

Relación entre neuroinflamación y ovillos neurofibrilares en el hipocampo del modelo 3xTg de la Enfermedad de Alzheimer

JORGE LUCERÓN MORALES
al189442@uji.es

FRANCISCO ROS BERNAL
fros@uji.es

Resumen

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo de demencia más común y la mayor pandemia de nuestros tiempos, y afecta en una proporción 2:1 a las mujeres. A nivel clínico implica un deterioro severo en las funciones cognitivas y ejecutivas. A nivel neuropatológico, se caracteriza por el depósito del péptido β -amiloide en placas extracelulares, la formación de ovillos neurofibrilares intraneuronales, neuroinflamación exacerbada, exceso de estrés oxidativo, muerte neuronal y pérdida de sinapsis, entre otras. La investigación de las últimas décadas ha ampliado el punto de mira a la hora de abordar la enfermedad situando a la neuroinflamación como uno de los componentes más importantes, tanto en el comienzo como en la progresión de la EA. En este estudio se analizó la relación existente entre la microglía y los ovillos neurofibrilares en un modelo murino de EA. La principal novedad aportada es que presentamos un estudio en ratones hembra y un seguimiento de las asociaciones microglía y depósitos asociados con la edad.

Se usaron un total de 18 hembras, divididas en controles y 3xTgAD (n=9 cada grupo) y en tres rangos de edad (9, 12 y 15 meses). Se analizaron las regiones CA1 y CA3 (ventral y dorsal) del hipocampo teñidas inmunohistoquímicamente con marcadores para microglía y ovillos neurofibrilares.

Los resultados muestran que el aumento del número de células es dependiente de la edad, mientras que la formación de ovillos intracelulares lo es de la evolución de la enfermedad. Estos datos apoyan la idea de que la patología tau en el hipocampo está relacionada con la neuroinflamación. En este sentido, alteraciones en la función de vigilancia microglial pueden ser tan o más importantes que una ganancia de su función tóxica en la fisiopatología de la enfermedad.

Palabras clave: Enfermedad de Alzheimer, microglía, neuroinflamación, ovillos neurofibrilares, 3xTgAD.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most common type of dementia and the greatest pandemic of our times, affecting women in a 2:1 ratio. At the clinical level, it involves severe impairment of cognitive and executive functions. At the neuropathological level, it is characterized by the deposition of β -amyloid peptide in extracellular plaques, the formation of intraneuronal neurofibrillary tangles, exacerbated neuroinflammation, excess oxidative stress, neuronal death, and synapse loss, among others. Research in recent decades has broadened the focus in addressing the disease to include neuroinflammation as one of the most important components in both the onset and progression of AD. In this study we analyzed the relationship between microglia and neurofibrillary tangles in a murine model of AD. The main novelty provided is that we present a study in female mice and a follow-up of the associations between microglia and age-associated deposits.

A total of 18 females were used, divided into controls and 3XTGAD (n=9 each group) and in three age ranges (9, 12 and 15 months). Immunohistochemically stained CA1 and CA3 regions (ventral and dorsal) of the hippocampus were analyzed with markers for microglia and neurofibrillary tangles.

The results show that the increase in cell number is age-dependent, whereas the formation of intracellular tangles is dependent on disease progression. Our data support the idea that tau pathology in the hippocampus is related to neuroinflammation. In this sense, alterations in microglial surveillance function may be as or more important than a gain of its toxic function in the pathophysiology of the disease.

Key Words: Alzheimer's Disease, Microglia, Neuroinflammation, Neurofibrillary Tangles, 3XTGAD.

Introducción

1. El concepto de microglía

Las células de microglía, una población especializada de células similares a los macrófagos, están consideradas los centinelas inmunitarios del sistema nervioso central (SNC) y juegan un papel clave en la respuesta inflamatoria posterior a lesiones en el cerebro (Cho y Choi 2017). Morfológicamente, son células muy heterogéneas y se han clasificado, a grandes rasgos, como ameboide y ramificada. La microglía ramificada vigila constantemente su microambiente extendiendo y retrayendo sus prolongaciones y, tras una lesión, se activan rápidamente y cambian su morfología a ameboide (Lara-Ureña 2020). Sus estados de activación han sido clasificados, al igual que el resto de los macrófagos, en «clásica» o M1 con fenotipo proinflamatorio, y «alternativa» o M2, con fenotipo antiinflamatorio y que facilita la cicatrización (Martínez y Gordon 2014),

aunque la investigación de los últimos años ha descrito otros tipos de fenotipos que diferencian a estas células del resto de los macrófagos (probablemente debido a que su procedencia en el desarrollo es distinta) (Ginhoux et al. 2013). Microlesiones inducidas por láser hacen que dirijan sus ramificaciones hacia el sitio dañado para formar estructuras capaces de fagocitar el tejido (Davalos et al. 2005). Daños mayores o estímulos inflamatorios inducen cambios morfológicos, pasando de tener forma ramificada a tener morfología ameboide, donde el cuerpo celular se agranda y las ramificaciones se acortan, cubriendo áreas más limitadas (Colonna y Butovsky 2017).

