

Caracterización morfológica de la astrogliosis reactiva en el núcleo dorsal del rafe de un modelo 3XTG-AD

ERIC RIVERO ZARAGOZA
al377069@uji.es

FRANCISCO ROS BERNAL
fros@uji.es

Resumen

Los astrocitos se encargan del funcionamiento óptimo del cerebro y su homeostasis, movilizándose de forma «reactiva» ante lesiones o enfermedades del sistema nervioso central. De esta manera, la astrogliosis reactiva (AR) se ubicaría en el centro de la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer, además de ser un evento temprano en la progresión de esta, precediendo a otras características neuropatológicas de la enfermedad. No obstante, metaanálisis recientes niegan la existencia de un astrocito reactivo prototípico, refiriéndose al mismo como altamente variable. El presente trabajo pretende caracterizar morfológicamente, en un modelo murino de EA, la AR en el núcleo dorsal del rafe, considerada por muchos investigadores como la patología citoesquelética más temprana con relación en la EA. Se utilizaron un total de 12 ratones hembra divididos en dos grupos: a) 3XTG-AD con mutaciones en genes humanos PS1M146V, APPSWE y TAUP301L y, b) animales de tipo salvaje (WT: c57BL6/129s) emparejados por edad. Para el análisis de la morfología reactiva de la astroglía se utilizó el programa ImageJ. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la dimensión fractal, lagunaridad, forma y circularidad. Los resultados sugieren que independientemente del grupo, el avance en la edad se relaciona con el aumento de la complejidad, homogeneidad de lagunas, una forma más compacta y mayor circularidad de la astroglía. No obstante, la circularidad también parece mostrar diferencias en la interacción entre edad y grupos, siendo el 3XTG-AD más circular, hecho que se correlaciona con lo observado en estudios anteriores en microglía.

Palabras clave: Enfermedad de Alzheimer, núcleo dorsal del rafe, morfología astroglial y 3XTG-AD.

Abstract

Astrocytes are responsible for the optimal functioning of the brain and its homeostasis, becoming «reactive» to lesions or diseases of the central nervous

system. Thus, reactive astrogliosis (RA) would be at the center of the pathophysiology of Alzheimer's disease, in addition to being an early event in its progression, preceding other neuropathological features of the disease. However, recent meta-analyses refuse the existence of a prototypical reactive astrocyte, referring to it as highly variable. The present work aims to characterize morphologically, in a murine model of AD, RA in the dorsal raphe nucleus considered by many researchers as the earliest cytoskeletal pathology with a bearing on AD. A total of 12 female mice divided into two groups were used: a) 3XTGAD with mutations in human PS1M146V, APPSWE and TAUP301L genes and, b) age-matched wild-type (WT: C57BL6/129S) animals. ImageJ software was used for astroglial reactive morphology analysis. Statistically significant differences were found in fractal dimension, lacunarity, shape and circularity. The results suggest that regardless of group, advancing age is related to increased complexity, homogeneity of lacunae, more compact shape, and greater circularity of astroglia. However, circularity also appears to show differences in the interaction between age and groups, with 3XTGAD being more circular; a fact that correlates with what has been observed in previous studies in microglia.

Key Words: Alzheimer's disease, dorsal raphe nucleus, astroglial morphology and 3XTGAD.

Introducción

El cerebro de los mamíferos está compuesto principalmente por dos tipos de células: las neuronas y las células gliales. Y aunque las neuronas han sido siempre consideradas las células estrella, las células gliales, consideradas solo como el «pegamento» arquitectónico en el cerebro, están recobrando importancia en las últimas décadas. Entre otras funciones, una básica es su participación en la homeostasis cerebral, papel que ejercen los tres tipos principales de células gliales: astrogliá, microglía y oligodendroglía (Escartin et al. 2021). De entre estos tipos, en los estudios de la última década relacionados con las enfermedades neurodegenerativas, ha cobrado especial relevancia el papel de la astrogliá, que representa el 20-40% de la población glial. Los astrocitos, del latín «astro» estrella y «cito» célula, se encargan del funcionamiento óptimo del cerebro y su homeostasis, convirtiéndose en «reactiva» ante lesiones o enfermedades del sistema nervioso central (SNC), como la enfermedad de Alzheimer (EA) y otros trastornos neurodegenerativos (Kumar et al. 2021). Estudios recientes, ubican a la astrogliosis reactiva en el centro de la fisiopatología de la EA, además de tener pruebas sólidas que la colocan como biomarcador temprano en la progresión de la EA, precediendo a otras características neuropatológicas (biomarcadores) de la enfermedad como las placas amiloides (β A) y ovillos neurofibrilares (τ) (Carter et al. 2019; Kumar et al. 2021).

