



# VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología  
Departamento de Fisiología  
Programa de Doctorado en Fisiología

## MECANISMOS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES DE LA NEURODEGENERACIÓN EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Tesis Doctoral: Ignacio Campo Palacio

*Dirigida por:*  
*Dra. Soraya Vallés Martí*  
*Dr. Adrián Jordá Vallés*

**MARZO DE 2023**



**Tesis Doctoral**

**MECANISMOS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES  
DE LA NEURODEGENERACIÓN EN LA  
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

**IGNACIO CAMPO PALACIO**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**

**FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA**

*Directores*

*Dra. Soraya Vallés Marti*

*Dr. Adrián Jordá Vallés*





UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA**

**Dra. Soraya Vallés Martí**, Profesora del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia y **Dr. Adrián Jordá Vallés**, Profesor del Departamento de Enfermería de la Facultad de Enfermería y Podología de la Universidad de Valencia.

**CERTIFICAN:**

Que **D. Ignacio Campo Palacio**, con DNI: **16628669 Z**, ha realizado bajo nuestra dirección la presente **TESIS DOCTORAL**, titulada:

**“MECANISMOS BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES DE LA NEURODEGENERACIÓN EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER”**

Para la obtención del título de Doctor y para que conste a los efectos oportunos, firmamos la presente certificación.

Valencia, 17 de mayo de 2023

LILIAN  
SORAYA |  
VALLES | MARTI  
Firmado digitalmente  
por LILIAN SORAYA |  
VALLES | MARTI  
Fecha: 2023.04.10  
23:14:20 +02'00'

Dra. Soraya Vallés Martí

N.I.F. 43008486 G

ADRIAN |  
JORDA |  
VALLES  
Firmado digitalmente  
por ADRIAN | JORDA |  
VALLES  
Fecha: 2023.04.10  
23:14:42 +02'00'

Dr. Adrián Jordá Vallés

N.I.F. 686789698 D





CONSEJO DE ADMINISTRACIÓN, SECTOR ANIMAL  
CARRER JUBIANGUÉS Y DOUTAZZANO 10001  
DIRECCIÓN GENERAL DE AGRICULTURA,  
GANADERÍA Y PESCA



Unión Europea

**AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2016/VSC/PEA/00220**

Vista la solicitud realizada en fecha 21/11/16 con nº reg. entrada 29748 por D/Dª Pilar Campins Falcó, Vicerrectora de Investigación i Política Científica, centro usuario ES462500001003, para realizar el procedimiento:

**"Mecanismos de acción de diferentes fármacos en células neurales en cultivo primario (sugamadex, rocuronio, ranolazina) y otras sustancias (cannabis, alcohol, coñas, etc.)"**

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Producción y Sanidad Animal.

**AUTORIZO:**

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: 2016/VSC/PEA/00220 tipo 2, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y período de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: Universitat de Valencia

Responsable del proyecto: Lilian Soraya Vallés Martí

Establecimiento: Animalario Facultad de Medicina y Odontología de Valencia

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, 14 de diciembre de 2016

El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca

Rogelio Llanes Ribas







## **AGRADECIMIENTOS**

*A mi padre por tanta comprensión y paciencia conmigo.*

*A mi madre por guiarme y acompañarme desde arriba.*

*A mi hermana por estar siempre para ayudarme.*

*A mis amigos por hacerlo todo más llevadero.*

*A mi grupo de investigación por darme la oportunidad*



## 1. INDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	INTRODUCCIÓN A LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	1
1.2	DEMENCIA Y ALZHEIMER .....	4
1.3	EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL .....	10
1.3.1	FUNCIONES CONGNITIVAS.....	14
1.3.2	CRONOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER .....	24
1.4	TIPOS DE CÉLULAS EN EL CEREBRO .....	24
1.4.1	NEURONAS.....	25
1.4.2	CÉLULAS GLIALES.....	43
1.5	LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA) .....	59
1.5.1	EL PÉPTIDO A $\beta$ Y SU SÍNTESIS.....	63
1.5.2	ACTIVIDAD DEL $\beta$ AMILOIDE .....	68
1.5.3	ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA $\beta$ AMILOIDE .....	69
1.5.4	ESTRATEGIAS CONTRA EL AMILOIDE .....	70
1.5.5	MEDICIÓN DE LA PROTEÍNA $\beta$ AMILOIDE .....	72
1.5.6	TEORIAS DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER .....	73
1.6	RITMOS CIRCADIANOS Y ALZHEIMER.....	79
1.7	MUERTE CELULAR .....	81
1.7.1	NECROSIS .....	81
1.7.2	APOPTOSIS .....	82
1.7.3	AUTOFAGIA .....	84
1.8	MUERTE CELULAR EN LA EA .....	85
1.9	NEURODEGENERACIÓN EN LA ENFERMEDAD .....	88
1.10	TRATAMIENTOS PARA LA EA .....	100
1.11	EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.....	103
1.11.1	EXPERIMENTACIÓN CON RATONES.....	105
1.11.2	RATONES KNOCK-OUT .....	105
1.11.3	RATONES TRANSGÉNICOS .....	108
1.12	CITOQUINAS Y QUIMIOCINAS .....	110
1.12.1	QUIMIOCINA CCL1 .....	118
1.12.2	RECEPTOR CCR8 .....	118
1.12.3	QUIMIOCINA CCL3 .....	119
1.12.4	QUIMIOCINA CCL4 .....	119
1.12.5	QUIMIOCINA CCL5 .....	120
1.12.6	RECEPTOR CCR5 .....	120
1.12.7	INTERLEUCINA IL-3.....	121

1.12.8	QUIMIOCINA CCL2 .....	121
1.12.9	QUIMIOCINA CCL7 .....	122
1.12.10	QUIMIOCINA CCL12 .....	122
1.12.11	RECEPTOR CCR2 .....	122
1.12.12	QUIMIOCINA CCL17 .....	123
1.12.13	QUIMIOCINA CCL22 .....	123
1.12.14	RECEPTOR CCR4 .....	124
1.12.15	QUIMIOCINA CXCL4 .....	124
1.12.16	RECEPTOR CCR1 .....	124
1.12.17	QUIMIOCINA CCL11 .....	125
1.12.18	RECEPTOR CCR3 .....	125
1.12.19	QUIMIOCINA CCL25 .....	126
1.12.20	RECEPTOR CCR9 .....	126
1.12.21	PROTEÍNA GFAP .....	127
1.12.22	PROTEÍNA MAP-2 .....	127
1.12.23	ABCF-1 .....	127
2.	HIPÓTESIS .....	133
3.	OBJETIVOS .....	137
4.	MATERIAL Y MÉTODOS .....	141
4.1	APARATOS .....	141
4.2	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN .....	142
4.3	ANÁLISIS DE COMPORTAMIENTO .....	144
4.4	TIEMPO EN RECORRER UNA BARRA ESTRECHA .....	144
4.4.1	NÚMERO DE FALLOS EN LA PATA .....	144
4.4.2	FUERZA DE AGARRE EN LOS RATONES .....	144
4.4.3	EXPLORACIÓN DE DOS OBJETOS IDÉNTICOS .....	145
4.4.4	RECONOCIMIENTO DE UN OBJETO .....	145
4.4.5	MEMORIA DE UBICACIÓN DE UN OBJETO .....	145
4.5	ANÁLISIS BIOQUÍMICOS .....	146
4.5.1	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE TEJIDO .....	146
4.5.2	MÉTODO DE LOWRY .....	147
4.5.3	WESTERN-BLOT .....	149
4.5.4	RT-PCR .....	154
4.5.5	SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA .....	155
5.	RESULTADOS .....	159
5.1	TIEMPO INVERTIDO EN RECORRER UNA BARRA .....	159
5.2	NÚMERO DE FALLOS EN LA PATA .....	160

5.3	FUERZA DE AGARRE DE LOS RATONES .....	161
5.4	EXPLORACIÓN DE DOS OBJETOS IDÉNTICOS.....	162
5.5	RECONOCIMIENTO DE UN OBJETO .....	163
5.6	MEMORIA DE UBICACIÓN DE UN OBJETO .....	164
5.7	ANÁLISIS FACTORES BIOQUÍMICOS .....	165
5.8	PROTEÍNA GFAP EN CÓRTEX CEREBRAL .....	165
5.9	PROTEÍNA MAP-2 EN CÓRTEX CEREBRAL.....	166
5.10	EXPRESIÓN DE CCL1 EN CORTEZA CEREBRAL .....	167
5.11	EXPRESIÓN DE CCR8 EN CORTEZA CEREBRAL .....	168
5.12	EXPRESIÓN DE CCL3 EN CORTEZA CEREBRAL .....	170
5.13	EXPRESIÓN DE CCL4 EN CORTEZA CEREBRAL .....	171
5.14	EXPRESIÓN DE CCL5 EN CORTEZA CEREBRAL .....	172
5.15	EXPRESIÓN DE CCR5 EN CORTEZA CEREBRAL .....	173
5.16	EXPRESIÓN DE IL-3 EN CORTEZA CEREBRAL .....	175
5.17	EXPRESIÓN DE ABCF1 EN CORTEZA CEREBRAL.....	176
5.18	EXPRESIÓN DE CCL2 EN CORTEZA CEREBRAL .....	177
5.19	EXPRESIÓN DE CCL7 EN CORTEZA CEREBRAL .....	178
5.20	EXPRESIÓN DE CCL12 EN CORTEZA CEREBRAL .....	179
5.21	EXPRESIÓN DE CCR2 EN CORTEZA CEREBRAL .....	180
5.22	EXPRESIÓN DE CCL17 EN CORTEZA CEREBRAL .....	182
5.23	EXPRESIÓN DE CCL22 EN CORTEZA CEREBRAL .....	183
5.24	EXPRESIÓN DE CCR4 EN CORTEZA CEREBRAL .....	184
5.25	EXPRESIÓN DE CXCL4 EN CORTEZA CEREBRAL.....	185
5.26	EXPRESIÓN DE CCR1 EN CORTEZA CEREBRAL .....	186
5.27	EXPRESIÓN DE CCL11 EN CORTEZA CEREBRAL .....	188
5.28	EXPRESIÓN DE CCR3 EN CORTEZA CEREBRAL .....	189
5.29	EXPRESIÓN DE CCL25 EN CORTEZA CEREBRAL .....	190
5.30	EXPRESIÓN DE CCR9 EN CORTEZA CEREBRAL .....	191
6.	DISCUSIÓN	195
7.	CONCLUSIONES	219
8.	BIBLIOGRAFÍA	225

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Prevalencia enfermedad de Alzheimer en las demencias.....	1
Figura 2: Estimación de la prevalencia de demencia en mayores de 60 años.....	2
Figura 3: Demencia Senil.....	9
Figura 4: Sistema Nervioso Central.....	12
Figura 5: Tipos de células neurales.....	13
Figura 6: Memoria y cerebro.....	16
Figura 7: Áreas cerebrales encargadas de las praxias.....	20
Figura 8: Área de Broca y de Wernicke y su interrelación.....	21
Figura 9: Gnosias.....	23
Figura 10: Partes de una neurona.....	27
Figura 11: Sustancia gris y sustancia blanca del SNC.....	29
Figura 12: Sinapsis neuronal.....	31
Figura 13: Neurotransmisores.....	33
Figura 14: Esquema del papel de la acetilcolina (Ach).....	35
Figura 15: Receptor nicotínico de la Ach.....	36
Figura 16: Cerebro y receptores muscarínicos.....	38
Figura 17: Neurogénesis.....	42
Figura 18: Proceso de Neurogénesis en el hipocampo.....	43
Figura 19: Astrocitos teñidos con GFAP (verde).....	44
Figura 20: Astrocito emitiendo prolongaciones hacia los vasos sanguíneos.....	45
Figura 21: Astrocito Fibroso y Protoplásmico.....	47
Figura 22: Astrocito de un cultivo celular (tinción GFAP).....	48
Figura 23: Astrocitos. Inmunofluorescencias GFAP (rojo)+ DAPI (azul, tinción de núcleos).....	51
Figura 24: Oligodendrocito.....	55
Figura 25: Respuesta de la microglía a diferentes moléculas liberadas por las neuronas.....	57
Figura 26: Citocinas e inflamación.....	58
Figura 27: Tipos de células gliales.....	59
Figura 28: Alzheimer y cerebro.....	60
Figura 29: Enfermedad de Alzheimer.....	61
Figura 30: Formación del péptido $\beta$ -amiloide.....	64
Figura 31: Procesamiento de la proteína APP.....	68
Figura 32: Ciclo circadiano.....	80
Figura 33: Proceso de necrosis.....	81
Figura 34: Diferencias principales entre necrosis y apoptosis.....	82
Figura 35: Muerte por apoptosis.....	83
Figura 36: Proceso de autofagia.....	84
Figura 37: Complejo IV.....	87
Figura 38: Cascada amiloide en el Alzheimer.....	89
Figura 39: Cerebro, endotelio, sangre y movimiento de $A\beta$ .....	90
Figura 40: Proteína TAU.....	91
Figura 41: Hiperfosforilación de la proteína TAU.....	92
Figura 42: Neurotoxicidad celular.....	94
Figura 43: Estrés oxidativo.....	98
Figura 44: Aspectos éticos e importantes a considerar en investigación con animales.....	104
Figura 45: Esquema de obtención de ratones knock-out.....	107
Figura 46: Modelos de ratón transgénico.....	109
Figura 47: Funciones de las quimiocinas y sus receptores.....	112
Figura 48: Funciones de las quimiocinas.....	113
Figura 49: Quimiocinas: interacción con el receptor.....	115
Figura 50: Funciones de las quimiocinas y sus receptores.....	117

