenotipo activo (fig. 3).

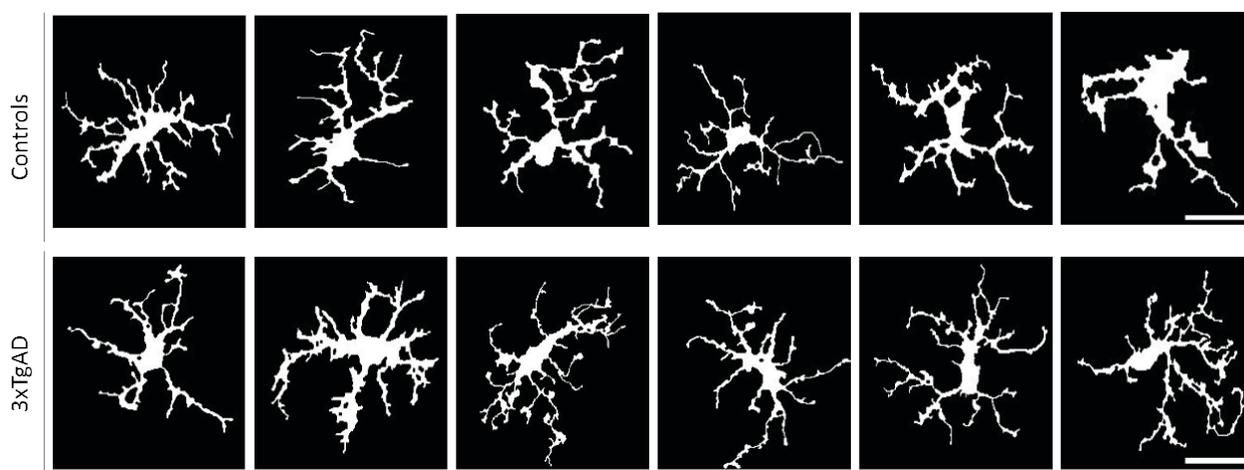


Figura 3. Representación de la morfología microglial en el hipocampo de animales añosos 3xTgAD y controles. Se representan seis células correspondientes a animales del grupo control (A) y a los animales del grupo 3xTgAD (B) (escala= 20µm)

Discusión

El presente trabajo es novedoso en dos aspectos: por una parte, ha sido realizado por completo con hembras, en oposición al resto de estudios que suelen usar machos; y, por otra, porque ha sido realizado en estadios avanzados de la enfermedad (19-22 meses). Este rango de edad corresponde a unos 65-75 años en humanos (Dutta y Sengupta 2016) y es la edad a la que suelen aparecer los primeros síntomas de la EA esporádica. En él se pretende caracterizar la morfología de las células microgliales situadas en el hipocampo de un modelo añoso de EA.

Uno de los estudios más completos que habla de diferencias significativas utilizando estas mismas herramientas software, es el de Fernández-Arjona (Fernández-Arjona et al.

2017). En él se analizan los cambios que se producen en el proceso de neuroinflamación tras la inyección de la enzima neuraminidasa (NA) y encuentran diferencias en cuanto a la dimensión fractal, lacunaridad, área, densidad y perímetro. Este estudio demuestra que se producen cambios morfológicos celulares, pero no tienen en cuenta ni el sexo ni la edad de los animales, que son dos variables muy ligadas a la EA y al proceso de neurodegeneración. Además, es probable que el tipo de lesión y su evolución temporal y espacial puedan impulsar la activación selectiva de estas células. Por ejemplo, Zanier et al. demostraron cómo la microglía con morfología activa muestra una distribución diferente en tres modelos distintos de lesión cerebral 24h después de la lesión, y que la microglía de cerebros en estadios avanzados de la enfermedad tiene cambios morfológicos más profundos que los de los cerebros en estadios anteriores (Zanier et al. 2015). Aun con todo esto, también hay que tener en cuenta las limitaciones del estudio, en relación sobre todo con el enfoque bidimensional a la hora de analizar las células.