Estudios de neuroimagen han evidenciado la existencia de dos «oleadas» de astrogliosis reactiva que se relacionan con otros biomarcadores en diferentes etapas de

la enfermedad. En las etapas finales, los astrocitos reactivos se encuentran asociados o en proximidad a las placas amiloides y ovillos neuropatológicos de tau en cerebros postmortem de pacientes con EA (Kumar et al. 2021).

En condiciones no patológicas los astrocitos actúan como neuroprotectores, generando antioxidantes que combaten el estrés oxidativo provocado por moléculas proinflamatorias como el peróxido de hidrógeno, evitando la neuroinflamación (Desagher et al. 1996; Chun and Lee 2018). No obstante, en situaciones patológicas los astrocitos sufren una serie de alteraciones morfológicas y funcionales, transformándose así en astrocitos reactivos los cuales sobre expresan la proteína ácida glial (GFAP), vimentina y re expresan nestina, proteínas que forman el citoesqueleto astrocítico (Carter et al. 2019). Además, los astrocitos reactivos ejercen efectos bifásicos que dependen del nivel de producción de «especies reactivas del oxígeno» (ROS en inglés), el cual, se correlaciona con la cantidad de toxinas beta amiloides (Chun & Lee 2018). Dependiendo de este, desempeñan desde funciones neuroprotectoras como la liberación de factores tróficos (Wang et al. 2006), limpieza de placas β A y la actuación de sistemas antioxidantes (Desagher et al. 1996) hasta funciones de neurotoxicidad, como la liberación de GABA (Jo et al. 2014), especies reactivas del nitrógeno (RNS) (Bagheri et al. 2017) y estrés oxidativo (Allaman et al. 2010).

Aunque el aumento en la inmunorreactividad de GFAP, como parte del citoesqueleto, refleja en gran medida los cambios morfológicos de la AR, la hipertrofia astrogliar no equivale necesariamente a una reorganización del citoesqueleto. Por ello, es necesario un análisis más detallado de la caracterización astrogliar, ya que en contextos patológicos los astrocitos experimentan diversos cambios morfológicos e hipertróficos como la elongación, extensión de sus procesos hacia el sitio de la lesión y cierta superposición de dominios tridimensionales (3D) (Escartin et al. 2021). En resumen, el aumento de la GFAP y la hipertrofia son marcadores útiles pero insuficientes de la reactividad de los astrocitos que deben ser complementados por marcadores adicionales. Y esto, es una limitación que debemos tener en cuenta. Por último, el metaanálisis de Escartin y colaboradores (2021) propone una serie de «consensos básicos» entre los que hay que destacar que: no existe un astrocito reactivo prototípico, ni astrocitos reactivos que se polarizan en fenotipos binarios simples como bueno o malo, neurotóxico o neuroprotector; más bien, los astrocitos pueden adoptar múltiples estados dependiendo del contexto y la pérdida de algunas funciones homeostáticas y ganancia de algunas funciones perjudiciales o protectoras pueden ocurrir simultáneamente, por lo que su impacto holístico sobre la enfermedad vendrá determinado por el equilibrio de las funciones perdidas y ganadas, y por tanto, de las diferentes subpoblaciones de AR.

Actualmente, el modelo de ratón triple transgénico característico de la EA (3XTG-AD), que alberga los genes humanos APPSWE, PS1M146V y TAUP301L, es el único modelo que presenta tanto la patología β A, depósitos de como la τ y como las placas extraneuronales en función de la edad, característica de la forma humana (Sterniczuk et al. 2010). Todas estas características lo hacen idóneo para la investigación de la EA. Existen evidencias que apuntan a que los astrocitos reactivos de ratonas 3XTG-AD sufren disminuciones en cuanto a volumen y superficie, que revierten (como así su arborización) con el ejercicio físico y ambiente enriquecido (Rodríguez et al. 2009, 2013). Sin embargo, no podemos estar seguros de que sea siempre así. Los marcadores utilizados y la heterogeneidad espontánea de los astrocitos reactivos anteriormente mencionados dificultan

mucho la elaboración de un marco morfológico. Por tanto, descubrir cuáles son los cambios morfológicos que subyacen al proceso de transformación de una astrogliosis «sana» a una reactiva en relación con sus funciones neuroprotectoras o neurotóxicas, nos dará mucha información sobre su mecanismo de respuesta y, por tanto, facilitará la búsqueda de nuevos tratamientos terapéuticos para la EA.