Figura 51: Esquema de material usado en Western-blot. ....	150
Figura 52: Patrón de peso molecular de una proteína estándar multicolor .....	151
Figura 53: Tiempo invertido en recorrer una barra (segundos).....	160
Figura 54: Número de patas falladas .....	161
Figura 55: Exploración de la fuerza de agarre (tiempo en 60 segundos). ....	162
Figura 56: Exploración de dos objetos idénticos (segundos en 5 minutos).....	163
Figura 57: Reconocimiento de un objeto .....	164
Figura 58: Memoria de ubicación de objetos .....	165
Figura 59: Expresión de la proteína de GFAP.....	166
Figura 60: Expresión de la proteína MAP-2. ....	167
Figura 61: Expresión de ARNm de CCL1.....	168
Figura 62: Expresión de ARNm de CCR8. ....	169
Figura 63: Expresión de la proteína de CCR8.....	170
Figura 64: Expresión de ARNm de CCL3.....	171
Figura 65: Expresión de ARNm de CCL4.....	172
Figura 66: Expresión de ARNm de CCL5.....	173
Figura 67: Expresión de ARNm de CCR5. ....	174
Figura 68: Expresión de la proteína de CCR5.....	175
Figura 69: Expresión de ARNm de IL-3.....	176
Figura 70: Expresión de ARNm de ABCF1. ....	177
Figura 71: Expresión de ARNm de CCL2.....	178
Figura 72: Expresión de ARNm de CCL7.....	179
Figura 73: Expresión de ARNm de CCL12.....	180
Figura 74: Expresión de ARNm de CCR2. ....	181
Figura 75: Expresión de la proteína de CCR2.....	181
Figura 76: Expresión de ARNm de CCL17.....	182
Figura 77: Expresión de ARNm de CCL22.....	183
Figura 78: Expresión de ARNm de CCR4. ....	184
Figura 79: Expresión de la proteína de CCR4.....	185
Figura 80: Expresión de ARNm de CXCL4.....	186
Figura 81: Expresión de ARNm de CCR1. ....	187
Figura 82: Expresión de ARNm de CCR1. ....	187
Figura 83: Expresión de ARNm de CCL11.....	188
Figura 84: Expresión de ARNm de CCR3. ....	189
Figura 85: Expresión de la proteína de CCR3.....	190
Figura 86: Expresión de ARNm de CCL25.....	191
Figura 87: Expresión de ARNm de CCR9. ....	192
Figura 88: Expresión de la proteína de CCR9.....	192

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Curva de calibración por el método de Lowry.....	148
Tabla 2: Adición de Folin por el método de Lowry.....	148
Tabla 3: Lectura de absorbancia y extrapolación del valor de la proteína .....	149

## ÍNDICE DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS

<b>A<math>\beta</math><sub>1-42</sub></b>	Beta-amiloide <sub>1-42</sub>
<b>Citc</b>	Citocromo c
<b>EA</b>	Enfermedad de Alzheimer
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EGTA</b>	Etileno glicol-bis ( $\beta$ -aminoetil eter)-N, N, N', N'-tetra-ácido acido
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico, sistema gabérgico inhibitorio.
<b>GDNF</b>	Factor neurotrófico derivado de la glía ( <i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i> )
<b>HEPES</b>	Ácido 4-(2-hidroxietil) -1-piperacina-etanosulfónico
<b>IFN- <math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>MCI</b>	Mild Cognition Impairment
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real
<b>GAP</b>	Unión intercomunicante
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Ion calcio
<b>Na<sup>+</sup></b>	Ion sodio
<b>K<sup>+</sup></b>	<b>Ion potasio</b>
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>ACH</b>	Acetilcolina
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina–1 beta
<b>NGF</b>	Factor de crecimiento nervioso ( <i>nerve growth factor</i> )
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NT</b>	Neurotransmisor
<b>PAFG</b>	Proteína ácida fibrilar de la glía ( <i>GFAP Glial fibrillary acidic protein</i> )
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SMAC</b>	Activador segundo de caspasas derivado de las mitocondrias
<b>TBST</b>	Tampón salino de tris con polisorbato 20



# **INTRODUCCIÓN**

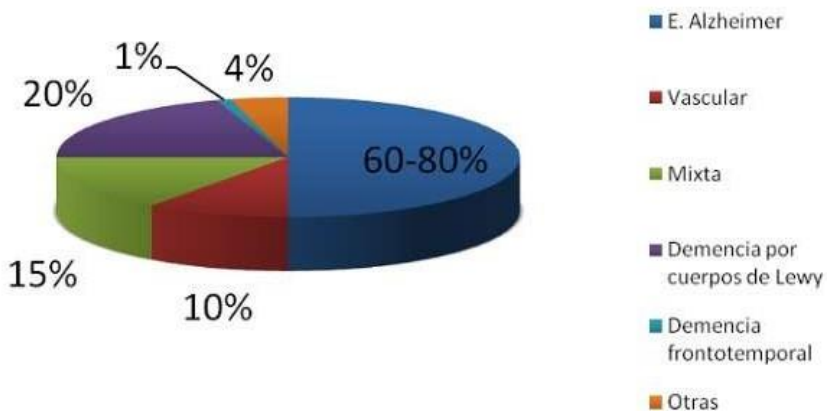


# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 INTRODUCCIÓN A LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La enfermedad de Alzheimer (EA), una de las principales causas de demencia de entre todas las neurodegenerativas conocidas. Presenta una prevalencia del 60-80% dentro de los diferentes tipos de demencia (Figura 1).

Prevalencia de los diferentes tipos de demencia

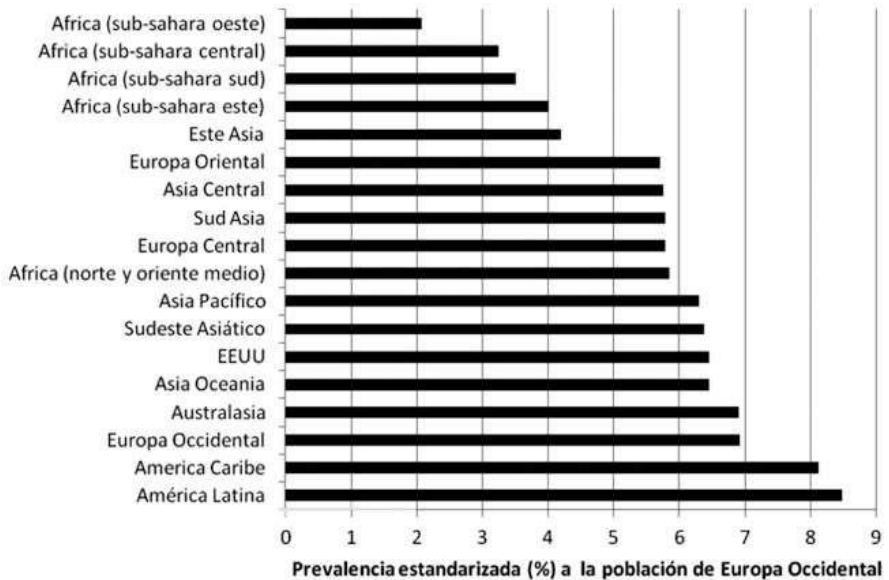


**Figura 1: Prevalencia enfermedad de Alzheimer en las demencias.**

*Fuente: Diario Médico*

Además, es característica una mayor presencia de esta enfermedad en los países desarrollados (Figura 2). En la actualidad el número de enfermos de Alzheimer sigue experimentando un crecimiento continuo sin que ningún

medicamento haya resultado eficaz en la reducción en su desarrollo futuro ni en la cura.



**Figura 2: Estimación de la prevalencia de demencia en mayores de 60 años.**

**Fuente:** Garre-Olmo, 2018.

Consiste en un trastorno neurodegenerativo que incluye pérdida de memoria, dificultades en el pensamiento, en el lenguaje y en las habilidades para resolver problemas del día a día. Actualmente, La única forma concluyente de diagnosticar la enfermedad de Alzheimer es realizando una autopsia del tejido cerebral del paciente para determinar si el sujeto sufría de la enfermedad de Alzheimer o cualquier otra forma de demencia. Sin embargo, las pruebas psicotécnicas nos ayudan a diagnosticar que tipo de enfermedad neurodegenerativa sufre

el paciente y así poder proporcionar la medicación y cuidados necesarios (Khan et al., 2020).

La enfermedad, al ser una patología progresiva y discapacitante, requiere de cuidados continuados con una dependencia en su entorno familiar más cercano, afectando no solo al paciente, sino también a la calidad de vida de aquellos que le rodean. En este momento, esta enfermedad continúa siendo una de las patologías más difíciles de tratar, en parte debido a que su mecanismo y origen todavía no se conocen con exactitud. Pueden interferir diferentes factores, por un lado, el estilo de vida, pero también otros factores como alteraciones neuroinmunes o enfermedades cardiovasculares. Por ello, la finalidad última ya no es la curación, sino una obtención de mejor calidad de vida durante la progresión de la enfermedad hasta el fallecimiento del paciente (Cayre et al., 2002).

Hasta el momento se han aprobado diferentes fármacos para el tratamiento de la enfermedad que solamente han servido como alivio sintomático, ya que son incapaces de modificar el curso de la patología (Townsend, 2011). En el año 2021, se aprobó por la Agencia Gubernamental de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos, el Aducanumab, un anticuerpo monoclonal específico para los oligómeros y fibrillas solubles de la proteína  $\beta$ -Amiloide (Dhillon, 2021). La aprobación se llevó a cabo sin los suficientes ensayos en animales de experimentación por la

empresa farmacéutica Biogen, por lo que al ser usado en humanos no produjo ningún cambio significativo en la disminución o eliminación de la enfermedad. Los 60.000 dólares que costaba el fármaco fue pagado por millones de norteamericanos antes de que los resultados en humanos se publicaran. En el año 2022, la misma empresa farmacéutica (Biogen) junto con investigadores japoneses, ensayó un fármaco experimental (Lecanemab), que como el anterior era un anticuerpo monoclonal que se unía con gran afinidad a las protofibrillas solubles de  $\beta$ -amiloide. En este caso el Lecanemab fue ensayado en personas de 50 a 90 años en un ensayo de Fase III, sin obtener ningún resultado significativo (van Dyck et al., 2023).

## 1.2 DEMENCIA Y ALZHEIMER

Demencia es una palabra que, hasta el siglo XVIII, estaba asociada al deterioro intelectual, hablando incluso de idiotez o imbecilidad. Además, proviene del latín “*dementia*” cuyo significado es “falta de razón”. De hecho, se consideraba que la demencia era un factor propio asociado al envejecimiento, siendo impensable para la época que se pudieran dar casos en personas más jóvenes, al menos debido a causas similares. Esta percepción fue cambiada a partir del siglo XVIII gracias a los esfuerzos de diferentes investigadores, entre los que destaca Philippe Pinel, que consideraba la demencia como una

enfermedad, dando lugar al Código Napoleónico del 21 de marzo de 1804 (Código Civil actual de Francia), que consideraban al enfermo de demencia inimputable ante cualquier delito.

A partir de ahí, fue evolucionando hacia una visión más próxima a la actualidad. Se demostró que podían ser consideradas como enfermedades orgánicas, correlacionando la sintomatología clínica mediante su posterior autopsia, separando claramente al paciente demente del discapacitado. En el primer caso, el paciente pierde facultades que poseía y en el segundo caso nunca las poseyó. Además, dentro de las demencias, las seniles se incluyeron en las de causa vascular, teniendo como hipótesis que la esclerosis de las arterias cerebrales causada por la edad avanzada ocasionaría la demencia senil (hipótesis mantenida hasta la actualidad, y de gran relevancia por el declive de la teoría amiloidea. A mediados y finales del siglo XIX se separaron las demencias de otras enfermedades psiquiátricas.

Fue en el año 1907, cuando dos científicos (Wilson con alrededor de diez casos y Alzheimer con un solo caso), cada uno por su lado, detectaron pacientes que poseían una pérdida clara de la memoria y otras funciones cerebrales, presentando situaciones de depresión, aumento de ira y delirios. En su investigación, mediante la realización de autopsias cerebrales a los enfermos, encontraron la presencia de placas seniles y

ovillos neurofibrilares, con atrofia de la corteza cerebral, definiendo de esta manera la presencia de la enfermedad de Alzheimer tras autopsia (Yamaguchi et al., 1998). Con motivo de la mayor influencia de Alemania en la ciencia de la época, la enfermedad acabaría teniendo el nombre de enfermedad de Alzheimer, a pesar de que Wilson había diagnosticado más de un caso (alrededor de una decena).