2. Enfermedad de Alzheimer y Neuroinflamación

La Enfermedad de Alzheimer (EA) implica un deterioro severo en las funciones cognitivas y ejecutivas y representa un 60-70% del total de los casos de demencia (Cherbuin et al. 2022). A nivel neuropatológico, esta enfermedad se caracteriza, entre otras, por la presencia de depósitos de péptido β -amiloide en placas neuríticas extracelulares (A β) y la formación de ovillos neurofibrilares intraneuronales de proteína tau (Hardy y Higgins 1992), una neuroinflamación exacerbada (Song 2018), pérdida de sinapsis (Hickman et al. 2018), exceso de estrés oxidativo y muerte neuronal selectiva (Hashemiaghdam y Mroczek 2020). En efecto, la activación de las células microgliales es un elemento clave en el proceso neurodegenerativo cuando estas son expuestas por períodos prolongados a señales de daño, como las placas seniles o los ovillos neurofibrilares, el estrés oxidativo o las infecciones recurrentes, lo que desencadenarían una respuesta proinflamatoria persistente que conduce a la cascada neurodegenerativa (Leng y Edison 2021).

La activación microglial por A β , los oligómeros de tau y las secreciones posteriores atraen a las células microgliales vecinas para acelerar la eliminación activa de los depósitos de proteínas mal plegadas y cuerpos neuronales degenerados (Ghosh et al. 2021). Este proceso que promueve el aumento de la activación microglial, crea un bucle de retroalimentación que desempeña un papel fundamental en el desarrollo de la EA (Cho y Choi 2017). La relación entre A β y neuroinflamación ha sido uno de los campos más explorados, y se ha descrito cómo la microglía forma una barrera física para contener las placas seniles y proteger a las neuronas de la neurodegeneración (Condello et al. 2015). Paralelamente, la microglía parece responder a la patología de tau a través de distintos mecanismos (como la activación y secreción de citoquinas o la propagación de los depósitos de tau) (Hopp et al. 2018; Ghosh et al. 2021). Por otro lado, también se ha propuesto que la respuesta microglial es independiente de la progresión de la patología tau (Zhu et al. 2020), o incluso que la microglía no es capaz de responder a la elevada toxicidad de tau soluble (Sanchez-Mejias et al. 2016).

Se necesitan nuevos enfoques y explicaciones concretas que exploren las vías que conectan la inflamación y la neurodegeneración en la EA para desarrollar nuevas estrategias para su tratamiento, puesto que las que van dirigidas solo a las patologías amiloide y tau siguen siendo insuficientes. Además, el aumento de las evidencias que apoyan no solo el papel promotor sino también el causal de los eventos neuroinflamatorios en la enfermedad, enfatizan la necesidad de explorar nuevos enfoques de tratamiento centrados en la prevención o la desaceleración de la inflamación del SNC

(Webers, Heneka y Gleeson 2020). Un mayor conocimiento y comprensión de las respuestas inflamatorias e inmunitarias en el SNC son cruciales para las terapias destinadas a la reparación del tejido nervioso. Por todo esto, el objetivo principal de este trabajo es conocer cuál es la respuesta de las células de microglía ante la aparición de los ovillos patológicos que ayuden a desarrollar estrategias de tratamiento más eficaces. Este planteamiento lo abordaremos desde dos perspectivas: i) el uso exclusivo de animales hembra, dada la mayor prevalencia de esta enfermedad en este sexo y ii) un estudio asociado con la edad, analizando los animales en tres marcos temporales distintos.

Método

1. Animales

Se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, a 23°C y 60% de humedad, con comida y agua disponibles *ad libitum*. Su cuidado y mantenimiento se realizó según 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 utilizaron un total de 18 hembras, divididas en controles de la cepa C57bl6 y 3XTGAD (n=9 cada grupo), y, dentro de cada grupo, contamos con 3 animales de cada rango de edad (9, 12 y 15 meses). Se eligieron hembras porque son más susceptibles a una patología tipo Alzheimer y más longevas que los machos (para más información sobre el modelo, Oddo et al. 2003).

2. Obtención de las muestras de tejido

Los animales se anestesiaron mediante la administración intraperitoneal de pentobarbital sódico (Dolethal, 200 mg/kg i.p; Vetoquinol S.A., Madrid, Spain) y se perfundieron transcardíacamente con una solución de suero salino al 0,9% (50 ml) y posteriormente se fijaron con paraformaldehído (4% en PB 0,1 M, pH=7,4) durante 12 minutos (\cong 60 ml). Finalmente, se extrajeron los cerebros que fueron almacenados a 4°C en la misma solución fijadora durante toda la noche. Los cerebros fueron crioprotectados con soluciones crecientes de sacarosa hasta alcanzar la solución final al 30% en PBS 0,1 M (durante 48 horas a 4°C). Finalmente fueron almacenados en solución crioprotectora a -20°C hasta su procesamiento final.