Por otra parte, la mayoría de los trabajos que hablan de cambios morfológicos, se refieren sobre todo a cambios en la densidad de las células, pero la calculan dividiendo el número de células entre la superficie total de la imagen. Esta forma de calcular la densidad no sería la más acertada, ya que dentro de una misma imagen, la microglía puede presentar distintas morfologías. Por ejemplo, se ha descrito cómo la microglía asociada a las placas de β -amiloide sufre cambios morfológicos y electrofisiológicos dramáticos, mientras que la microglía distante a las placas muestra cambios menores (Plescher et al. 2018). Estos estudios han contribuido a clasificar los diferentes tipos morfológicos, pero no dicen cuándo se produce el cambio, una de las preguntas más importantes en el estudio de la neurodegeneración. Además, existe la enorme necesidad de unificar un protocolo para aumentar su fiabilidad.

La microglía son células muy heterogéneas, con diversos fenotipos funcionales que van desde M1 (proinflamatorios) hasta M2 (inmunosupresores). Aunque esta clasificación ha sido útil para conceptualizar las actividades de la microglía *in vitro*, cada vez es más aceptado que este paradigma no es suficiente para describir su activación *in vivo*, ya que rara vez muestra un sesgo significativo hacia un fenotipo u otro. Por ejemplo, en modelos de neurodegeneración, la microglía expresa factores neurotóxicos y neuroprotectores, genes implicados en la fosforilación oxidativa y factores de lisosomas, ribosomas y de espliceosomas, complejos formados por proteínas y ARN que catalizan la producción de ARNm maduros, involucrados en las respuestas a proteínas mal plegadas, estrés y muerte o lesión neuronal (Colonna y Butovsky 2017). Por lo que es necesario que se sigan definiendo los múltiples fenotipos de microglía asociados al envejecimiento, en diferentes condiciones neuropatológicas y en distintas etapas de la enfermedad. Más aún, recientes estudios transcriptómicos de microglía comparando ratones sanos y ratones que acumulan A β han identificado subpoblaciones definidas como *microglía asociada a enfermedad* (DAM; *disease-associated microglia*), que se encuentran alrededor de las placas A β , tienen una expresión desregulada de los genes de detección, mantenimiento y defensa del huésped, y aparecen en condiciones de acumulación de cuerpos apoptóticos neuronales y restos de mielina (Deczkowska et al. 2018). Estos hallazgos respaldan un vínculo directo entre las funciones microgliales aberrantes y la EA y sugieren que un subconjunto de microglía pasa de ser homeostático a DAM en la EA.

En este trabajo, analizamos las posibles diferencias morfológicas existentes entre animales de avanzada edad sanos y animales del modelo 3xTgAD. Nuestra hipótesis inicial era

que los animales del 3XTgAD presentarían más diferencias morfológicas que los controles. Sin embargo, el análisis pormenorizado de los diferentes parámetros morfológicos determinó que, salvo en la circularidad, ambas morfologías microgliales no diferían. La ausencia de diferencias significativas pone de manifiesto la importancia de la variable edad para entender el correcto funcionamiento de estos grupos celulares en el proceso de neurodegeneración.

En definitiva, la comprensión de la biología celular ha aumentado de manera exponencial en los últimos años. Se están definiendo los perfiles de expresión génica de la microglía y correlacionándolos con funciones específicas, lo que permite comprender sus funciones en la neurodegeneración y explorar las vías que regulan su respuesta a las lesiones. Sin embargo, cuál es su papel en la fisiopatología de la EA sigue siendo una de las cuestiones más críticas que necesita respuesta. Comprender su heterogeneidad morfológica, transcripcional y espacial puede ser la clave para descubrirlo. Ante la falta de un protocolo estandarizado, proponemos Image-J, con sus extensiones para el análisis fractal, como herramienta para estudiar la morfología de la microglía; por ser extremadamente sensible a los patrones de ramificación y contornos, porque ha demostrado su eficacia para analizar la microglía, y porque el software es de libre acceso para cualquier persona. Este modelo debe seguir evolucionando, teniendo en cuenta las muchísimas limitaciones de este trabajo, entre las que destacamos el reducido número de las muestras (tanto del número de animales como de células analizadas) y que se han seleccionados sólo células del hipocampo (la activación microglial puede ser región-dependiente y derivada de su entorno, por lo que este estudio debe ser ampliado con otras áreas). En definitiva, este estudio plantea un posible punto de partida para el análisis microglial, y hay que considerar que otros factores afecten a su morfología y a su función.