Ya a mediados del siglo XX, en los años cincuenta y sesenta, se produjo un cambio en la definición de la demencia senil, como consecuencia de los trabajos tanto de Martin Roth (Roth et al., 1952), como de Tomlinson y colaboradores (Tomlinson et al., 1970). En sus investigaciones, observaron que, aproximadamente un 70 % de pacientes diagnosticados mostraban la presencia tanto de placas seniles como de ovillos neurofibrilares (tal y como había sido descrito por Wilson y Alzheimer). Por otro lado, no se encontraron diferencias en el grado de arterosclerosis cerebral entre estos pacientes y ancianos sin demencia. De esta manera, con sus resultados llegaron a la conclusión de que la demencia Alzheimer no era una rareza, sino que, al contrario, era la causa principal de demencia en personas de avanzada edad. A partir de los años 60 se determinó que la enfermedad de Alzheimer era la principal causa de demencia tanto presenil como senil.

Para determinar que un paciente presenta una demencia se deben tener en cuenta diferentes aspectos como:



- Si es una enfermedad adquirida.
- Si presenta un curso progresivo.
- Si las funciones cerebrales se encuentran afectadas de manera global como lenguaje, memoria, estado de ánimo, etc.
- Si presenta incapacidad.

Hoy en día, existen organizaciones internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Asociación Americana de Psiquiatría, que son las encargadas de definir las demencias. Este criterio es el utilizado por los especialistas en la actualidad, más concretamente en España (Parekh et al., 2015), caracterizándose la demencia por:

- Presentar pérdida de memoria, con dificultad para registrar, almacenar y recuperar nueva información, tras partir de un estado mental normal.
- Afectación en las funciones ejecutivas a la hora de realizar una correcta ejecución de acciones como el lenguaje o el reconocimiento de estímulos.
- Repercusión en el ámbito familiar, social o laboral.
- Conciencia clara sin somnolencia o delirios.
- Los síntomas han de permanecer unos seis meses o más.

- La enfermedad debe ser progresiva.

Por todo lo comentado en las líneas superiores, se concluyó que en ningún caso debía ser considerado como demencia la pérdida de memoria sufrida por pacientes tras una depresión, retraso mental, delirios o bajo rendimiento intelectual. Además, las demencias en general (y más concretamente el Alzheimer) son consideradas actualmente un grave problema de salud, debido a que, en los países desarrollados y sociedades occidentales, cada vez la esperanza de vida es mayor (Fig. 3) (Ertekin-Taner et al., 2004).

En este momento, a la hora de realizar un diagnóstico clínico se tienen en cuenta tanto la entrevista con los pacientes y sus familiares, como la exploración del paciente y el uso de marcadores biológicos para un diagnóstico precoz. De hecho, el término deterioro cognitivo leve (Mild Cognitive Impairment: MCI) fue acuñado e incluido a la hora de realizar diagnósticos de la enfermedad en sus fases más tempranas, indicando una situación de alto riesgo para desarrollar demencia, presentando fallos en la memoria entre otras funciones cognitivas. A menudo, los familiares también se dan cuenta de esta situación. A pesar de que el individuo MCI no posea problemas en su actividad del día a día, sí que surgen indicadores de

posible demencia futura a la hora de realizar test objetivos psicológicos.



**Figura 3: Demencia Senil.**

**Fuente:** <https://residencialplaza.com/demencia-conoce-los-primeros-sintomas/>

Existen diferentes tipos de demencia, ya que hay más de setenta enfermedades que pueden dar lugar al desarrollo de la enfermedad. Por ello, una vez realizada su detección, es necesario realizar una búsqueda exhaustiva de la causa que ha dado lugar a la demencia. Entre las enfermedades que pueden ocasionar la patología se encuentran la demencia de Alzheimer (mayor prevalencia), por problemas vasculares (segunda de mayor importancia tras el Alzheimer) (D. Knopman et al., 2000), cuerpos de Lewy, por causas infecciosas como el SIDA, por la enfermedad Creutzfeldt-Jakob, etc. Cabe destacar

que también se detectan demencias mixtas, como la que presentan pacientes con Alzheimer y Parkinson a la vez (Green et al., 2009).

La demencia senil es aquella que se da en personas de edad avanzada, mientras que las demencias preseniles son las que se dan en personas de menos de 65 años, pudiendo ser en todo similares a la demencia senil. Como se ha comentado con anterioridad, existe un mayor riesgo a desarrollar demencia en personas de edad avanzada (por eso las personas con más de 90 años la padecen), pero no todos los individuos acaban desarrollando la enfermedad. Por estos hechos, se encuentran dificultades a la hora de discernir entre cambios cognitivos asociados al envejecimiento cerebral, respecto a los que forman parte del desarrollo de una enfermedad, como la de Alzheimer. Esto se debe a que existen cambios cognitivos asociados a la edad leves (que no van de la mano con el desarrollo de una demencia) y que afectan a la memoria y a la rapidez de respuesta cerebral. Por ello, los pacientes presentan dificultad a la hora de recordar nombres de cosas o hechos vividos recientemente.

### **1.3 EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**

El sistema nervioso es imprescindible a la hora de conocer el medio que nos rodea, debido a que nos permite reaccionar ante peligros o deseos, memorizar y pensar, entre

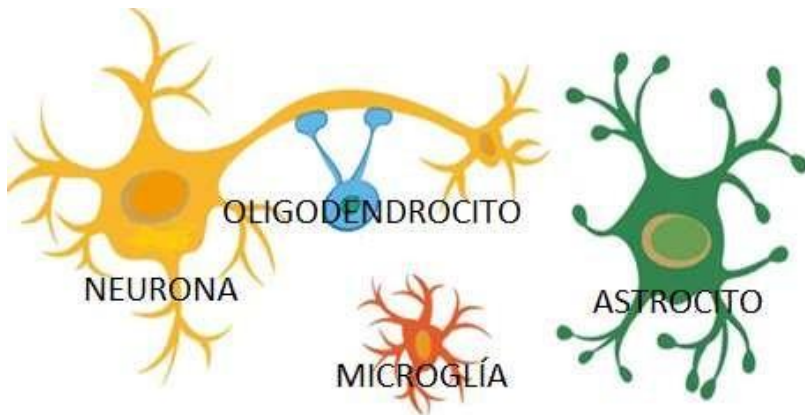
otras funciones (Gage, 2000). Dentro del sistema nervioso existen diferentes zonas, de las cuales, el cerebro constituye la parte de mayor volumen y complejidad. Su función consiste en analizar y procesar la información recibida y regular el correcto funcionamiento de todo el organismo. Principalmente, el sistema nervioso central (SNC) se compone de encéfalo y médula espinal, que son los encargados del correcto funcionamiento del organismo. Además de procesar la información, el SNC es el encargado de recogerla y transmitirla al sistema nervioso periférico, formado por los nervios craneales y espinales. En el encéfalo encontramos el cerebro, el cerebelo y el tronco del encéfalo (formado a su vez por mesencéfalo, protuberancia y bulbo). Cabe añadir que la corteza cerebral es la principal masa del cerebro y que se encuentra dividida en dos hemisferios cerebrales (con circunvoluciones, surcos y cisuras) conectados por el cuerpo calloso (Fig. 4).



**Figura 4: Sistema Nervioso Central.**

**Fuente:** <https://psicologiyamente.com/neurociencias/sistema-nervioso-central>

El cerebro humano está compuesto por distintos tipos celulares, clasificados según su apariencia y funcionalidad. Las células neurales son las que forman el sistema nervioso central y están divididas principalmente en neuronas y glía (Del Rio Hortega, 1957). Dentro de la glía encontramos los astrocitos, la microglía y la oligodendroglía (Figura 5) (Volterra & Steinhäuser, 2004).



**Figura 5: Tipos de células neurales.**

**Fuente:** Ignacio Campo Palacio desde

<https://sitn.hms.harvard.edu/flash/2022/microglia-the-protectors-of-the-brain/>

A lo largo de mucho tiempo, a las neuronas se les ha asignado un papel principal, ninguneando la importancia del resto de células neurales como astrocitos y microglía, pero en la actualidad, es conocido que la microglía posee un origen no neural. La inserción cerebral de monocitos sanguíneos está representada por la microglía. Estos monocitos, posteriormente, se transformaron en los macrófagos tisulares cerebrales, teniendo como función, por lo tanto, proteger al cerebro frente a agentes externos dañinos. Los oligodendrocitos, en cambio, son los encargados de formar la mielina, que ejerce como protección del axón neuronal, canalizando la comunicación intercelular (Kondo & Raff, 2000). Entre la multitud de funciones que poseen los astrocitos

podemos indicar varia, como que se encargan de transferir los nutrientes desde los vasos sanguíneos hasta las neuronas, eliminando las sustancias de deshecho. De esta manera, se encargan de controlar el ambiente interno del SNC, manteniendo el medio electroquímico adecuado para las neuronas (Aschner & Kimelberg, 1991). Por todo ello, el 50% del volumen total cerebral está compuesto por las células gliales, que son el origen de la mayoría de los tumores cerebrales, como puede ser el glioblastoma y el neuroblastoma. Respecto a las neuronas, están especializadas en recibir información, transmitir impulsos e influir en otras neuronas o tejidos efectores.

En el cerebro humano hay alrededor de 100 mil millones de neuronas encargadas de diferentes funciones cerebrales, como el control motor, la memoria, etc. (Chen & Swanson, 2003; Squire, 2009; Squire & Wixted, 2011).

### **1.3.1 FUNCIONES CONGNITIVAS**

El cerebro humano puede realizar multitud de funciones, algunas de ellas extremadamente complicadas y sofisticadas. Estas funciones se enmarcan dentro de lo que se conoce como funciones cognitivas o corticales porque las neuronas que realizan esas funciones están situadas en la corteza cerebral (Zarranz, 2013). Esto es importante debido a que los pacientes que sufren de Alzheimer pueden experimentar pérdidas cognitivas y funcionales durante el curso de la enfermedad



(tales como aprendizaje y memoria), desarrollando problemas a la hora de realizar actividades diarias simples, como vestirse, comer, etc., lo que puede influir negativamente en su calidad de vida (Lök et al., 2019).

Las funciones cognitivas más importantes son:

- La memoria
- El lenguaje
- Las praxias
- Las funciones ejecutivas
- La percepción y el reconocimiento (Gnosias)

### **1.1.3.1 LA MEMORIA**

La memoria es aquella encargada de almacenar y recabar la información obtenida mediante el aprendizaje y las experiencias vividas, siendo capaz de recuperarla una vez grabada en el cerebro. Se puede dividir en memoria implícita o no consciente y memoria explícita o consciente. Además, esta última se divide en memoria episódica y la memoria semántica que almacena conceptos o conocimientos generales. Esto quiere decir que la memoria episódica es la encargada de recordar una conversación, mientras que la memoria semántica es la encargada de saber el significado de las palabras o el pH de la sangre (Fig. 6).



**Figura 6: Memoria y cerebro.**

**Fuente:** <https://www.elcastellano.org/news/revelan-d%C3%B3nde-se-almacenan-los-fragmentos-de-memoria-en-el-cerebro>

La memoria depende de numerosas estructuras cerebrales que se interconectan, es decir, no se encuentra en un lugar determinado en el cerebro. Respecto a los trastornos que se pueden producir en la memoria, se habla de la aparición de alteraciones de la memoria episódica, lo que indica que presentan dificultad para recordar hechos del pasado reciente y para asimilar y aprender nueva información. La memoria episódica es la función cognitiva más precozmente afectada en la enfermedad de Alzheimer (D. S. Knopman et al., 2018), 2018).

### **1.2.3.1 EL LENGUAJE**

El lenguaje es la capacidad para comunicarse entre individuos que poseemos mediante signos complejos, no solo

hablados, sino formados por un conjunto importante de formas como la escritura, las matemáticas, etc. En el lenguaje intervienen estructuras del hemisferio dominante, que en la mayoría de las personas es el izquierdo. En este hemisferio existen dos áreas importantes para el lenguaje (área de Wernicke y área de Broca). El área de Wernicke, localizada en el lóbulo temporal, permite la comprensión del lenguaje, mientras que el área de Broca, localizada en el lóbulo frontal, controla la emisión del lenguaje y su fluidez, siendo ambas capaces de interconectarse entre sí. La alteración del lenguaje, denominada afasia, tendrá unas características diferentes según el área lesionada donde se produzca (Jiménez de la Peña et al., 2018).

En la afasia de Wernicke, el enfermo presentará dificultades para la comprensión del lenguaje, mientras que, en la afasia de Broca, el paciente tiene un lenguaje titubeante, simple, con poca fluidez, pero su comprensión es perfecta. La afasia se puede producir por una lesión cerebral localizada que afecta a una o varias de las estructuras implicadas en el lenguaje, como sería el caso de un infarto cerebral o un tumor, o deberse a un progreso degenerativo global cerebralmente, como en las demencias (Gil i Saladié et al., 1989; Mesulam, Rogalski, et al., 2014). La enfermedad de Alzheimer (EA) es el tipo de demencia que produce el mayor daño en el lenguaje, manifestándose inicialmente como una afasia nominal.