El presente trabajo es novedoso por dos aspectos: primeramente, por su intención de encontrar y clasificar en un marco las características morfológicas «típicas» (si las hay) de la AR y segundo, por ir en contra de lo que denominamos «dogma hipocampal» en la EA. Se entiende por dogma hipocampal la creencia de que el hipocampo (o áreas muy próximas como la corteza entorrinal, perirrinal y parahipocampal) es el responsable de sufrir las primeras alteraciones neuropatológicas en la EA. Tanto es así, que incluso sistemas de taxonomía neurofibrilar para la EA, como el sistema de Braak y Braak, la clasifica en seis estadios que se extienden desde la desde la región transentorrinal (estadio I) hasta la formación hipocampal (estadio II), el neocórtex temporal, frontal y parietal (estadios III y IV) y, finalmente, hasta las áreas sensoriales y motoras primarias del neocórtex (estadios V y VI) (Braak & Braak 1991; Simic et al. 2009).

Para el presente estudio, colocamos el punto de mira en el núcleo dorsal de rafe (NDR). Y es que muchos investigadores han evidenciado la relación entre la patología de la EA y la pérdida celular en los núcleos del tronco del rafe (además de los del núcleo basal de Meynert y la corteza entorrinal) durante el curso temprano de la enfermedad (Curcio & Kemper 1984). Incluso el grupo de Braak confirmó posteriormente cambios citoesqueléticos muy tempranos en el NDR relacionados con el EA, en al menos 27 casos, ya en el estadio I, mucho antes de las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Rüb et al. 2000). Tanto es así, que algunos estudios la han considerado la patología citoesquelética más temprana con relación en la EA. Además, las proyecciones de aminas biogénicas del tronco cerebral afectan a varias funciones y estados cerebrales (memoria, sueño-vigilia, etc.), y su pérdida temprana puede explicar el desarrollo de síntomas psicológicos y conductuales de la demencia, que se producen meses o incluso años antes del deterioro cognitivo (Simic et al. 2017). De esta forma, se podría utilizar la volumetría del tronco cerebral como medida predictiva ante una futura demencia (Dutt et al. 2020).

Por tanto, el objetivo de este trabajo es la búsqueda de la astrogliosis reactiva en el NDR y el análisis de su morfología reactiva en un modelo animal de EA (3XTG-AD) y su posterior caracterización, lo que implicaría nuevos métodos de detección, diagnóstico y tratamiento.

Métodos

Limitaciones

El número de sujetos es evidentemente insuficiente como para poder sacar conclusiones. No obstante, este es un estudio «piloto» que resalta las tendencias que se encuentran, para en un futuro estudio, refinar más los métodos utilizados y evitar posibles errores o problemas que se encuentren. Por ende, en base a el Real Decreto

53/2013 y las 3_R utilizamos cerebros de ratones hembra que teníamos ya cortados y así reducir el número de animales utilizados.

Animales

En este estudio se utilizaron un total de 12 ratones hembra divididos en dos grupos: a) 3_{XTG-AD} con mutaciones en genes humanos PS1^{M146V}, APP^{SWE} y TAUP^{301L} y, b) animales de tipo salvaje (WT) emparejados por edad (WT: C57BL6/129S). Ambos grupos de ratonas se criaron en el Servicio Experimental de Animales (SEA) (Universitat Jaume I, Castelló), autorizado por la Consejería de Agricultura, Pesca y Alimentación de la Generalitat Valenciana (ES120400001002) para garantizar en todo momento el bienestar animal bajo el cumplimiento del RD 53/2013, 1 de febrero, por el cual se regulan las normas básicas aplicables para la protección de animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Durante la estancia en el SEA, los animales tuvieron acceso a agua y comida ad libitum, con un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas y una temperatura de 23 ± 1°C a 60% de humedad relativa. Posteriormente, tanto los WT como los 3_{XTG-AD} se sacrificaron a edades comprendidas entre 9, 12 y 15 meses (n = 2 animales por edad y tipo). Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética Animal de la Universitat Jaume I de Castellón (España) con número de aprobación 2015 / VSC / PEA/00213.

Fijación y seccionamiento del cerebro

Los animales fueron anestesiados mediante la administración intraperitoneal de pentobarbital sódico (Dolethal, 200 mg/kg i.p.; Vetoquinol S.A., Madrid, España). Posteriormente, y para la extracción del cerebro, se perfundieron transcardialmente con una solución salina al 0,9% (50ml). Una vez eliminada la sangre del aparato circulatorio se fijaron mediante paraformaldehído (PFA 4% en buffer fosfato (PB) 0,1 M, pH=7,4) durante 12 minutos (60ml). Una vez fijados, se extrajeron rápidamente y se introdujeron en solución fresca de PFA durante un máximo de 24 horas.