Se obtuvieron secciones en el plano coronal (40 μ m) empleando un micrótopo de congelación (Leica SM2000R, Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). De cada cerebro se hicieron 6 series que fueron conservadas en solución crioprotectora a -20°C hasta el día que se llevó a cabo la inmunohistoquímica.

3. Inmunohistoquímica

Se seleccionaron cortes hipocampales que incluyeran dos niveles anatómicos ventral y dorsal (Bregma -2,06 y -2,92 mm, respectivamente). Se realizó una doble tinción para marcar Iba1, específica de macrófagos y microglía, y los depósitos de tau. Brevemente, los cortes se lavaron con PBS 0,1M (3x10 minutos) 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) y Mouse Anti-Phosphotau (1:500, Fisher Scientific SL, Rockford, United States) diluido en PBS 0,1 M+0,3% Tritón durante toda la noche. Al día siguiente, se volvieron a lavar en PBS 0,1 M (3x10 minutos) y se incubaron durante 2 horas con el anticuerpo secundario Alexa 488 goat antirabbit (1:500, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, United States) y Cy3 goat antimouse (1:200, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, United States) también diluidos en PBS 0,1M+0.3% Tritón. Se volvieron a lavar con PBS 0,1M (2x10 minutos) y, posteriormente, los núcleos se marcaron 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

Las secciones se analizaron con un microscopio de fluorescencia Olympus BX-4CB (OLYMPUS CORPORATION) acoplado a una cámara Leica DFC 550 (Leica Microsystems). Se capturaron las imágenes con el aumento de 20× utilizando el software Leica (V 2.61) para cubrir las zonas CA1 y CA3. Todas las imágenes fueron analizadas de manera cuantitativa usando el programa Image-J:

- Cuantificación de las células de microglía: Se contabilizaron las células IBA1+ si podía identificarse la célula completa (soma y prolongaciones). Se contó el total de células, sin hacer distinción a su morfología o fase de activación.
- Cuantificación de los ovillos de tau: Apoyándonos en el canal «DAPI», se cuantificaron las células phosphotau+ cuando existía un núcleo concordante.

5. Análisis estadístico

Los datos se expresan como media \pm SEM y se analizaron con el programa GraphPad Prism 9.1.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.). La normalidad de los datos se evaluó con la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.

La influencia de las variables grupo (control o 3XTGAD) y edad (9,12 y 15 meses) sobre el número de células microgliales o PHF+, se analizó mediante un ANOVA de dos vías con análisis post hoc de Tukey. La relación entre grupos se determinó mediante un análisis independiente de prueba t.

Para establecer la relación entre el número de células Iba1+ y las neuronas Tau+, se realizó una regresión lineal simple y un análisis de correlación XY, en el que la variable

independiente fueron las células PHF+ y la variable dependiente el número de células de microglía en ambos grupos.

Resultados

El aumento del número de células de microglía es dependiente de la edad, mientras que la formación de ovillos intracelulares depende de la enfermedad. Uno de los objetivos de nuestro grupo es determinar si la presencia de mutaciones en los genes APP, presenilina y tau conduce a una neuroinflamación y a la formación de depósitos y placas en el hipocampo, y si su presencia se correlaciona con alteraciones emocionales, sociales y cognitivas. Se estudió la presencia de placas seniles y ovillos neurofibrilares en cada espacio temporal, y se observó presencia de ambas a los 9 meses (*Figura 1*). Por este motivo, quisimos estudiar cuál es la relación a partir de esta edad.