Posteriormente, los pacientes con EA presentan una afasia sensitiva transcortical y finalmente sufren una muda total o afasia global (González Montalvo et al., 1990; Mesulam, Weintraub, et al., 2014).

### **1.3.3.1 FUNCIONES EJECUTIVAS**

Las funciones ejecutivas se entienden como un conjunto amplio de procesos y subprocesos que trabajan para coordinar y organizar otras funciones cognitivas. Son las habilidades que permiten la anticipación, la planificación de actividades, el establecimiento de metas, la programación, la autorregulación de tareas y la habilidad de llevar a cabo eficientemente dichas tareas. Además, gracias a las funciones ejecutivas se pueden controlar los cambios que pueden producirse en el entorno, adaptarse al ambiente cambiante e incluso prevenir dichos cambios (Riva, 2019).

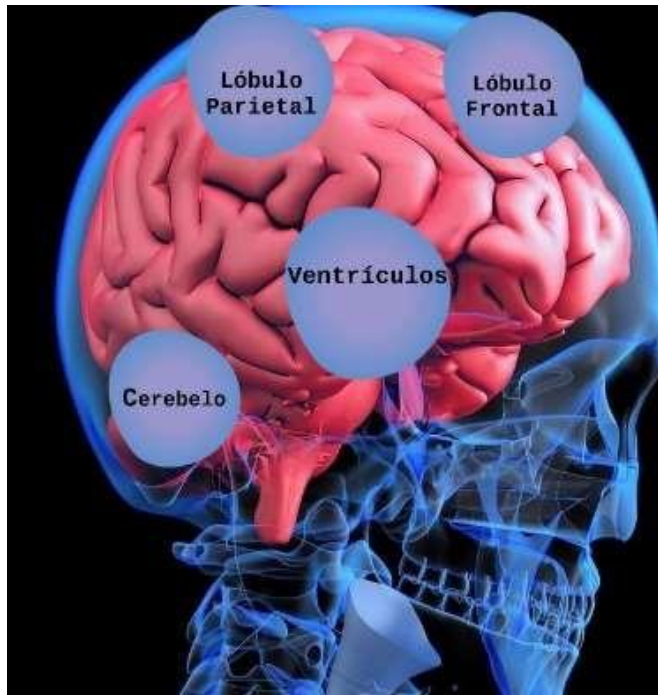
El control de estas funciones ejecutivas se encuentra a cargo del lóbulo frontal, además de la personalidad, la motivación y la conducta. Cuando el lóbulo frontal se encuentra dañado, los pacientes presentan problemas relacionados con la planificación o con las rutinas, siendo incapaces de asimilar y corregir los errores que se puedan presentar y presentando problemas para adaptarse a los cambios que puedan producirse. Además, son observables permutaciones patológicas en la conducta y el comportamiento, pudiendo

desarrollar conductas más agresivas o pasivas respecto a los mismos estímulos (descontrol de los impulsos). Este tipo de cambios o alteraciones presentadas son predominantes de la demencia frontotemporal (Alfaro Martínez et al., 2021; Limoli et al., 2018).

En los pacientes con EA, los resultados de varios investigadores apuntan a que los componentes más afectados son la memoria de trabajo, control atencional, fluencia verbal, capacidad de inhibición, toma de decisiones, velocidad de procesamiento, resolución de problemas y monitorización de la conducta (Carrasco & Lomber, 2013).

#### **1.4.3.1 LA PRAXIA**

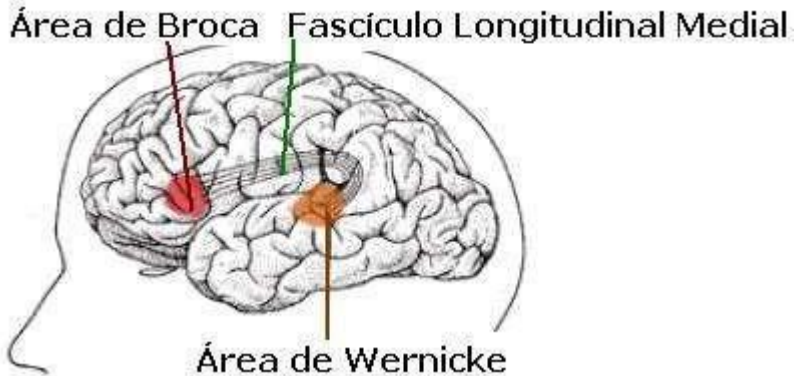
La praxia es la función cognitiva responsable a la hora de realizar gestos voluntarios complejos (aprendidos previamente) y motricidad. Esto es así, debido a que, para ello, es necesario una planificación y coordinación previa de gestos o actos más sencillos para realizarlos correctamente. Para que este proceso se produzca, es preciso la participación del lóbulo frontal, que es el encargado de permitir la decisión de realizar el movimiento correspondiente. Posteriormente, el encargado es el lóbulo parietal dominante que, al poseer las áreas asociativas, es donde se localizan las instrucciones motoras, preparando cada uno de los actos motores tras analizar toda la información (Fig. 7).



**Figura 7: Áreas cerebrales encargadas de las praxias.**

**Fuente:** <https://prezi.com/p/6xbm8kxsbk0w/tipos-de-apraxia/>

Una vez realizado este proceso, la señal se transmite a las áreas correspondientes del cerebro, encargadas de la distribución de la información a través de las vías nerviosas (médula y nervios periféricos), hasta los músculos encargados de intervenir y/o realizar el movimiento en cuestión. Asimismo, las zonas asociativas del lóbulo parietal participan en el proceso de distinción o discriminación de cada uno de los gestos una vez realizada su previa comprensión (Bridges & Van Lancker Sidtis, 2013; Resende et al., 2020)(Fig. 8).



**Figura 8: Área de Broca y de Wernicke y su interrelación.**

**Fuente:** <https://evolucionhumana.org/2011/03/05/5-tobias-y-las-areas-de-brocca-y-wernicke/>

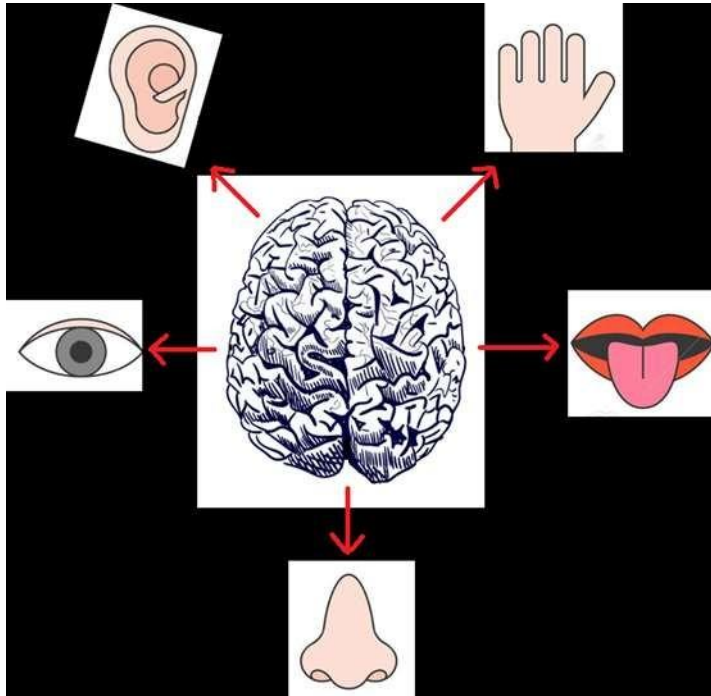
Una apraxia tiene lugar en aquellas personas que presentan incapacidad a la hora de realizar movimientos voluntarios o gestos complejos, es decir, conservan la capacidad para mover y contraer la musculatura encargada de realizar el proceso, pero son incapaces de realizarlo correctamente (Blair et al., 2007; Ochipa et al., 1992). La acción motora es realizada de una forma inapropiada, ejecutando movimientos que carecen de continuidad (Lesourd et al., 2013). Dependiendo del área cerebral afectada o involucrada, se pueden observar diferentes apraxias, clasificándose en apraxia motora, ideatoria e ideomotora. También pueden aparecer apraxias relacionadas con actos motores concretos como pueden ser la marcha o vestirse, entro

otras. La apraxia se detecta de forma precoz en las fases iniciales de la enfermedad de Alzheimer (Cacabelos, 1999).

### **1.5.3.1 LA GNOSIA**

La gnosia es la capacidad, mediante el uso de la percepción y el reconocimiento, que permite identificar el entorno y relacionarlo con información previa obtenida por el individuo con anterioridad ante dicha situación. Gracias a este proceso previo, podemos comprender el ambiente y las situaciones que están teniendo lugar a nuestro alrededor. Encargadas de las funciones sensoriales encontramos las áreas corticales primarias, como el lóbulo occipital para la visión o el lóbulo temporal para la audición, entre otros. En la confluencia de los lóbulos parietal, occipital y temporal se encuentran las áreas asociativas de cada área cortical, que permiten al individuo dar nombres a aquellos que se percibe (Chitnis & Weiner, 2017) (Fig. 9).





**Figura 9: Gnosias.**

**Fuente:** <https://www.imentia.com/blog/alzheimer-capacidades-cognitivas-gnosias/>

Es importante mencionar las agnosias, entre las cuales destaca la agnosia visual, en la cual, en ausencia de ceguera, el sujeto presenta imposibilidad a la hora de reconocer visualmente un objeto conocido con anterioridad. Esta agnosia es claramente apreciable en pacientes con EA y otros tipos de demencia, en fases moderadamente avanzadas de la enfermedad. También existen otros tipos de agnosia, como la agnosia auditiva o la táctil entre otras, pero son menos frecuentes (Ghavami et al., 2014).

### **1.3.2 CRONOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

La primera zona cerebral dañada en la enfermedad de Alzheimer es la corteza entorrinal, que se denomina la fase de estadio temprana o entorrinal de la enfermedad (Suhonen et al., 1996). Posteriormente y conforme aumenta el número de lesiones en esta corteza entorrinal, se ve afectado el hipocampo y las zonas límbicas (estadio límbico). En último lugar se ve involucrada la neocorteza, denominado el estadio isocortical (Metsaars et al., 2003). De esta manera, esta clasificación de la enfermedad permite conocer la progresión de las lesiones que tienen lugar de una manera temporal cronológica en los enfermos de Alzheimer, ayudando al clínico para obtener una buena correlación clínica. Esto se explica ya que el estadio entorrinal es asintomático. En el estadio límbico el paciente presenta un discreto deterioro cognitivo y en el estadio isocortical se asocia con un deterioro severo y con la demencia (Cacabelos, 1999).

### **1.4 TIPOS DE CÉLULAS EN EL CEREBRO**

El cerebro forma parte del sistema nervioso central y presenta una variedad de células que lo caracterizan. Dentro de esta variedad, la agrupación celular más admitida es según el origen celular. Por ello, las células cerebrales se dividen en células neurales y no neurales. Las primeras tienen un origen

neural como son los astrocitos, las neuronas y la oligodendroglía, entre otros. Las segundas no son propias de un origen neural, como es la microglía, ya que son células diferenciadas procedentes de monocitos de la sangre indiferenciados.

#### **1.4.1 NEURONAS**

Las neuronas son las células dentro del sistema nervioso que son responsables de la comunicación rápida de información. Para ello utilizan dos formas, la comunicación sináptica y la comunicación eléctrica. En la sináptica las neuronas reciben información química de otras neuronas a través de las dendritas y axones. Además, estas células comunican la información a otras células a través de los axones (Lovinger, 2008). En la sinapsis eléctrica la transmisión entre la primera neurona y la segunda neurona se produce por el paso de iones de una célula a otra a través de uniones comunicantes (gap). Las uniones gap son canales pequeños formados por el acoplamiento de complejos proteicos formados por macromoléculas denominadas conexinas. Cada neurona aporta 6 conexinas y a su vez forman un canal por donde circula agua que es una vía de conexión.

En primer lugar, fue el científico español Santiago Ramón y Cajal quién logró describir por primera vez los diferentes tipos de neuronas de forma aislada (Ramón y Cajal, 1913). Al mismo

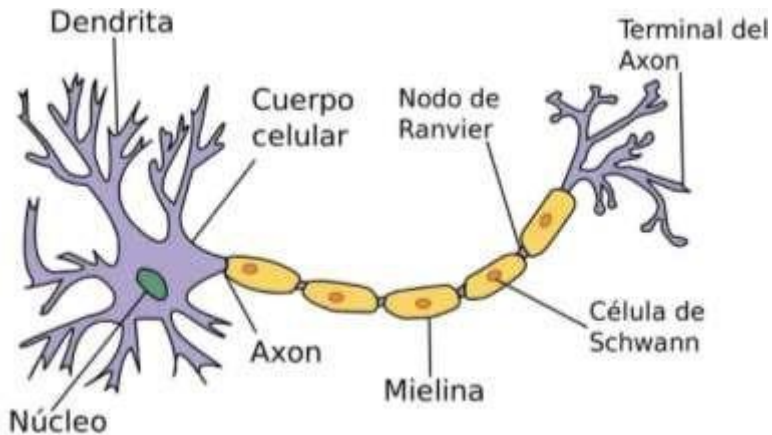
tiempo planteó la hipótesis de la Teoría neuronal, basada en que el sistema nervioso estaba constituido por neuronas individuales comunicándose entre sí a través de contactos funcionales llamados sinapsis, un punto de vista diferente, ya que los científicos de su época concebían el sistema nervioso como una amplia red de fibras nerviosas conectadas entre sí formando un continuo (como los vasos sanguíneos).