Referencias bibliográficas

- Alzheimer's Disease International. 2019. *World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia*. London: Alzheimer's Disease International.
- Bartels, Tim, Sebastiaan De Schepper y Soyon Hong. 2020. "Microglia modulate neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases". *Science*, 370(6512): 66-69. <https://doi.org/10.1126/science.abb8587>.
- Bello-Medina, Paola C., Diego A. González-Franco, Isaac Vargas-Rodríguez y Sofía Díaz-Cintra. 2019. "Oxidative stress, the immune response, synaptic plasticity, and cognition in transgenic models of Alzheimer disease". *Neurología*, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2019.06.002>.
- Billings, Lauren M., Salvatore Oddo, Kim N. Green, James L. McGaugh y Frank M. LaFerla. 2005. "Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice". *Neuron*, 45(5): 675-688. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.040>.
- Bohlen, Christopher J., Brad A. Friedman, Borislav Dejanovic y Morgan Sheng. 2019. "Microglia in Brain Development, Homeostasis, and Neurodegeneration". *Annual Review of Genetics*, 53: 263-288. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112618-043515>.
- Calsolaro, Valeria y Paul Edison. 2016. "Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions". *Alzheimer's and Dementia*, 12(6): 719-732. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.02.010>.

- Colonna, Marco y Oleg Butovsky. 2017. "Microglia function in the Central Nervous System during health and neurodegeneration". *Annual Review of Immunology*, 35: 441-468. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>.
- Condello, Carlo, Peng Yuan, Aaron Schain y Jaime Grutzendler. 2015. "Microglia constitute a barrier that prevents neurotoxic protofibrillar A β 42 hotspots around plaques". *Nature Communications*, 6: 1-14. <https://doi.org/10.1038/ncomms7176>.
- Deczkowska, Aleksandra, Hadas Keren-Shaul, Assaf Weiner, Marco Colonna, Michal Schwartz e Ido Amit. 2018. "Disease-Associated Microglia: A universal immune sensor of neurodegeneration". *Cell*, 173: 1073-1081. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.003>.
- Dutta, Sulagna y Pallav Sengupta. 2016. "Men and mice: Relating their ages". *Life Sciences*, 152 (1): 244-248. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.025>.
- Fernández-Arjona, María del Mar, Jesús M. Grondona, Pablo Granados-Durán, Pedro Fernández-Llebrez y María D. López-Ávalos. 2019. "Microglial morphometric parameters correlate with the expression level of IL-1b and allow identifying different activated morphotypes". *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 13,472. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00472>.
- Hardy, John A. y Gerald A. Higgins. 1992. "Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis". *Science*, 256(5054): 184-185.
- Hashemiaghdam, Arsalan y Magdalena Mroczek. 2020. "Microglia heterogeneity and neurodegeneration: The emerging paradigm of the role of immunity in Alzheimer's disease". *Journal of Neuroimmunology*, 341 (2020): 577185. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2020.577185>.
- Hickman, Suzanne, Elizabeth Allison, y Joseph El Khoury. 2008. "Microglial dysfunction and defective β -amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice". *Journal of Neuroscience*, 28(33): 8354-8360. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0616-08.2008>.
- Hickman, Suzanne, Saef Izzy, Pritha Sen, Liza Morsett, y Joseph El Khoury. 2018. "Microglia in neurodegeneration". *Nature Neuroscience*, 21(10): 1359-1369. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0242-x>.
- Kitazawa, Masashi, Salvatore Oddo, Tritia R. Yamasaki, Kim N. Green y Frank M. LaFerla. 2005. "Lipopolysaccharide-Induced Inflammation Exacerbates Tau Pathology by a Cyclin-Dependent Kinase 5-Mediated Pathway in a Transgenic Model of Alzheimer's Disease". *Journal of Neuroscience*, 25(39): 8843-8853. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2868-05.2005>.
- Leng, Fangda y Paul Edison. 2020. "Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here?". *Nature Reviews. Neurology*, 17(3): 157-172. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y>.
- Li, Qingyun y Ben A. Barres. 2018. "Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease". *Nature Reviews. Immunology*, 18(4): 225-242. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.125>.
- Lue, Lih-Fen, Tomas Beach y Douglas Walker. 2019. "Alzheimer's Disease research using human microglia". *Cells*, 8(8): 1-19. <https://doi.org/10.3390/cells8080838>.
- Mcgeer, Patrick L., Shigeru Itagaki, Hisao Tago y Edith Mcgeer. 1987. "Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR". *Neuroscience Letters*, 79(1987), 195-200.