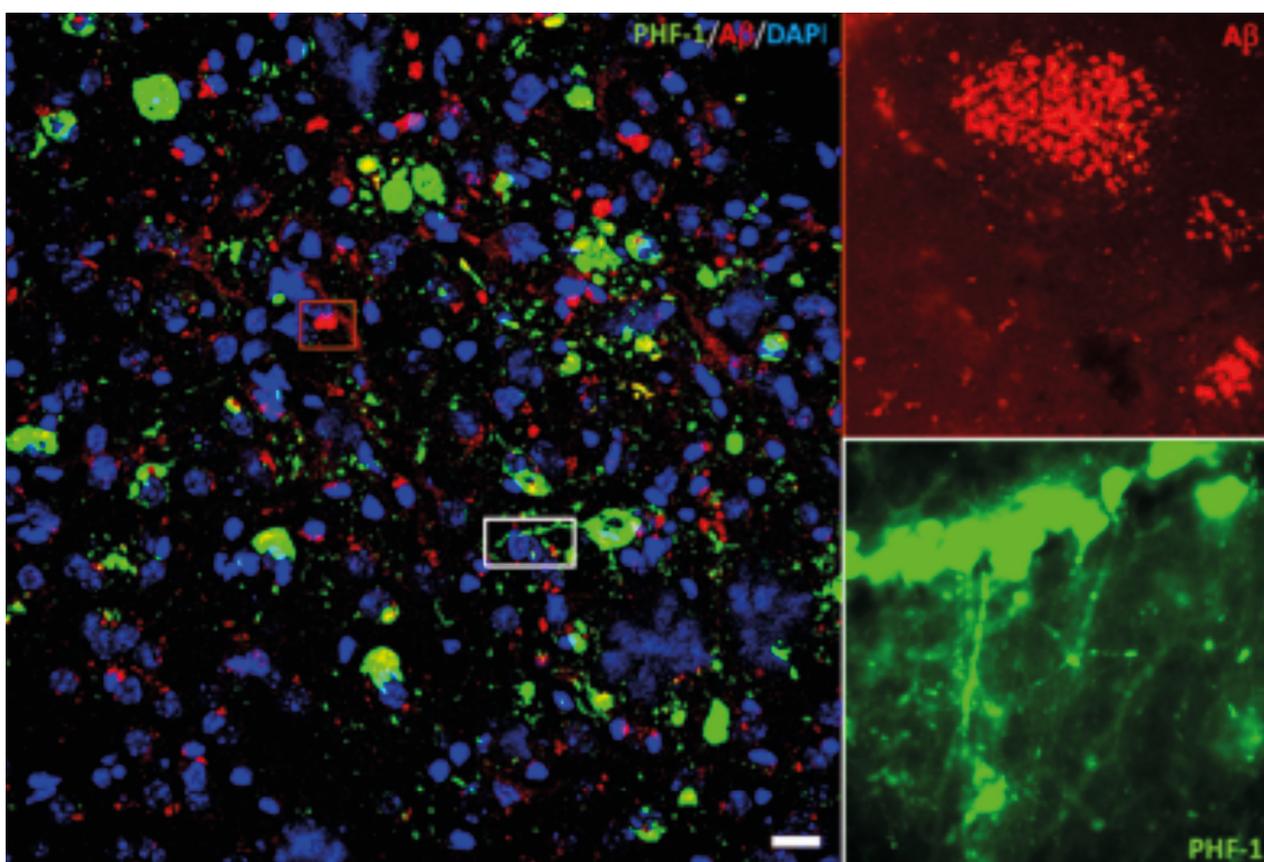


Figura 1

Presencia de ovillos neurofibrilares y placas seniles en ratones 3xTgAD de 9 meses. Se determinó la presencia de placas de beta-amiloide y ovillos de tau con los anticuerpos anti-A β 1-42 y anti-PHF, respectivamente. Escala=20 μ m

Como se expuso en el anterior apartado (*inmunohistoquímica*), la cuantificación se determinó en los dos niveles anatómicos (ventral y dorsal, Bregma -2,06 y -2,92 mm, respectivamente). Primero se determinó el número de células microgliales de los animales de 9 meses, y observamos un aumento significativo del número de células en todas las regiones, excepto en la región vCA3 (*Figura 2*). Sin embargo, a los 12 y a los 15 meses, no se encontraron grandes diferencias significativas ($p > 0,05$) entre animales control y 3XTgAD, y sólo en la región ventral de CA1 el grupo 3XTgAD mostró un aumento significativo ($p = 0,01$ en el grupo de 12 meses y $p = 0,02$ en el grupo de 15 meses) (*no se muestran las imágenes*). Aunque el grupo 3XTgAD muestra un aumento del número de células microgliales asociado a la edad, es muy similar al del grupo control, debido a que, en estadios tardíos de la enfermedad, la influencia de la neurodegeneración es compensada por la edad.

Además de determinar si había variaciones en el número de células microgliales en cada una de las diferentes etapas, también quisimos determinar si el número de células asociado a la edad variaba dentro de cada grupo (*Figura 3*).