Tras aceptarse que las dendritas y axones de distintas neuronas no contactaban entre sí en el caso de la sinapsis química, su propuesta fue universalmente aceptada (Doctrina de la neurona, en la actualidad conocida como Teoría neuronal) (Ramón y Cajal, 1913). Además, también se aceptó la propuesta de que existía un continuo, conocido hoy como sinapsis eléctrica neuronal.

Se trata de un tipo de célula, que constituye el componente principal del sistema nervioso. Estas células no son las únicas; también forman parte de este sistema las células gliales; astrocitos y las células con mielina, que en el sistema nervioso central se denominan oligodendrocitos y en el sistema nervioso periférico células de Schwann.

La neurona está formada por un soma o cuerpo neuronal (pericarion), siendo el centro metabólico en el que, junto con un gran número de mitocondrias, refleja el gran consumo de energía y síntesis proteica. Asimismo, incluyendo el soma, las

neuronas pueden dividirse en nueve partes diferentes, con sus correspondientes características y funciones específicas (Fig. 10).

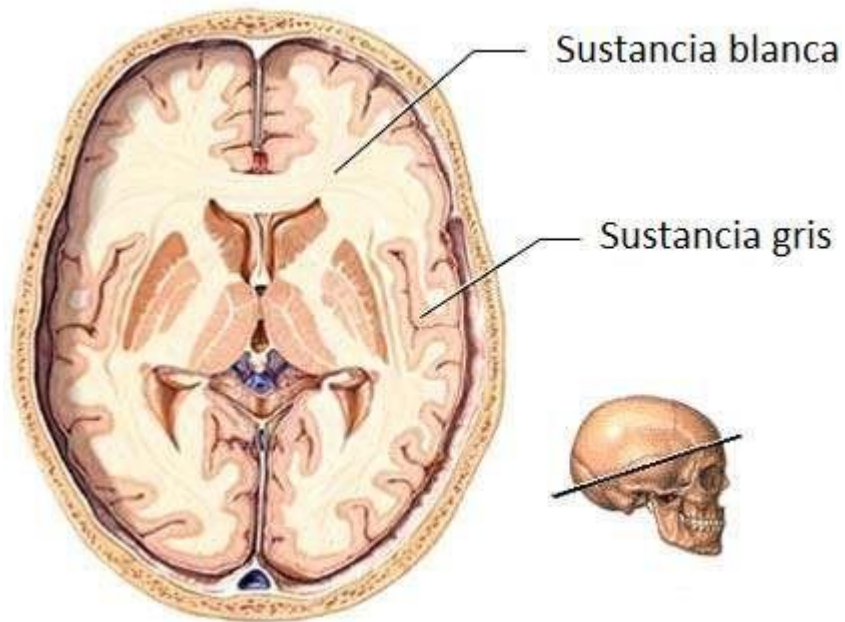


**Figura 10: Partes de una neurona.**

**Fuente:** <https://www.psyciencia.com/neurona-que-es-y-cuales-son-sus-partes/>

En este tipo celular, el complejo de Golgi se encuentra muy desarrollado, en comparación a otros tipos celulares, debido a la cantidad de neurotransmisores que se producen en las neuronas para permitir la comunicación interneuronal y de comunicación con la glía. Del soma parten prolongaciones denominadas dendritas que pueden comunicarse a nivel sináptico con el axón de otras neuronas, con dendritas de otras neuronas o con la glía. Suelen producir ramificaciones de manera abundante en las proximidades del soma, adoptando forma arborescente en muchos de los casos.

La información se transmite a través de la célula nerviosa, continuando por el axón. Este componente es una prolongación única y de mayor longitud que las dendritas. Contiene un citoplasma con densos haces de microtúbulos y neurofilamentos que actúan como elementos estructurales y también desempeñan un papel clave en el transporte de metabolitos y orgánulos a lo largo del axón. Los axones terminan en ramas finas llamadas campos terminales, que corresponden a los puntos de contacto funcional o sinapsis, eléctricas o químicas. Dentro del SNC encontramos la sustancia gris, constituida por agrupaciones de somas que comparten funciones específicas, y la sustancia blanca, formada por haces de axones envueltos por mielina (lipoproteína aislante) (Haines et al., 2015; Squire, 2006)(Fig. 11).



**Figura 11: Sustancia gris y sustancia blanca del SNC.**

**Fuente:** [https://medlineplus.gov/spanish/ency/esp\\_imagepages/18117.htm](https://medlineplus.gov/spanish/ency/esp_imagepages/18117.htm)

Según la forma del soma y del tipo de prolongaciones que brotan de él, las neuronas pueden clasificarse en tres grandes tipos: monopolares, bipolares y multipolares.

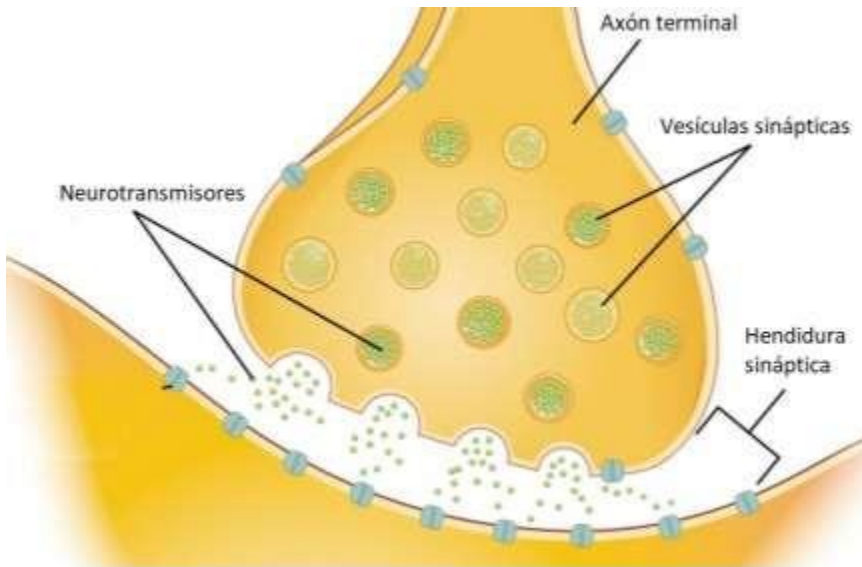
#### **1.1.4.1 SINAPSIS NEURONAL**

La sinapsis es la zona especializada tanto estructuralmente, como funcionalmente, donde se produce la transferencia de la información entre las neuronas, pudiendo dividirse en sinapsis química o eléctrica. En esta zona es donde se produce la comunicación entre las neuronas, mediante la prolongación neuronal o axón de la primera neurona junto con

una o más neuronas. Esta comunicación se realiza a través del axón, de las dendritas o del cuerpo neuronal. También se puede realizar con neuronas efectoras tanto glandulares como musculares.

En la sinapsis eléctrica existe una conexión que proporciona un puente de baja resistencia entre dos células nerviosas unido mediante el uso de proteínas de unión. La información puede fluir en ambos sentidos y no existe retardo sináptico. En cambio, hay que tener en cuenta que los canales iónicos pueden no encontrarse abiertos y que, además, pueden ser regulados por el pH intracelular, bien por el  $\text{Ca}^{2+}$ , por segundos mensajeros y/o por neurotransmisores (Haines et al., 2015; Squire, 2006). Las sinapsis de tipo químico son las más frecuentes que podemos encontrar en el SNC. En ellas se produce una comunicación interneuronal, mediante la producción y excreción de mediadores químicos al botón sináptico, siendo captados por los receptores específicos de las neuronas postsinápticas (Fig. 12).





**Figura 12: Sinapsis neuronal.**

Fuente: <https://psicologiaymente.com/neurociencias/tipos-de-sinapsis>

Las neuronas poseen un potencial de reposo (alrededor de  $-70$  mV) con una determinada carga eléctrica en su interior que difiere de la carga extracelular, encontrándose de esta manera, hiperpolarizadas. Para producirse un potencial de acción es necesario que la neurona reciba un impulso eléctrico capaz de superar el umbral, que recorre el axón permitiendo la liberación del neurotransmisor o neuromodulador.

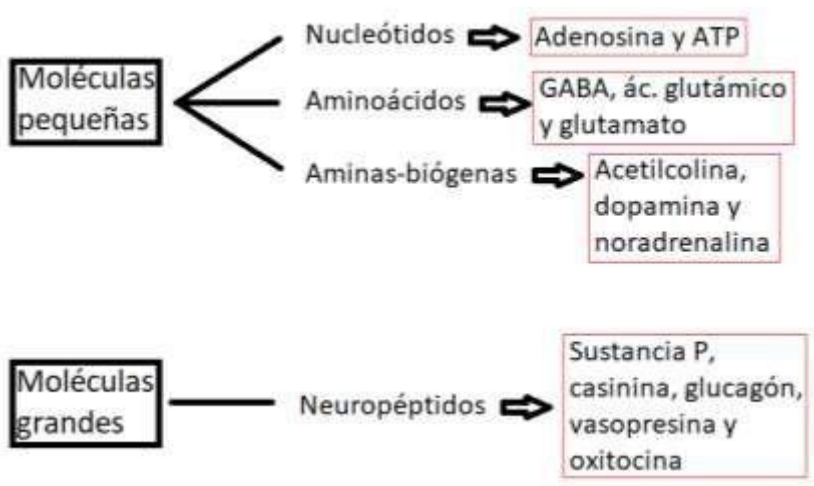
Los neurotransmisores se encuentran almacenados dentro de las vesículas sinápticas, localizadas en el botón presináptico. Estos son liberados a través de la membrana plasmática del axón. La liberación se produce mediante la fusión de las vesículas sinápticas en los denominados campos

o botones terminales del axón (Haines et al., 2015; Lujan et al., 2016; Squire, 2006; Squire & Wixted, 2011)(Fig. 12).

Cuando se produce el potencial de acción se ocasiona una despolarización de la membrana celular, elevándose la carga eléctrica de la neurona hasta unos  $50\pm 10$  mV. A posteriori, se produce un mantenimiento del potencial de reposo neuronal gracias a la presencia de los gradientes químicos y eléctricos y a la acción de la membrana plasmática y sus moléculas. Un ejemplo es la bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPasa que introduce iones  $\text{K}^+$  en la célula y elimina al exterior iones  $\text{Na}^+$ , actuando como gradiente de concentración (Lujan et al., 2016). Tras la liberación de los neurotransmisores por parte de la neurona presináptica, estos deben interactuar con la neurona postsináptica o con la efectora (según el caso), produciendo la transmisión de la información. Esto se produce gracias a la presencia de receptores con afinidad por el neurotransmisor en la membrana de la neurona postsináptica. La mayoría de estos receptores de membrana están compuestos de cadenas glucoproteicas que traspasan la cadena lipídica, transformando la señal química extracelular recibida en un cambio funcional en la neurona o célula efectora.

Los neurotransmisores se definen como sustancias químicas conformadas por moléculas pequeñas (menos de 10 átomos de carbono) y por moléculas grandes (más de 10 átomos de carbono). Dentro del grupo de pequeñas moléculas

podemos encontrar nucleótidos (adenosina y ATP), aminoácidos (GABA, ácido glutámico y glutamato) y las aminas-biógenas (acetilcolina, dopamina y noradrenalina). En cuanto a las moléculas grandes, encontramos los neuropéptidos (sustancia P, casinina, glucagón, vasopresina y oxitocina) (Fig. 13).



**Figura 13: Neurotransmisores.**

*Fuente: Ignacio Campo Palacio*

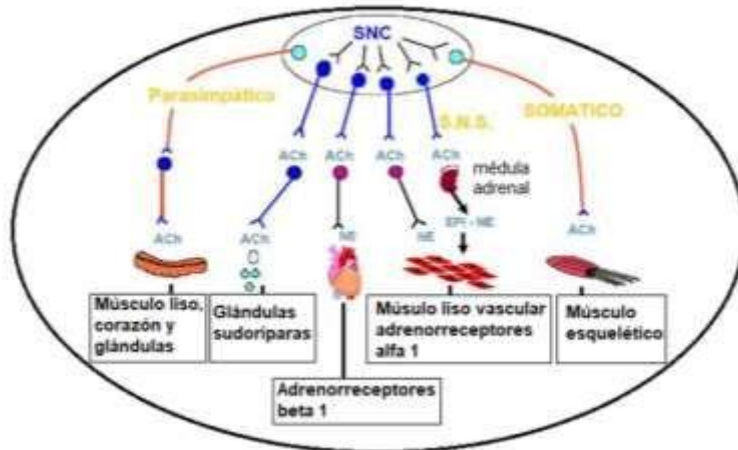
Los neurotransmisores principales son los aminoácidos GABA, ya que son los encargados de realizar la mayoría de comunicación producida entre las células del sistema nervioso. Además, los efectos de estos neurotransmisores son predominantemente de inhibición. Se pueden encontrar formando parte de procesos y mecanismos de coordinación o integración, tanto a nivel motor como a nivel cognitivo. También

toman parte en importantes trastornos neurológicos y psiquiátricos, como pueden ser la enfermedad de Parkinson, el corea de Huntington, la discinesia tardía y los trastornos del sueño. Cabe añadir que los astrocitos también son células GABAérgicas, participando en la modulación de la actividad de la microglía (Fraser et al., 1994; M. Lee et al., 2011).