Posteriormente, se almacenaron con una solución del 30% de sacarosa que se disolvió en PB 0,1 M a -20°C durante un mínimo de 3 días. Una vez transcurrido este tiempo, los cerebros se cortaron con la ayuda del microtomo deslizante Leica SM2010R (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemania) para obtener secciones coronales (6 series de cada cerebro) de 40 µm de grosor que se conservaron en diferentes microtubos de polipropileno (Eppendorfs) con solución crioprotectora a -20°C hasta el día en que se realizó la inmunohistoquímica.

Inmunohistoquímica

Para el proceso de inmunohistoquímica, se seleccionaron los cortes a nivel del NDR y se inició el protocolo: El primer día se lavaron tres veces con PBS 0,1M a 10 minutos cada uno, posteriormente, se bloquearon durante 1 hora con un 10% de suero

«Non-sterile goat serum» (NGS) y PBS 0,1M + 0'3% de tritón y finalmente, se incubaron (overnight) con el anticuerpo primario «Guinea pig anti-GFAP» a concentración 1:500 con un 5% de NGS y PBS 0,1M + 0,3% de tritón; el segundo día, se volvieron a lavar 3 veces con PBS 0,1M a 10 minutos cada uno, se incubó durante 2 horas con el anticuerpo secundario con el fluorocromo Alexa 647 «goat antiguinea pig» a concentración 1:200 con un 5% de NGS y PBS 0,1M + 0'3% de tritón y se lavaron 2 veces con PBS 0,1M a 10 minutos cada uno y finalmente un lavado de 10 minutos con PB 0,1M. Por último, se montan los cortes sobre portaobjetos gelatinizados y se cubrieron con Mowiol®.

Una vez montados, realizamos fotomicrografías en el microscopio confocal invertido (Leica TCS SP8) con objetivo de inmersión 40x para el posterior análisis de la astrología. El número total de astrocitos requerido se redujo a 6 células por animal. Para el análisis de la morfología reactiva de la astrología se utilizó el programa ImageJ mediante el cual obtuvimos los datos relativos a, la dimensión fractal (DF), lagunaridad (L), densidad (D), forma (F), área (A), perímetro (P) y circularidad (C). Brevemente, el procedimiento fue el siguiente (para obtener información más detallada del procedimiento le dirigimos al artículo de Young y Morrison (2018)):

I) Image → Lookup Tables → Greys, II) Image → Adjust → Brightness/Contrast, III) Process → Filters → Unsharp Mask, IV) Image → Adjust → Threshold (ver Figura 1a), V) Process → Noise → Despeckle (ver Figura 1c), VI) Process → Binary → Close, VII) Process → Binary → Outline (ver Figura 1d), VIII) Pluggings → Frac Lac.