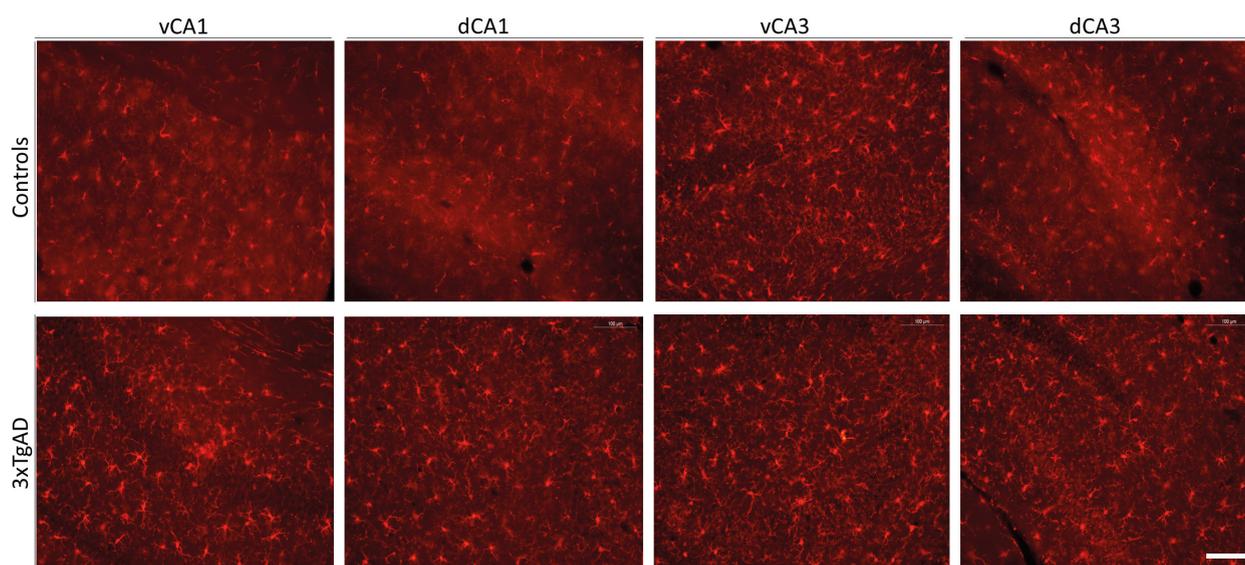


Figura 2

Cuantificación de las células de microglía. Imágenes representativas de células Iba-1+ cuantificadas en el hipocampo ventral y dorsal de las zonas CA1 y CA3 del grupo de animales de 9 meses. Se encontraron diferencias significativas en vCA1, dCA1 y dCA3 ($p = 0,04$, $0,002$ y $0,04$, respectivamente). Escala=100 μ m

La otra variable que medir fue la acumulación de proteína tau, evidenciada por la presencia de células PHF+. Como era de esperar, se obtuvieron diferencias significativas ($p < 0,05$) en todos los grupos en casi todas las áreas estudiadas. Tanto a los 9 como a los 12 meses, el grupo 3XTGAD mostró un aumento significativo de los depósitos de tau en todas las regiones menos en la parte dorsal de CA3 (para el grupo de 9 meses: $p = 0,007$ en vCA1, $p = 0,02$ en dCA1 y $0,006$ en vCA3; para el grupo de 12 meses: $p = 0,03$ en vCA1, $p = 0,03$ en dCA3 y $p = 0,0497$ en vCA3) (*no se muestran las imágenes*). En cambio, a los 15 meses, el grupo 3XTGAD mostró un aumento significativo de los depósitos de tau fosforilado en todas las áreas, siendo especialmente significativo en la región CA3 (*Figura 4*).

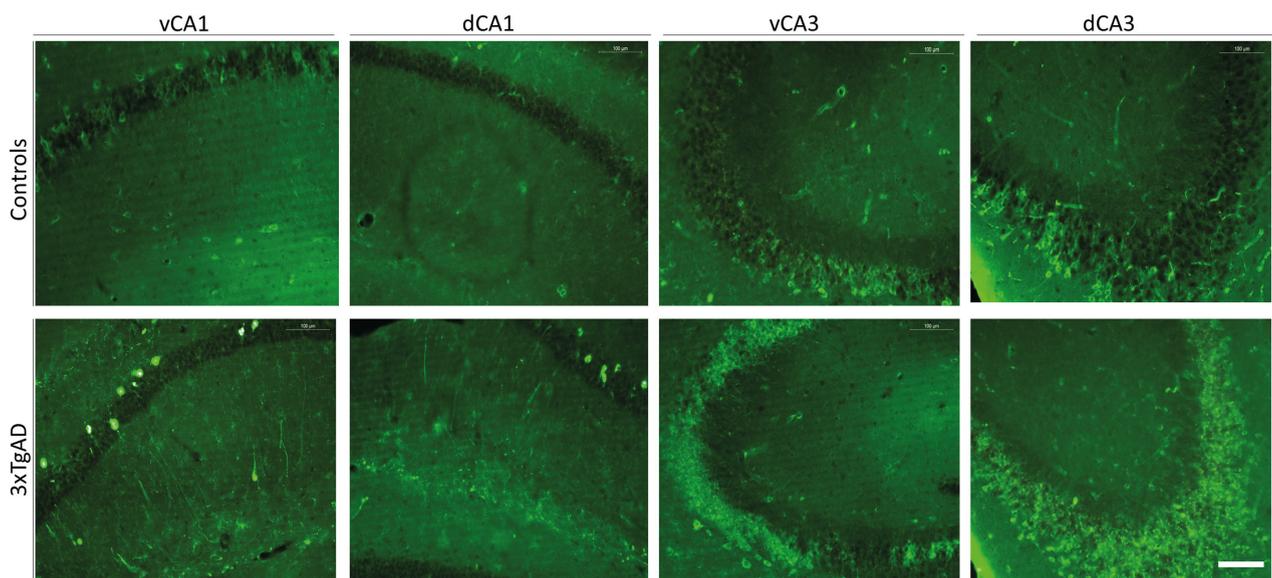


Figura 4

Cuantificación de las células PHF+. Imágenes representativas de células PHF+ cuantificadas en el hipocampo ventral y dorsal de las zonas CA1 y CA3 de animales 15 meses. Se encontraron diferencias significativas en vCA1, dCA1, vCA3 y dCA3 ($p = 0,046$, $0,02$, $0,0001$ y $0,004$, respectivamente). Escala=100µm

De igual manera que con el estudio de las células de microglía, también determinamos si, en cada una de las áreas, había influencia de la edad sobre el número de células PHF+ (*Figura 5*).