En cuanto al glutamato, es el encargado de mediar en la mayoría de transmisión excitatorias. Esto se debe a que, cuando se produce una unión a sus receptores, se produce el paso de iones de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que provoca una despolarización de la neurona postsináptica (Rao et al., 2001; M. Yamamoto et al., 2013). Hay que tener en cuenta que se produce un retraso sináptico desde que llega el potencial de acción sináptico, hasta que se inicia la corriente sináptica en la neurona postsináptica. Esto se produce a causa de que la liberación y difusión del glutamato desde la terminación presináptica lleva un tiempo.

Entrando en niveles más concretos, la agrupación de los receptores se puede realizar en base al neurotransmisor químico que los active. En primer lugar, se denominan receptores colinérgicos los que responden a la acetilcolina (Ach) (van der Zee et al., 1993) (Fig. 14), siendo de dos tipos, nicotínicos y muscarínicos. En segundo lugar, los llamados receptores adrenérgicos, que serán activados por las catecolaminas y (adrenalina o noradrenalina) clasificados en

adrenorreceptor  $\alpha$  (subtipos:  $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1b}$ ,  $\alpha_{1d}$ ,  $\alpha_{2a}$ ,  $\alpha_{2b}$  y  $\alpha_{2c}$ ) y  $\beta$  (subtipos:  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$  y  $\beta_4$ ).



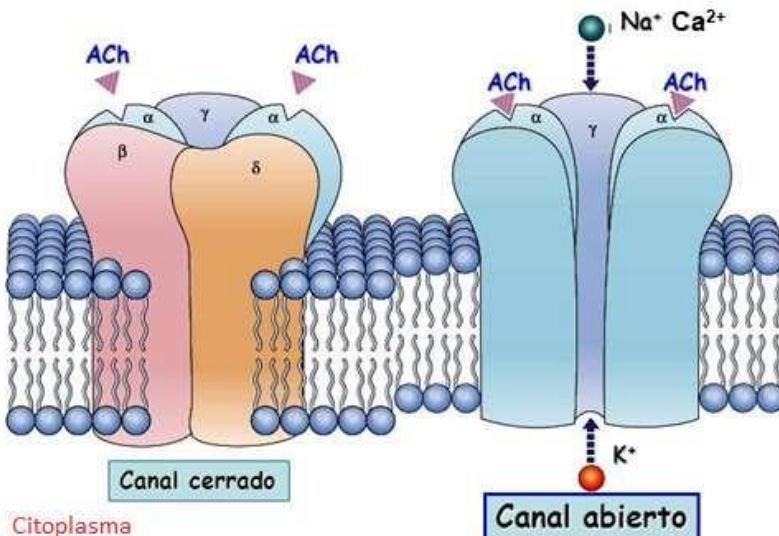
**Figura 14: Esquema del papel de la acetilcolina (ACh).**

**Fuente:** modificado de <https://www.dieteticaonline.es/blog/la-acetilcolina-y-la-memoria.html>

La acetilcolina es la responsable de la activación de los receptores colinérgicos nicotínicos, que son receptores iónicos, provocando un cambio estructural que da lugar al ingreso de iones  $\text{Na}^+$ , causando una despolarización en la célula receptora. Se subdividen en receptores  $\text{N}_1$  o  $\text{N}_M$  ubicados en la unión neuromuscular y los  $\text{N}_2$  o  $\text{N}_N$  localizados en el sistema nervioso autónomo (ganglios colinérgicos y adrenérgicos). Los receptores que responden al mismo neurotransmisor se clasificarán en subtipos que desencadenarán diferentes respuestas. El receptor nicotínico (nAChRs) es una proteína transmembrana compuesta por cinco subunidades proteicas de canal no homólogas ( $2\alpha$ ,  $1\beta$ ,  $1\gamma$ ,  $1\delta$ ) (Fig. 15), y cada una de

ellas posee cuatro regiones hidrófobas que atraviesan la membrana.

El punto de unión de la ACh se encuentra en el núcleo central (ocupando las  $2\alpha$ ) (Fig. 15). La entrada a favor de gradiente de los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  y la salida de  $\text{K}^+$  se produce tras la unión de dos moléculas de ACh con las dos subunidades  $\alpha$ , la cual provoca un cambio estructural. Esto da lugar a una despolarización parcial, siendo insuficiente a la hora de producir un potencial de acción en la célula muscular, activándose los canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje que rodean la placa motora. Con su apertura, la despolarización de la membrana es suficiente para producir un potencial de acción a lo largo de la fibra muscular (Rao et al., 2001).



**Figura 15: Receptor nicotínico de la ACh.**

**Fuente:** <https://artedelosdioses.com/blog/2021/09/14/union-neuromuscular-o-placa-motora/>

La familia más grande de proteínas integrales de membrana es la familia de los receptores acoplados a la proteína G (GPCR's) y se encuentra formada por los receptores colinérgicos muscarínicos. Estas proteínas están conformadas por una cadena polipeptídica simple con 7 segmentos  $\alpha$ -hélice transmembranales, poseyendo estos una estructura tridimensional común. Estos segmentos también se conocen como receptores de 7 dominios transmembranales (TM 1-7) o receptores heptahelicoidales. Se encuentran unidos entre sí por *loops*: 3 intracelulares (iL<sub>1</sub>-iL<sub>3</sub>), un *loop* largo compuesto básicamente por aminoácidos hidrofílicos entre las hélices 5 y 6 (iL<sub>3</sub>), el cuál es el sitio de interacción o acoplamiento a proteína G, 3 *loops* extracelulares (eL<sub>1</sub>-eL<sub>3</sub>) y 1 segmento N-terminal glicosilado en el dominio extracelular. Se puede formar un cuarto *loop* en el segmento C-terminal. Se han identificado cinco subtipos: M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub>, M<sub>5</sub> (Fig. 16) (Haines et al., 2015; Levey, 1996; Lujan et al., 2016). Existen diferentes tipos de neuronas según su lugar de localización celular y sináptica (Fig. 16).

<b>M<sub>1</sub></b>	Abundante en neo córtex, neo estriado e hipocampo	Neuronas piramidales y piramidales estriatales	Post ->> Pre-sináptica
<b>M<sub>2</sub></b>	Moderadamente abundante en cerebro	Neuronas no piramidales en córtex e hipocampo	Pre ->> Post-sináptica
<b>M<sub>3</sub></b>	Bajos niveles en todo el cerebro, pero abundante en hipocampo	Neuronal	Post ->> Pre-sináptica
<b>M<sub>4</sub></b>	Abundante en neo estriado, moderados en hipocampo y córtex.	Neuronas estriatales espinosas	Pre ->> Post-sináptica
<b>M<sub>5</sub></b>	Bajos niveles en todo el cerebro.	Neuronas piramidales, materia negra, microglía	Post ->> Pre-sináptica

■ Localización Celular  
■ Localización Sináptica

**Figura 16: Cerebro y receptores muscarínicos.**

*Fuente: Ignacio Campo Palacio*

#### 1.2.4.1 PLASTICIDAD NEURONAL

La plasticidad cerebral se basa en la capacidad de regeneración, pudiendo ser anatómica o funcional, adaptándose a situaciones que hayan lesionado el SNC, es decir, es una adaptación funcional del SNC para minimizar los efectos de este tipo de alteraciones (C. Xu et al., 2016). Los mecanismos encargados de realizar este tipo de procesos pueden ser fisiológicos, bioquímicos e histológicos. Este proceso es común en la sinapsis neuronal, debido a que



durante el proceso se produce una plasticidad anatómica causada por la estimulación fisiológica y/o las condiciones del entorno, dando lugar a cambios morfológicos.

En cambio, la plasticidad axonal, es un acontecimiento propio o específico apreciable tras lesión, siendo más remarcable durante los primeros años de vida (primera infancia). Esto se puede observar en casos de parálisis cerebral en niños, produciéndose una compensación por parte del tracto contralateral o ipsilateral de la musculatura afectada por la lesión del tracto corticoespinal. De hecho, también se puede dar en épocas más tardías a la neonatal, pudiendo incluso darse en adultos.

La plasticidad presente en los axones y en las sinapsis tiene utilidad en la práctica debido a que el ciclo funcional es completado por la actividad de neurotransmisores específicos. Un ejemplo sería el sistema N-metil-D-aspartato (NMDA), que está compuesto por receptores propios del glutamato, concentrándose estos en la membrana de las sinapsis glutamatérgicas (X. Zhou et al., 2014; Y. Zhou et al., 2010). Además, este sistema toma participación en los mecanismos de facilitación intercortical y en los de aprendizaje y memoria, por ello su inhibición bloquea la capacidad del córtex cerebral (Shihabuddin et al., 2000). Los receptores NMDA se pueden encontrar expresados en los astrocitos, ya que son capaces de

manifestarlos, tal y como ocurre en las neuronas (M.C. Lee et al., 2010).

Actualmente, se sabe que los receptores inotrópicos del glutamato (NMDA y AMPA) se encuentran implicados en muchas patologías, como en el caso de la anoxia del tejido neuronal (J. M. Gutteridge & Halliwell, 1992; Rossi et al., 2000). En la anoxia del tejido neuronal se produce daño isquémico en las neuronas y las células gliales como consecuencia de la liberación de radicales libres neurotóxicos y del aumento de la inflamación. Hay varios procesos que se ven afectados por esta disminución energética, siendo estos el metabolismo celular (Könner & Brüning, 2011), las bombas iónicas y la capacidad neuronal de mantener un potencial de membrana en reposo. Esto conlleva a la producción de una despolarización, que tendrá como resultado el origen de potenciales de acción con la consiguiente liberación del glutamato desde las neuronas presinápticas a la hendidura, activándose los receptores NMDA y AMPA. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  se ocasionará por medio de los receptores NMDA y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, desembocando en una cascada de segundos mensajeros. Se produce daño celular o muerte neuronal porque la capacidad neuronal de realizar un mantenimiento del potencial de reposo se desvanece (Haines et al., 2015; Lujan et al., 2016). Los cambios neuroquímicos que aparecen tras la lesión (teniendo implicación en ellos el glutamato) son los

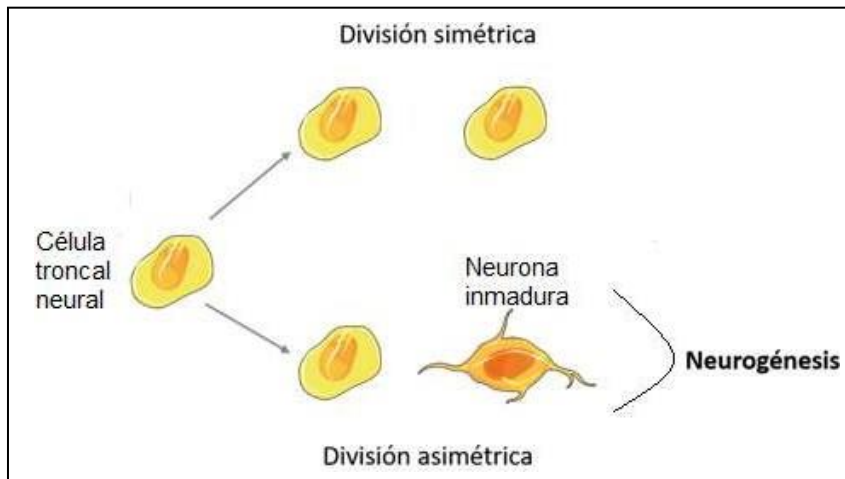
culpables de que se produzca una reversión del tono inhibitorio mediado por el sistema GABAérgico (GABA). Se ha observado que, a nivel farmacológico, se pueden proteger las regiones cerebrales dañadas por la interrupción del riego sanguíneo y la consecuente anoxia neuronal (hipocampo y núcleo estriado), mediante la aplicación de un agente bloqueante o antagonista del receptor de NMDA (Lujan et al., 2016).

El sistema colinérgico se encuentra relacionado tanto con el sistema glutamérgico, como con la morfogénesis cortical. Por otro lado, el sistema serotoninérgico, concretamente el receptor 5-HT<sub>2A</sub>, se encuentra presente en todas las neuronas corticales, relacionándose con la formación y mantenimiento de nuevas conexiones o sinapsis. Asimismo, la cifra de sinapsis producidas en la zona del hipocampo se ve reducida de una forma contundente. Esto se debe a la mengua de los niveles de serotonina y Ach. Por otra parte, la eficacia en la liberación de los neurotransmisores juega un papel importante en la plasticidad sináptica.