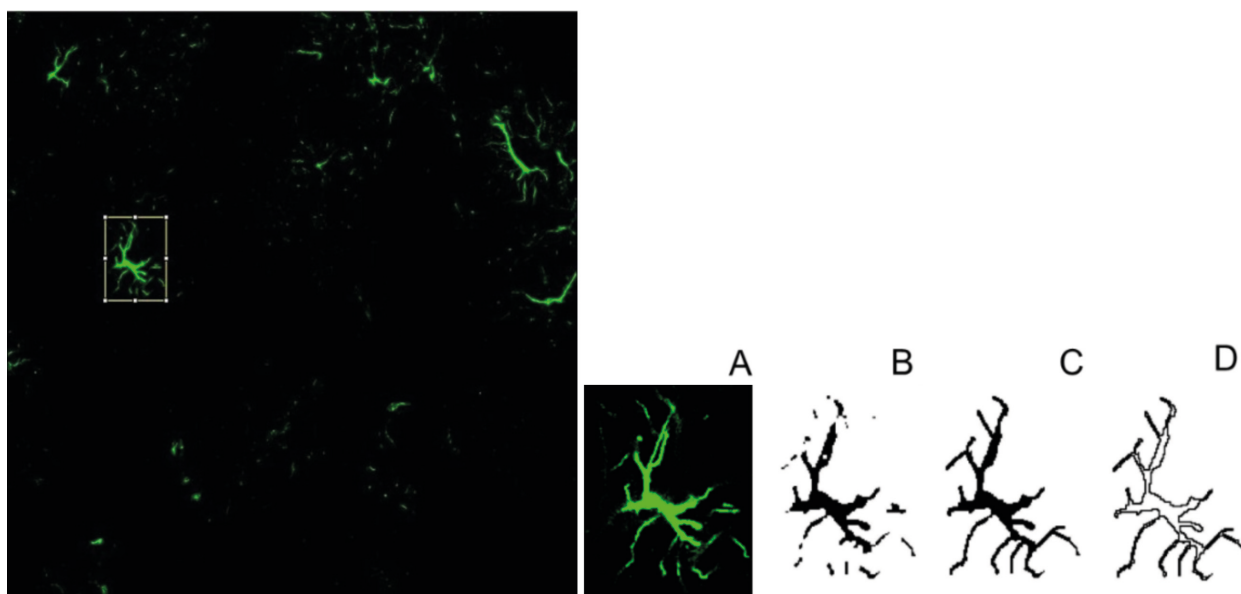


Figura 1

Imagen de astroglía marcada con Alexa 647 para GFAP y procesada mediante ImageJ. A) Astrocito marcado; B) Imagen procesada; C) Imagen corregida; D) Imagen final para el procesado.

Resultados

Los datos de morfología astrogliosa se transcribieron al programa Excel. Se obtuvieron medias de las 6 células de ambos animales por grupo y edad. Posteriormente, los análisis se realizaron en el programa GraphPad Prism 9. Se ejecutaron pruebas no paramétricas, Kruskal-Wallis para 3 o más grupos (edad) con la prueba post-hoc de Dunn's y la *u* de Mann-Whitney para 2 grupos (grupo). Con este examen se pueden obtener medidas de diferencia entre grupos para la variable edad, grupo y la interacción entre tiempo y grupo:

Edad:

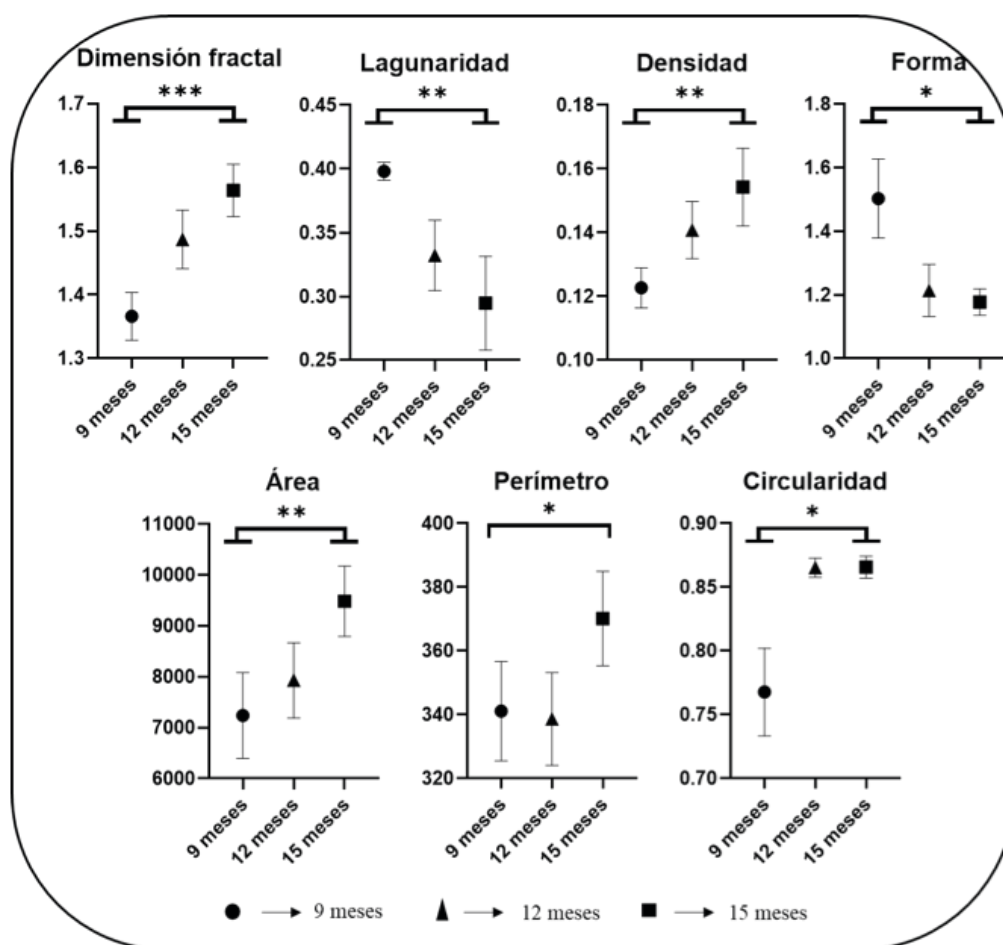


Figura 2

Representación gráfica de las variables morfológicas estadísticamente significativas en relación con la edad.