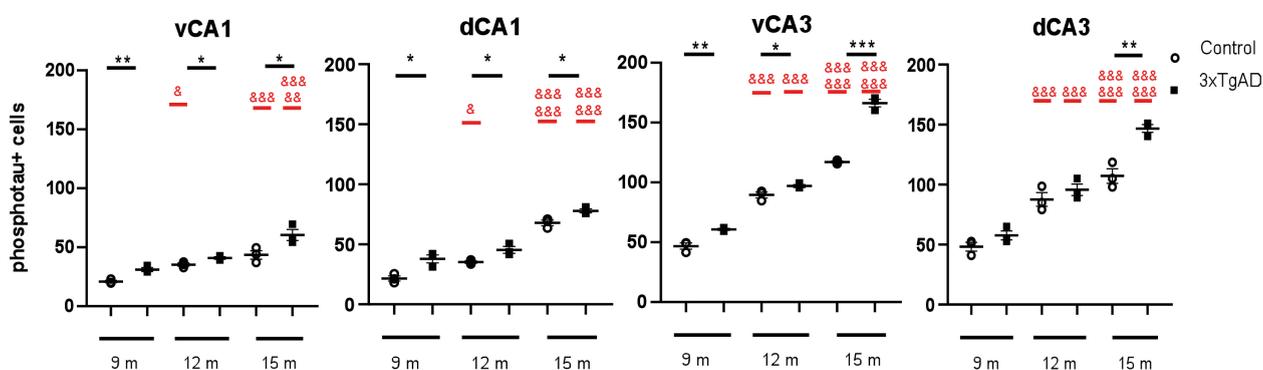


Figura 5

Efecto de las variables «edad» y «grupo» en el número de células de PHF+. Se analizó el efecto del «grupo» (control o 3xTgAD) y la «edad» (9,12 y 15 meses) sobre el número de células phosphotau+ (AT8) en las áreas descritas a través de un ANOVA de dos vías con un análisis de Tukey post hoc. Se muestran las diferencias intergrupo (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$) e intragroup (& $p < 0.05$, && $p < 0.01$ y &&& $p < 0.001$)

Como podemos ver, independientemente del «grupo», la edad induce un aumento significativo del número de células PHF+, que fue más significativo, en el caso de los controles, entre los 9 y los 12 meses en todas las zonas, pero sobre todo en CA3. Por otro lado, el grupo 3xTgAD presentó un aumento significativo durante las tres etapas analizadas en el área CA3, mientras que el aumento de células positivas para PHF solo se encontró entre los 12 y 15 meses de edad.

Además, utilizando un ANOVA de dos vías, también analizamos qué variable determinaba las variaciones encontradas (Tabla 2). En vCA1, la mayor parte de las variaciones se debieron al efecto de la edad (casi el 70%), de forma similar a lo ocurrido en el nivel dorsal. Lo mismo ocurrió en los dos niveles de CA3, donde la variable edad fue significativamente responsable de los cambios observados en porcentajes que superaron el 80% en todos los casos. Por otro lado, en contraste con el análisis de la microglía, individualmente la variante «grupo» (enfermedad) jugó un papel decisivo en los cambios observados en el nivel CA1. Esta variable también produjo cambios en CA3, tanto de forma individual como asociada a la edad.

	Grupo x Edad	Grupo	Edad	Sujeto
vCA1	n.s.	** $p=0,002$	** $p=0,0015$	n.s.
dCA1	n.s.	** $p=0,008$	*** $p < 0,0001$	n.s.
vCA3	*** $p < 0,0001$	*** $p < 0,0001$	*** $p < 0,0001$	n.s.
dCA3	** $p=0,003$	* $p=0,02$	*** $p < 0,0001$	n.s.

vCA1: ventral CA1; dCA1: dorsal CA1; vCA3: ventral CA3; dCA3: dorsal CA3; n.s: no significativo

Tabla 2. Fuente de variación

Finalmente, a través de un análisis de regresión lineal, nuestros datos muestran una clara relación entre el aumento del número de células de microglía y el aumento de ovillos NTF, marcados por las células PHF+, en todos los grupos y en todas las áreas estudiadas. Esta relación fue más fuerte en los animales del grupo de control que en los de 3XTGAD (0,95 frente a 0,40 en la parte ventral de CA1; 0,76 frente a 0,24 en la parte dorsal de CA1; 0,56 frente a 0,24 en la parte ventral de CA3; 0,45 frente a 0,24 en la parte dorsal de CA3) (*datos no mostrados*).