La sinapsina 1 (SYN1) es una fosfoproteína específica que interviene en la regulación de la liberación de vesículas de neurotransmisores. Su vía de fosforilación juega un papel crucial en la plasticidad sináptica, contribuyendo a la base celular del aprendizaje y la memoria.

En cuanto a la recuperación cerebral, tras daño causado por diferentes motivos como pueden ser la enfermedad del

Alzheimer o Parkinson entre otros, se produce un proceso fundamental denominado neurogénesis (Temple, 2001; Temple & Alvarez-Buylla, 1999) (Fig. 17).



**Figura 17: Neurogénesis.**

**Fuente:** <https://neuromexico.com/2020/09/17/que-es-la-neurogenesis-2/>

La recuperación producida por la neurogénesis tiene como pilar fundamental la capacidad de la glía, una vez dañada, para formar o generar señales que abran la puerta o no a este proceso de crecimiento axonal y de proliferación de células madre nerviosas (Rakic, 2002; Shihabuddin et al., 1997) (Fig. 18). Estas células pueden encontrarse en el hipocampo, más concretamente en las zonas ventricular y periventricular de los ventrículos laterales del hipocampo

(adyacentes al núcleo estriado) y en las zonas remanentes de la zona subgranular (Bernabeu-Zornoza et al., 2018) (Fig. 18).



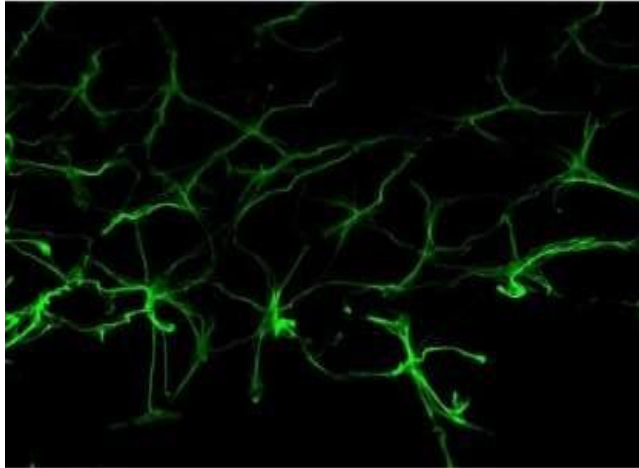
**Figura 18: Proceso de Neurogénesis en el hipocampo.**

*Fuente:* Camacho Ugarte et al., 2020.

#### 1.4.2 CÉLULAS GLIALES

Las células gliales son una población muy variada de células no neuronales encargadas de servir como soporte estructural y mantener un microambiente adecuado para el correcto desarrollo de las funciones neuronales. A diferencia de las neuronas, este tipo de células no propagan potenciales de acción ni poseen estructuras especializadas en recibir y enviar señales eléctricas. Suponen la mayor parte del sistema

nervioso y son necesarias para el funcionamiento cerebral (Haines et al., 2015) (Fig. 19).



**Figura 19: Astrocitos teñidos con GFAP (verde).**

**Fuente:** <https://www.ehu.es/SGIker/fotos/picture.php?/1436>

Las principales células gliales presentes en el SNC son los astrocitos, los oligodendrocitos (ambos derivados del neuroectodermo) y la microglía (derivada del mesodermo) (Ndubaku & de Bellard, 2008). La presencia del efecto de las caspasas inflamatorias puede inducir, tanto en la glía como en las neuronas, la producción de citocinas proinflamatorias como las interleucinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 y IL-16. Además, las rutas de muerte apoptótica también pueden ser suscitadas por la acción de estas caspasas (Becerra et al., 2009; King et al., 2017; Wei & Jonakait, 1999). Hay que añadir que, dentro del SNC, las células más abundantes son los astrocitos, seguido de las neuronas, la oligodendroglía y por último la microglía.

### 1.1.4.2 ASTROCITOS

Son un tipo de células gliales que presentan un gran número de ramificaciones, que pueden poseer dilataciones en sus prolongaciones, denominadas “*pies astrocíticos*”. Estas células sirven como revestimiento para la superficie de contacto presente entre el SNC y otros tejidos. Los “*pies astrocíticos*” perivasculares (“*pies chupadores*”) forman una capa que cubre cada vaso sanguíneo, separándolo del tejido nervioso (Fig. 20).



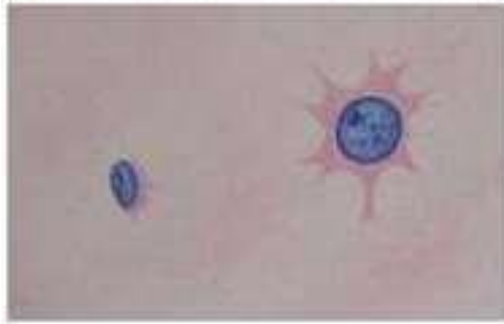
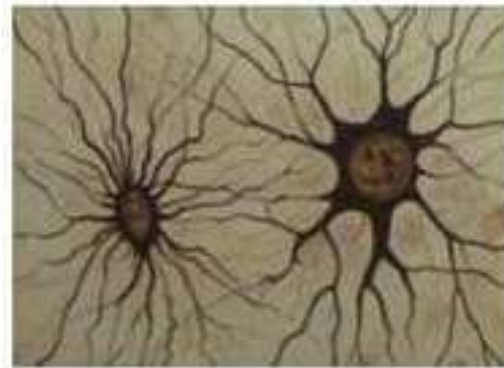
**Figura 20:** Astrocito emitiendo prolongaciones hacia los vasos sanguíneos.

**Fuente:** <https://mmegias.webs.uvigo.es/8-tipos-celulares/astrocito.php>

Existen dos tipos diferentes de astrocitos (Fig. 21), pudiendo ser astrocitos protoplásmicos (de la sustancia gris) o astrocitos fibrosos. Los astrocitos protoplásmicos presentan una simetría radial, mientras que los astrocitos fibrosos poseen prolongaciones en dirección de los tractos de la sustancia

blanca. Las principales diferencias manifiestas entre estos tipos de astrocitos se basan en que ambos poseen distintos canales iónicos, receptores de neurotransmisores y sistema de captación (Haines et al., 2015). Los astrocitos fibrosos presentan expresión elevada de GFAP y ramificaciones cortas. Por otro lado, se pueden observar procesos más largos, con formas más complejas y mucho más elaboradas en los astrocitos protoplasmáticos. Además, no emiten prolongaciones hacia los vasos sanguíneos, sino que se encuentran directamente en contacto con los vasos sanguíneos y con las neuronas adyacentes. Por otra parte, no suelen expresar niveles significativos de GFAP.





Astrocito Fibroso      Astrocito Protoplasmático

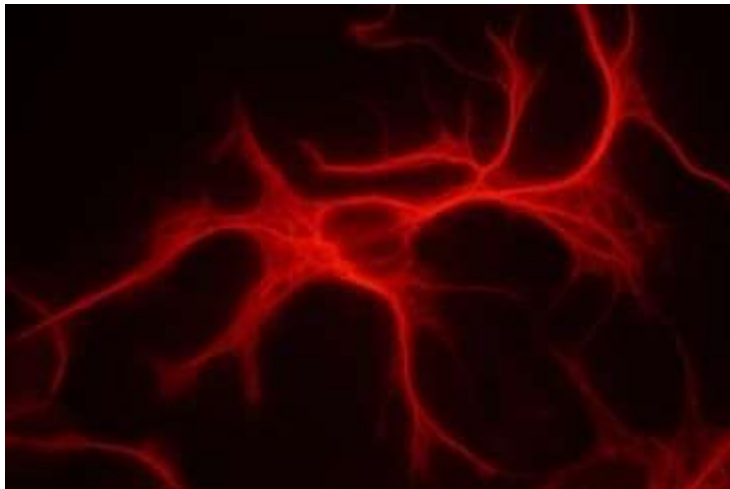
**Figura 21: Astrocito Fibroso y Protoplásmico.**

**Fuente:** [http://neurocirugiacontemporanea.com/doku.php?id=celula\\_glial](http://neurocirugiacontemporanea.com/doku.php?id=celula_glial)

Los astrocitos poseen una característica propia en su membrana celular, ya que solamente son permeables al catión  $K^+$ . Esto permite que sea captado muy fácilmente por los pies vasculares (“podocitos”), mediante la autorregulación del flujo sanguíneo cerebral, para evitar daños en las funciones neuronales causados por acumulación de este catión. Debido

al control que realizan sobre la cantidad de potasio libre que encontramos en el botón sináptico, los astrocitos desempeñan una función de control en la memoria y el aprendizaje.

Los astrocitos se comunican entre ellos y las otras células y sirven de soporte a otros tipos celulares como es la oligodendroglía. Es por ello entendible la existencia de gran cantidad de este tipo de células en el cerebro, respecto a las neuronas y otros tipos celulares (Fig. 22).



**Figura 22: Astrocito de un cultivo celular (tinción GFAP).**

**Fuente:** <http://www.wesapiens.org/es/search/?text=Astrocito+Fibroso>

Existe un proceso denominado “*buffer espacial of K<sup>+</sup>*”, que se basa en la posibilidad de los astrocitos de perder el K<sup>+</sup> que ha ganado con anterioridad en otra región. Esto es debido a que los astrocitos se encuentran unidos entre sí mediante

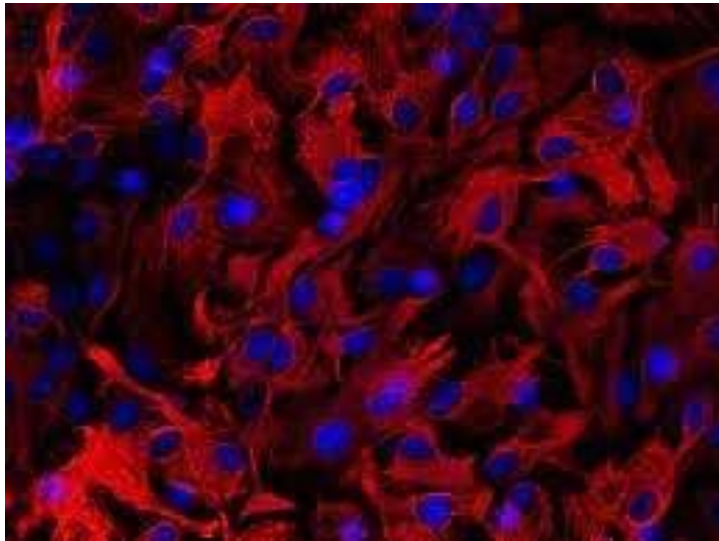
uniones estrechas, dando lugar a un extenso sincitio funcional entre ellos. El metabolismo de los neurotransmisores también corre a cargo de este tipo celular. Por este motivo, pueden terminar la acción o efecto postsináptico de estos neurotransmisores tras eliminarlos de la hendidura sináptica, gracias a la presencia de receptores, captadores y sustancias neuroactivas en sus membranas. Un ejemplo de este proceso puede ser el glutamato que puede ser captado e inactivado por los astrocitos, gracias a la enzima glutamina sintetasa, dando lugar a la glutamina, siendo esta liberada por el astrocito convirtiéndose de nuevo en glutamato en el interior neuronal (Fu et al., 2010; Haines et al., 2015; Perea & Araque, 2007).

Entre sus funciones, también se puede observar que los astrocitos son los encargados de colaborar en el establecimiento y mantenimiento de la barrera hematoencefálica (BHE). Para ello, participan en la regulación de la expresión y funciones de diversos transportadores endoteliales mediante interacciones con las células endoteliales. Entre estos transportadores se pueden encontrar el transportador de glucosa 1 (GLUT1), el transportador de aminoácidos neutros (LAT1) y el transportador de aminoácidos excitatorios 1-3 (EAAT 1-3) (Abbott et al., 2006).

Se conoce que algunos mediadores químicos influyen en la permeabilidad de la BHE, incrementándola. Entre estos mediadores encontramos el óxido nítrico (NO), el aspartato, el

glutamato, el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), el adenosín trifosfato (ATP), el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), la proteína inflamatoria de macrófagos-2 (MIP-2) o la interleuquina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) (Ballabh et al., 2004). Este incremento resulta fundamental a la hora de delimitar las áreas dañadas, pudiendo restablecer la actividad neuronal tras eliminar cuerpos apoptóticos y tóxicos como el Beta-amiloide (A $\beta$ <sub>1-42</sub>) en la EA (Barnum, 2002; Gasque et al., 2000; Nguyen & Gerlai, 2002; Wyss-Coray & Mucke, 2002). Cabe añadir que los astrocitos, en procesos patológicos, pueden segregar interleucitocinas, que son las encargadas de regular el funcionamiento de las células inmunitarias (Th1 y linfocitos T helper 1) que invaden al SNC, dando lugar a un proceso llamado “*gliosis reactiva*” o “*astrogliosis*”.