Respecto a la edad, se observan diferencias progresivas de los 9 a los 15 meses. Aumenta la dimensión fractal, la densidad, el área, el perímetro, la circularidad y disminuye la lagunaridad y forma. Todas las variables presentaron diferencias estadísticamente significativas en la prueba de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$), en particular de los 9

a 15 meses (excepto para la variable *perímetro*), visto mediante la prueba post-hoc de Dunn's ($p < 0,05$) y comprobado mediante la u de Mann-Whitney.

Tabla 1

Medias \pm SEM. DF= Dimensión Fractal; L= Lagunaridad; D= Densidad; F= Forma; A= Área; P= Perímetro; C= Circularidad

Edad	DF	L	D	F	A	P	C
9m Total	1,37	0,40	0,12	1,50	7237,71	341,11	0,78
12m Total	1,49	0,33	0,14	1,21	7929,28	338,65	0,87
15m Total	1,56	0,29	0,15	1,18	9485,63	370,18	0,87

Grupo:

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Edad y grupo:

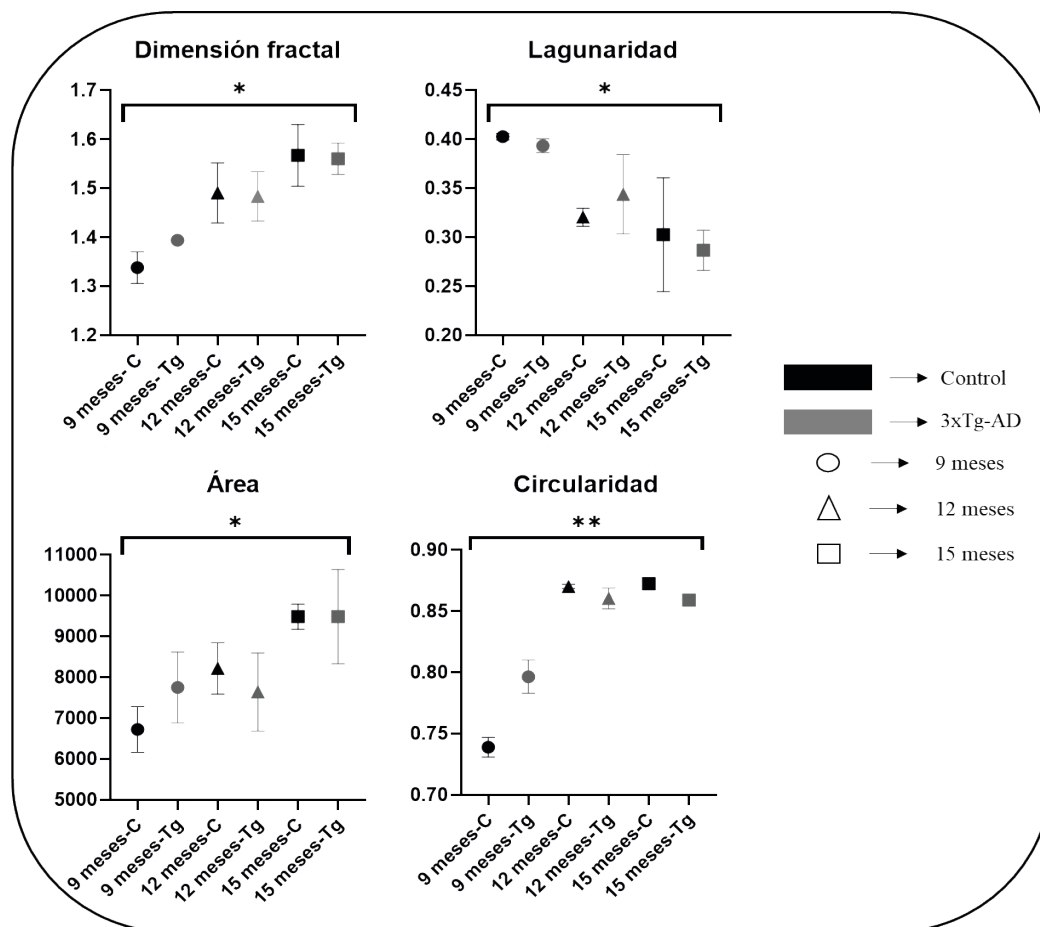


Figura 3

Representación gráfica de las variables morfológicas estadísticamente significativas en la interacción edad y grupo. Las líneas y asteriscos representan las diferencias entre todos los grupos (prueba Kruskal-Wallis)

En cuanto a la interacción entre edad y grupo, es decir, las diferencias entre grupos en función del grupo al que pertenecen y al grupo de edad al que corresponden, las diferencias no siguen un patrón continuo (aumentan o disminuyen gradualmente) sino alterno. No obstante, se encuentran diferencias estadísticamente significativas en la prueba de Kruska-Wallis ($p < 0,05$) para la dimensión fractal, lagunaridad, área y circularidad. En la prueba post-hoc de Dunn's (múltiples comparaciones) no se observaron diferencias entre pares concretos.