- Oddo, Salvatore, Lauren Billings, J. Patrick Kesslak, David H. Cribbs y Frank M. LaFerla. 2004. "A β Immunotherapy Leads to Clearance of Early, but not Late, Hyperphosphorylated Tau Aggregates via the Proteasome". *Neuron*, 43(3): 321-332. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.07.003>.
- Oddo, Salvatore, Antonella Caccamo, Jason D. Shepherd, M. Paul Murphy, Todd E. Golde, Rakez Kaye, Raju Metherate, Mark P. Mattson, Yama Akbari y Frank M. LaFerla. 2003. "Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles Intracellular A β and Synaptic Dysfunction". *Neuron*, 39(3): 409-421. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00434-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3).
- Parachikova, Anna, Michael G. Agadjanyan, David H. Cribbs, Mathew Blurton-Jones, Victoria M. Perreau, Joseph Rogers, Thomas G. Beach y Carl W. Cotman. 2007. "Inflammatory changes parallel the early stages of Alzheimer disease". *Neurobiology of Aging*, 28(12): 1821-1833. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.08.014>.
- Parachikova, Anna y Carl W. Cotman. 2007. "Reduced CXCL12/CXCR4 results in impaired learning and is downregulated in a mouse model of Alzheimer disease". *Neurobiology of Disease*, 28(2): 143-153. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.07.001>.
- Perl, Daniel. 2010. "Neuropathology of Alzheimer's Disease". *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*, 77(1): 32-42. <https://doi.org/10.1002/msj.20157>.
- Plescher, Monika, Gerald Seifert, Jan Niklas Hansen, Peter Bedner, Christian Steinhäuser y Annett Halle. 2018. "Plaque-dependent morphological and electrophysiological heterogeneity of microglia in an Alzheimer's disease mouse model". *Glia*, 66:1464-1480. <http://doi.org/10.1002/glia.23318>.
- Song, Jing. 2018. "Animal Model of Aluminum-Induced Alzheimer's Disease". *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1091: 113-127. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1370-7_7.
- Wang, Shoutang y Marco Colonna. 2019. "Microglia in Alzheimer's disease: A target for immunotherapy". *Journal of Leukocyte Biology*, 106(1): 219-227. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0818-319R>.
- Young, Kimberly y Helena Morrison. 2018. "Quantifying microglia morphology from photomicrographs of immunohistochemistry prepared tissue using image-J". *Journal of Visualized Experiments*, 136: 1-9. <https://doi.org/10.3791/57648>.
- Yuan, Chunxu, Ailikemu Aierken, Zhen Xie, Nuomin Li, Juan Zhao y Hong Qing. 2020. "The age-related microglial transformation in Alzheimer's disease pathogenesis". *Neurobiology of Aging*, 92: 82-91. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2020.03.024>.
- Zanier, Elisa R., Stefano Fumagalli, Carlo Perego, Francesca Pischiutta y Maria-Grazia De Simoni. 2015. "Shape descriptors of the "never resting" microglia in three different acute brain injury models in mice". *Intensive Care Medicine Experimental*, (2015) 3:7. <https://doi.org/10.1186/s40635-015-0039-0>.
- Zetterberg, Henrik y Barbara B. Bendlin. 2021. "Biomarkers for Alzheimer's disease: preparing for a new era of disease-modifying therapies". *Molecular Psychiatry*, 26(1): 296-308. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0721-9>.