Discusión

En el presente trabajo, quisimos estudiar de qué manera están relacionadas la neuroinflamación presente en la EA con los agregados patológicos de proteína tau característicos en distintas etapas de su desarrollo, ya que se ha estudiado principalmente en relación con la patología β -amiloide (por ejemplo, en ratones transgénicos APP o APP/PS1, que presentan una activación microglial clara y fuerte) y en áreas de cerebros con EA con un contenido de β -amiloide relativamente alto (córtex frontal, por ejemplo) (Hayes et al. 2002; Sánchez-Mejías et al. 2016; Serrano-Pozo et al. 2016). Sin embargo, de regiones cerebrales de especial relevancia en el desarrollo de la enfermedad, como el hipocampo, que presentan baja acumulación de β -amiloide y un elevado número de neuronas con alteraciones de tau, poco se sabe sobre los procesos inflamatorios asociados a dicha patología (Romero-Molina et al. 2018).

Además, el progreso de la EA no puede ser completamente explicado sólo con la teoría de la «cascada amiloide», y una de las variables que ha ganado mucha importancia en los últimos años ha sido el incremento en la actividad inflamatoria, por lo que se han propuesto terapias dirigidas a frenarla (Calsolaro y Edison 2016). Pero para ello, se deberían definir con más exactitud los distintos perfiles de las células de glía y conocer al detalle cuáles son las vías de interacción con los agregados patológicos para desarrollar estrategias terapéuticas más eficientes y seguras.

Nuestros resultados muestran una fuerte relación entre el aumento del número de células de microglía y la patología tau en el hipocampo, tanto en grupo control como en el 3XTGAD, subrayando la importancia de la variable «edad» a la hora de reclutar a estos centinelas inmunitarios y reforzando también la teoría de que la pérdida en la función de vigilancia microglial que se produce con la edad puede ser igual de relevante que una ganancia en su función tóxica para la fisiopatología de la enfermedad. Por ejemplo, en estudios con modelos animales de EA, la activación de las células de microglía produce acumulación de tau y promueve su hiperfosforilación (Yoshiyama et al. 2007; Maphis et al. 2015). En esta línea, se sabe que los animales 3XTGAD presentan déficits en memoria social que son evidentes a partir de los 9 meses (Oddo et al. 2003; De Castro Salazar 2021). Esto correlacionaría con nuestros datos, que muestran que los depósitos de tau fosforilada aumentaron significativamente en todas las áreas estudiadas entre los 9 y los 15 meses, siendo la zona menos afectada la parte dorsal de CA3, que, en comparación con los controles, comienza a acumular un mayor número de ovillos a partir de los 15 meses. Paradójicamente, el número de células microgliales en los animales 3XTGAD solo aumentó significativamente en comparación con los controles en el área ventral de

CA1, que se ha propuesto como el área donde se codifica la memoria social (Okuyama et al. 2018).

Teniendo en cuenta las múltiples limitaciones de este trabajo (destacando el reducido «n» o el análisis cuantitativo en vez de cualitativo de las células de microglía), quisimos resaltar el papel de la variable «edad», que en muchas ocasiones pasa desapercibido en el estudio de este tipo de patologías, y que debería ser una de las imprescindibles. De esta manera, es necesario aclarar cuál es el papel de la microglía (y cuáles son sus diferentes fenotipos) en la progresión de la EA, sin descartar ninguna variable, porque probablemente dependa de todo su ambiente.

Referencias bibliográficas

- Calsolaro, Valeria y Paul Edison. 2016. «Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions». *Alzheimer's & Dementia* 12: 719-732. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jalz.2016.02.010>
- Cherbuin, Nicolas, Erin I. Walsh, Liana Leach, Anne Brüstle, Richard Burns, Kaarin J. Anstey, Perminder S. Sachdev y Bernhard T. Baune. 2022. «Systemic inflammation predicts Alzheimer pathology in community samples without dementia». *Biomedicines* 10: 1240. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061240>
- Cho, Kwangmin y Gee Euhn Choi. 2017. «Microglia: Physiological functions revealed through morphological profiles». *Folia Biologica (Praha)* 63: 85-90. <https://fb.cuni.cz/file/5842/fb2017a0013.pdf>
- 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>
- Davalos, Dimitrios, Jaime Grutzendler, Guang Yang, Jiyun V. Kim, Yi Zuo, Steffen Jung, Dan R. Littman, Michael L. Dustin y Wen-Biao Gan. 2005. «ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo». *Nature Neuroscience* 8(6): 752-758. <https://doi.org/10.1038/nn1472>
- De Castro Salazar, Ernestina. 2021. «La funcionalidad de la amígdala en diferentes estados temporales durante el proceso de la patología asociada a la Enfermedad de Alzheimer». *Tesis Doctoral Inédita*. Universidad de Valencia. Valencia. <https://roderic.uv.es/bitstream/handle/10550/82530/Tesis%20Castro%20Salazar%20Ernestina%20del%20Carmen.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ghosh, Powsali, Ravi Singh, Ankit Ganeshpurkar, Ankit Vyankatrao Pokle, Ravi Bhushan Singh, Sushil Kumar Singh y Ashok Kumar. 2021. «Cellular and molecular influencers of neuroinflammation in AD: Recent concepts and roles». *Neurochemistry International* 151: 105212. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105212>
- Ginhoux, Florent, Shawn Lim, Guillaume Hoeffel, Donovan Low y Tara Huber. 2013. «Origin and differentiation of microglia». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 7: 45. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00045>