Tabla 2

Medias \pm SEM. DF= Dimensión Fractal; L= Lagunaridad; D= Densidad; F= Forma; A= Área; P= Perímetro; C= Circularidad

Edad y grupos	DF	L	D	F	A	P	C
9m Control	1,34	0,40	0,13	1,61	6723,00	337,31	0,74
9m 3xTg-AD	1,39	0,39	0,12	1,40	7752,42	344,91	0,80
12m Control	1,49	0,32	0,14	1,18	8218,25	344,25	0,87
12m 3xTg-AD	1,48	0,34	0,14	1,25	7640,32	333,05	0,86
15m Control	1,57	0,30	0,16	1,17	9486,08	368,91	0,87
15m 3xTg-Ad	1,56	0,29	0,15	1,19	9485,17	371,46	0,86

Estadísticos:

Tabla 3

Medidas de diferencia entre los grupos para la variable edad (9m, 12m y 15m), grupo (Control y 3xTg-AD) y la interacción entre tiempo y grupo (9m Control, 9m 3xTg-AD, 12m Control, 12m 3xTg-AD, 15m Control y 15m 3xTg-AD). Se realizaron pruebas de Kruskal-Wallis para variable «Edad» y «Tiempo x Grupo» y U de Mann-Whitney para la variable «Grupo» (# $\rightarrow p > 0,05$); (* $\rightarrow p < 0,05$); (** $\rightarrow p < 0,001$)

VARIABLES DE MORFOLOGÍA	Edad	Grupo	Tiempo x Grupo
Dimensión Fractal	$p=0,0005^{***}$	#	$p=0,0143^*$
Lagunaridad	$p=0,0024^{**}$	#	$p=0,0405^*$
Densidad	$p=0,0031$	#	#
Forma	$p=0,0107^*$	#	#
Área	$p=0,0066^{**}$	#	$p=0,0327^*$
Perímetro	$p=0,0263^*$	#	#
Circularidad	$p=0,0132^*$	#	$p=0,0032^{**}$

Discusión

Los resultados sugieren que, independientemente del grupo, el avance en la edad se relaciona con el aumento de la complejidad (patrones celulares complejos), homogeneidad de lagunas, una forma más compacta y mayor circularidad de la astrogliá. Este fenómeno concuerda con estudios recientes que apoyan un papel integral de los astrocitos en el inicio y la progresión de las enfermedades neurodegenerativas y el deterioro cognitivo con el envejecimiento (Cohen and Torres 2019). La sequía celular, uno de los mecanismos del envejecimiento, se ha propuesto como un componente central de la dependencia de la edad de los trastornos neurodegenerativos, por lo que observar la senescencia de la astrogliá podría servir como un nuevo enfoque hacia las terapias para las enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad (Cohen and Torres 2019).

Respecto la interacción entre grupo y edad, se observan diferencias estadísticamente significativas entre controles y 3XTGAD dependientes de la edad, con valores que van aumentando progresivamente en complejidad (dimensión fractal), área y circularidad, (este parámetro va de 0 (polígono lineal) a 1 (círculo perfecto)); al contrario que la lagunaridad, que va disminuyendo, indicando un mayor grado de homogeneidad en las lagunas o «huecos» del soma. La circularidad correlaciona con lo observado en estudios anteriores en microglía (Lucerón Morales 2021). Este hecho nos hace pensar que la circularidad es la variable morfológica que más cambia en estados reactivos, en al menos, dos de las tres principales células gliales.

No obstante, estos datos son meramente informativos sobre tendencias observadas en un número de sujetos muy bajos. En futuros estudios y con mayor número de sujetos, se propone caracterizar un posible prototipo de astrogliá reactiva, hasta el momento, desconocido.