- 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: 577185. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2020.577185>
- Hayes, Angela, Urvashi Thaker, Takeshi Iwatsubo, Stuart Pickering-Brown y David M. A. Mann. 2002. «Pathological relationships between microglial cell activity and tau and amyloid b protein in patients with Alzheimer's disease». *Neuroscience Letters* 331: 171-174. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(02\)00888-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)00888-1)
- 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>
- Hopp, Sarah C., Yang Lin, Derek Oakley, Allyson D. Roe, Sarah L. DeVos, David Hanlon y Bradley T. Hyman. 2018. «The role of microglia in processing and spreading of bioactive tau seeds in Alzheimer's disease». *J. Neuroinflammation* 15: 269. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1309-z>.
- Lara-Ureña, Nieves. 2020. «Papel de HIF1 y PHD3 en la microglía de la enfermedad de Alzheimer». *Tesis Doctoral Inédita*. Universidad de Sevilla, Sevilla. <https://idus.us.es/handle/11441/100986>
- Leng, Fangda y Paul Edison. 2021. «Neuroinflammation and microglia activation in Alzheimer disease: where do we go from here?» *Nature Reviews Neurology* 17: 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>
- Maphis, Nicole, Guixiang Xu, Olga N. Kokiko-Cochran, Shanya Jiang, Astrid Cardona, Richard M. Ransohoff, Bruce T. Lamb y Kiran Bhaskar. 2015. «Reactive microglia drive tau pathology and contribute to the spreading of pathological tau in the brain». *Brain* 138: 1738-1755. <https://doi.org/10.1093/brain/awv081>
- Martínez, Fernando y Siamon Gordon. 2014. «The M1/M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment». *F1000Prime Reports* 6:13. <https://doi.org/10.12703/P6-13>
- 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)
- Okuyama Teruhiro. 2018. «Social memory engram in the hippocampus». *Neuroscience Research* 129: 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.05.007>
- Romero-Molina, Carmen, Victoria Navarro, Raquel Sánchez-Varo, Sebastián Jiménez, Juan J. Fernández-Valenzuela, María V. Sánchez-Mico, Clara Muñoz-Castro, Antonia Gutiérrez, Javier Vitorica y Marisa Vizuete. 2018. «Distinct microglial responses in two transgenic murine models of tau pathology». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12: 421. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00421>

- Sánchez-Mejías, Elisabeth, Victoria Navarro, Sebastián Jiménez, María Sánchez-Mico, Raquel Sánchez-Varo, Cristina Núñez-Díaz, Laura Trujillo-Estrada, José Carlos Davila, Marisa Vizúete, Antonia Gutiérrez y Javier Vitorica. 2016. «Soluble phospho-tau from Alzheimer's disease hippocampus drives microglial degeneration». *Acta Neuropathologica* 132: 897-916. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1630-5>
- Serrano-Pozo, Alberto, Rebecca A. Betensky, Matthew P. Frosch y Bradley T. Hyman. 2016. «Plaque-associated local toxicity increases over the clinical course of Alzheimer Disease». *The American Journal of Pathology* 186 (2): 375-384. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.10.010>
- Shao, Wen, Dantao Peng y Xiaomin Wang. 2017. «Genetics of Alzheimer's disease: From pathogenesis to clinical usage». *Journal of Clinic Neuroscience* 45: 1-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jocn.2017.06.074>
- 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
- Webers, Alessandra, Heneka, Michael T. Heneka y Paul A. Gleeson. 2020. «The role of innate immune responses and neuroinflammation in amyloid accumulation and progression of Alzheimer's disease». *Immunology & Cell Biology* 98 (1): 28-41. <https://doi.org/10.1111/imcb.12301>
- Yoshiyama, Yasumasa, Makoto Higuchi, Bin Zhang, Shu-Ming Huang, Nobuhisa Iwata, Takaomi C. Saido, Jun Maeda, Tetsuya Suhara, John Q. Trojanowski y Virginia M-Y. Lee. 2007. «Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S Tauopathy mouse model». *Neuron*, 53 (3): 337-351. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.01.010>
- 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>
- Zhu, Keying, Melanie Pieber, Jinming Han, Klas Blomgren, Xing-Mei Zhang, Robert A. Harris y Harald Lund. 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. <https://doi.org/10.1002/glia.23794>