Referencias bibliográficas

- Allaman, Igor, Mathilde Gavillet, Mireille Bélanger, Thierry Laroche, David Viertl, Hilal A Lashuel y Pierre J Magistretti. 2010. «Amyloid- β aggregates cause alterations of astrocytic metabolic phenotype: impact on neuronal viability». *Journal of Neuroscience* 30(9): 3326-3338.
- Bagheri, Meisam, Raji R. Nair, Krishna kumar Singh y Deepak Saini. 2017. «ATM-ROS-INOX axis regulates nitric oxide mediated cellular senescence». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1864(1): 177-190.
- Braak, Heiko y Eva Braak. 1991. «Neuropathological staging of Alzheimer-related changes». *Acta neuropathologica* 82(4): 239-259.
- Carter F, Stephen, Karl Herholz, Pedro Rosa-Neto, Luc Pellerin, Agneta Nordberg y Eduardo R Zimmer. 2019. «Astrocyte biomarkers in Alzheimer's disease». *Trends in molecular medicine* 25(2): 77-95.
- Chun, Heejung & C. Justin Lee. 2018. «Reactive astrocytes in Alzheimer's disease: A double-edged sword». *Neuroscience research* 126: 44-52.
- Cohen, J., & C. Torres. 2019. «Astrocyte senescence: evidence and significance». *Aging cell* 18(3): e12937.

- Curcio, C.A. y T. Kemper. 1984. «Nucleus raphe dorsalis in dementia of the Alzheimer type: neurofibrillary changes and neuronal packing density.» *J Neuropathol Exp Neurol* 43: 359-68.
- Desagher, Solange, Jacques Glowinski y Joël Premont. 1996. «Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity.» *Journal of Neuroscience* 16(8): 2553-2562.
- Dutt, Shubir, Yanrong Li, Mara Mather, Daniel Nation y Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. 2020. «Brainstem volumetric integrity in preclinical and prodromal Alzheimer's disease.» *Journal of Alzheimer's Disease* 77(4): 1579-1594.
- Escartin, Carla, Elena Galea, András Lakatos, James P. O'Callaghan, Gabor C. Petzold, Alberto Serrano-Pozo ... & Alexei Verkhratsky. 2021. «Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions.» *Nature neuroscience* 24(3): 312-325.
- Ivica Kostovic y Patrick Hof. 2009. «Does Alzheimer's disease begin in the brainstem?» *Neuropathology and applied neurobiology* 35(6): 532-554.
- Jo, Seonmi, Oleg Yarishkin, Yu Jin Hwang, Ye Eun Chun, Mijeong Park, Dong Ho Woo... y C Justin Lee. 2014. «GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease.» *Nature medicine* 20(8): 886-896.
- Kumar, Amit, Igor C. Fontana y Agneta Nordberg. 2021. «Reactive astrogliosis: A friend or foe in the pathogenesis of Alzheimer's disease.» *Journal of neurochemistry*.
- Lucerón Morales, Jorge. 2021. «Characterization of microglial response in the female 3XTG^{AD} Model».
- Rüb Udo, Kelly Del Tredici, Christian Schultz, Dietmar Thal, Eva Braak y Heiko Braak. 2000. «The evolution of Alzheimer's disease-related cytoskeletal pathology in the human raphe nuclei.» *NeuropatholAppl Neurobiol* 26: 553-6.
- Simic, Goran, Gabrijela Stanic, Mihovil Mladinov, Natasa Jovanov-Milosevic, Ivica Kostovic, Patric. R. Hof. 2009. «Does Alzheimer's disease begin in the brainstem?» *Neuropath. Appl Neurobiol* 35, 532-554.
- Simic, Goran, Mirjana Babic Leko, Selina Wray, Charles R. Harrington, Ivana Delalle, Nataša Jovanov-Milosevic, Danira Bazadona, Luc Buee, Rohan de Silva, Giuseppe Di Giovanni et al. 2017. «Monoaminergic neuropathology in Alzheimer's disease.» *Prog. Neurobiol* 151: 101-138.
- Sterniczuk, Roxanne, Michael C. Antle, Frank M. LaFerla y Richard H. Dyck. 2010. «Characterization of the 3XTG-AD mouse model of Alzheimer's disease: part 2. Behavioral and cognitive changes.» *Brain research* 1348: 149-155.
- Wang, Hong, Guoxiang Yuan, Nanduri R. Prabhakar, Mark Boswell y David M. Katz. 2006. «Secretion of brain-derived neurotrophic factor from PC12 cells in response to oxidative stress requires autocrine dopamine signaling.» *Journal of neurochemistry* 96(3): 694-705.
- Young, Kimberly y Helena Morrison. 2018. «Quantifying microglia morphology from photomicrographs of immunohistochemistry prepared tissue using ImageJ.» *JOVE (Journal of Visualized Experiments)* 136: e57648.