La existencia de la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) (Fig. 23), presente exclusivamente en los astrocitos, sirve como proteína marcadora para identificarlos mediante el uso de técnicas de inmunohistoquímica. Además, esta proteína se puede encontrar aumentada en diversos procesos patológicos (Eddleston & Mucke, 1993; Giaume et al., 2019; Haines et al., 2015).



**Figura 23:** Astrocitos. Inmunofluorescencias GFAP (rojo)+ DAPI (azul, tinción de núcleos).

**Fuente:** <http://www.histoemb.fmed.edu.uy/node/101>

La mayoría de los tumores presentes en el SNC son de origen astrocítico, el astrocitoma y el glioblastoma. Esto es a causa de que, en el cerebro adulto, los astrocitos son sensibles a cualquier cambio que pueda producirse en el control de la división celular, ya que estos conservan su capacidad proliferativa (Haines et al., 2015).

En la década de los 70, la incorporación de la timidina tritiada en el hipocampo se cuantificó en la región subventricular de los ventrículos laterales y la zona subgranular del giro dentado (Bernabeu-Zornoza et al., 2018; Gould et al., 1992; Sanai et al., 2004). Gracias a los descubrimientos

realizados por Altman y Das en la misma década (Das & Altman, 1970) se observó la formación de nuevas neuronas (neurogénesis) (Magavi et al., 2000).

La neurogénesis está regulada por el nicho celular, un microambiente especializado constituido por los astrocitos, las células endoteliales y las células pluripotenciales (Bernabeu-Zornoza et al., 2018; Horner et al., 2000). La proliferación de las células pluripotenciales y su posterior migración se encuentra modulada por los astrocitos, mediante la acción de factores de crecimiento y neurotrofinas (factores neurotróficos). La función de estos factores consiste en reprimir el inicio de la apoptosis por parte de las neuronas, como fue descrito por Levi-Montalcini en 1951 (Levi-Montalcini & Hamburger, 1951).

Las cascadas de señalización de crecimiento y diferenciación serán producidas por la unión de las neurotrofinas a dos tipos de receptores. Estos receptores pueden ser el receptor p75NTR (receptor de citocinas), relacionado con el TNF- $\alpha$  (Lorigados-Pedre & Bergado-Rosado, 2004), y/o los diferentes tipos de tirosinas quinasas (TrK: tropomyosin-related kinasa  $\rightarrow$  Trk<sub>A</sub>, Trk<sub>B</sub>, Trk<sub>C</sub>). Entre las neurotrofinas más destacadas se encuentran el factor de crecimiento neural (NGF, nerve growth factor), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, brain-derived neurotrophic factor) (P. Yang et al., 2008) que estimula la neurogénesis y desempeña un papel importante en el

desarrollo neurológico normal, las neurotrofinas (NT<sub>3</sub>, NT<sub>4</sub>, NT<sub>5</sub>) y específicamente el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor) (H. Song et al., 2002) que participa colaborando en la estimulación y control de la neurogénesis gracias a sus propiedades de neuroprotección (Bernabeu-Zornoza et al., 2018; Haines et al., 2015). Por otra parte, se ha demostrado la existencia de astrocitos GFAP positivos (del Moral et al., 1993; Zonta et al., 2003) que poseen características de células madre, pudiendo generar precursores neuronales (S. A. Azizi & Krynska, 2013; T. D. Palmer et al., 1997).

La intervención astrocítica en el proceso de protección cerebral se basa sobre todo en la inducción de los procesos inflamatorios (Karve et al., 2016). Si se produce una cronificación de este proceso, se produce como resultado un incremento en la liberación de sustancias proinflamatorias por la glía (Cuenca-López et al., 2010; Halaris, 2013; Kumar et al., 2013; Marchand et al., 2005; G. Ramesh et al., 2013). En este caso las neuronas activas tienen un efecto supresor sobre la activación de la glía, previniendo y limitando el desarrollo de la respuesta inflamatoria (Auld & Robitaille, 2003; Fields & Stevens-Graham, 2002; Nedergaard et al., 2002; Newman, 2003; Tsacopoulos & Magistretti, 1996; Zonta et al., 2003).

En conjunto, todos los estudios y evidencias apoyan la hipótesis de que los astrocitos tienen una participación

importante en la regulación de la neurogénesis (Kehl et al., 1997) y de los procesos sinápticos, incluyendo la transmisión sináptica (Bernabeu-Zornoza et al., 2018; Dodla et al., 2010; Guillamón-Vivancos et al., 2015; Parpura et al., 2012), a parte de su función como soporte estructural neuronal. Además, se pueden encontrar evidencias de que, en enfermedades neurodegenerativas como la EA o la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), las situaciones de estrés, depresión o falta de sueño dan lugar a una disminución de la neurogénesis. Prevenir la atrofia y muerte neuronal durante el desarrollo y la vida adulta por parte de los factores neurotróficos debe ser una de las prioridades (Bernabeu-Zornoza et al., 2018).

#### **1.2.4.2 OLIGODENDROCITOS**

Los oligodendrocitos son células más pequeñas que los astrocitos y que poseen núcleos irregulares teñidos, citoplasma con un abundante aparato de Golgi y un gran número de microtúbulos y mitocondrias. La función celular de los oligodendrocitos consiste en la producción y mantenimiento de la mielinización de los axones en el SNC (de una forma similar a las células de Schwann en los nervios periféricos), repartiéndose indistintamente entre la sustancia gris y la sustancia blanca (Del Rio-Hortega, 2012; Ndubaku & de Bellard, 2008; Ramón y Cajal, 1913). En la sustancia gris, se pueden encontrar situados alrededor de los somas neuronales, abarcando desde la parte inicial del axón hasta la rama



terminal. En cambio, en lo que respecta a la sustancia blanca, se encuentra rodeando algunos axones de forma que los aísla electroquímicamente (Fig. 24). Cabe añadir que este aislamiento no se produce de forma continua, sino que se localizan interrupciones llamadas “*nódulos de Ranvier*”.



**Figura 24: Oligodendrocito.**

**Fuente:** <http://neurocirugiacontemporanea.com/doku.php?id=oligodendrocito>

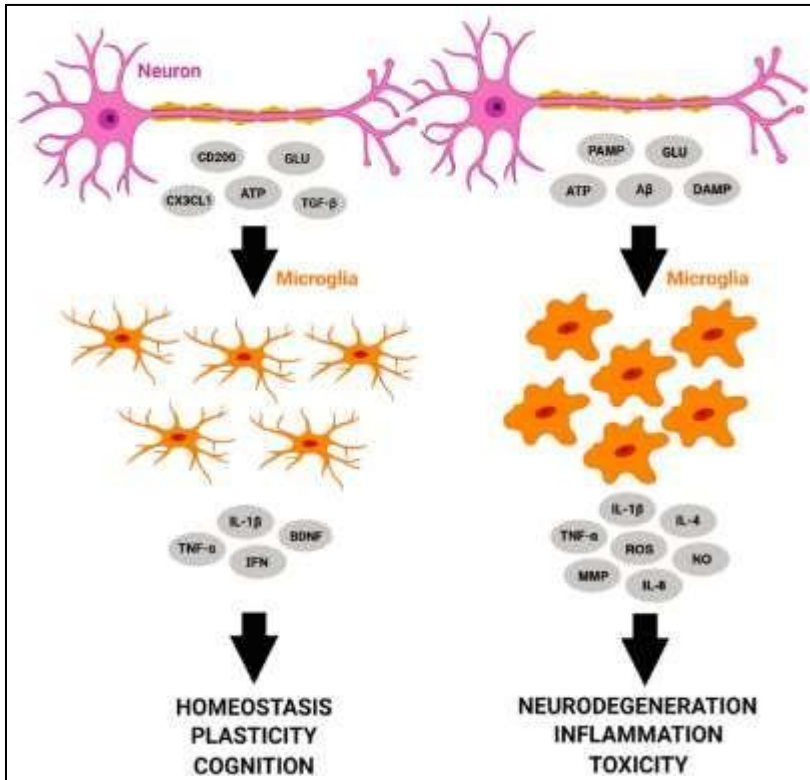
La velocidad de transmisión de los potenciales de acción entre las neuronas se ve incrementada por la presencia de la

vaina de mielina, es decir, su pérdida origina una disminución de la velocidad de transmisión de estos potenciales en el axón (Haines et al., 2015). Los axones desmielinizados son más vulnerables a procesos de apoptosis y necrosis debido a que presentan receptores de glutamato y baja resistencia al estrés oxidativo (Matute, 2007). Estos axones, que sobreviven un tiempo, pueden sufrir un proceso de remielinización ocasionado por el crecimiento de células precursoras de oligodendrocitos y la liberación de factores tróficos de neuronas y astrocitos (Barres et al., 1992; Fernández-Ruiz et al., 2000; Gard et al., 1995; Haines et al., 2015). El daño de estas células conlleva a la lesión o muerte en enfermedades desmielinizantes y neurodegenerativas como la esclerosis múltiple, la EA o la ELA (Compston & Coles, 2008; Losy, 2013; McDonald et al., 2001).

#### **1.3.4.2 MICROGLÍA**

Las células de la microglía (microgliocitos) son células inmunitarias efectoras o macrófagos del SNC (Fig. 25) (Gehrmann et al., 1995; Rock et al., 2004). Ante la aparición de una lesión, estas células pueden transformarse en macrófagos y migrar a la zona dañada, siendo activados para su proliferación y la fagocitación de residuos celulares (Davoust et al., 2008; Del Rio-Hortega, 2012; Haines et al., 2015). Se ha podido demostrar que, mediante la realización de estudios tanto in vitro como in vivo, se produce un incremento en los

canales de sodio dependientes de voltaje tras la aparición del daño, activando la microglía y ampliando la posterior respuesta inflamatoria (Cummins et al., 2007; Jung et al., 2013).



**Figura 25:** Respuesta de la microglía a diferentes moléculas liberadas por las neuronas.

**Fuente:** Augusto-Oliveira et al., 2019.

Los microglíocitos, una vez han sido activados, se encargan de actuar en respuesta a la inflamación mediante la secreción de citoquinas como la citocina IL1-β, el factor de necrosis tumoral (TNF-α) y las prostaglandinas (van Veen &

Chang, 1997) (Fig. 26). La glutamina adquirida por la neurona se libera al medio extracelular en forma de glutamato, siendo los astrocitos los encargados de su captación para producir la liberación de IL-6.



**Figura 26: Citocinas e inflamación.**

**Fuente:** <https://www.porcicultura.com/destacado/Neuroinmunoendocrinologia-del-estres%7CCitoquinas-%2528Parte-3%2529>

Entre las moléculas que son liberadas podemos encontrar algunas neurotóxicas, más concretamente, el glutamato y los radicales de oxígeno. Cuando IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  son liberados de manera excesiva, se produce una apertura de la BHE inducida por las células endoteliales. De esta forma, se produce la inflamación leucocitaria del parénquima cerebral, como es el caso de la meningitis bacteriana (Haines et al., 2015). En la figura 27, se indican las principales células gliales del SNC y sus principales funciones.



**Figura 27: Tipos de células gliales.**

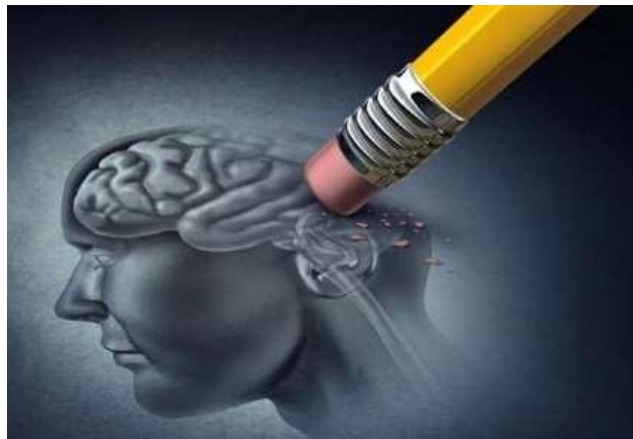
*Fuente: Ignacio Campo Palacio.*

La función cerebral se lleva a cabo de manera óptima gracias a las células de apoyo de las neuronas.

## 1.5 LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER (EA)

Como se ha comentado con anterioridad, el Alzheimer es un tipo de enfermedad neurodegenerativa que se encuentra presente mayormente entre la población anciana, afectando aproximadamente a unos 37 millones de personas a nivel mundial. Además, según diversos estudios, es esperable que se produzca un aumento de su prevalencia con el paso del tiempo, estimándose un aumento del 98% para el año 2040 dentro de los países desarrollados (Ferri et al., 2005). Cabe añadir que, a pesar de no conocer aún las causas de este motivo, la población femenina presenta un mayor riesgo a la hora de desarrollar esta enfermedad (K. Andersen et al., 1999; Di Carlo et al., 2002; Henderson, 2014). Entre los síntomas

iniciales que se pueden observar en la EA se encuentran cambios de humor y comportamiento, pérdida de la memoria, disfunción del lenguaje y desorientaciones a nivel espaciotemporal. Con el avance de la enfermedad se observa tanto deterioro cognitivo, como deterioro motor, desembocando en una incapacidad total de las funciones corporales (Selkoe, 1997) (Fig. 28).



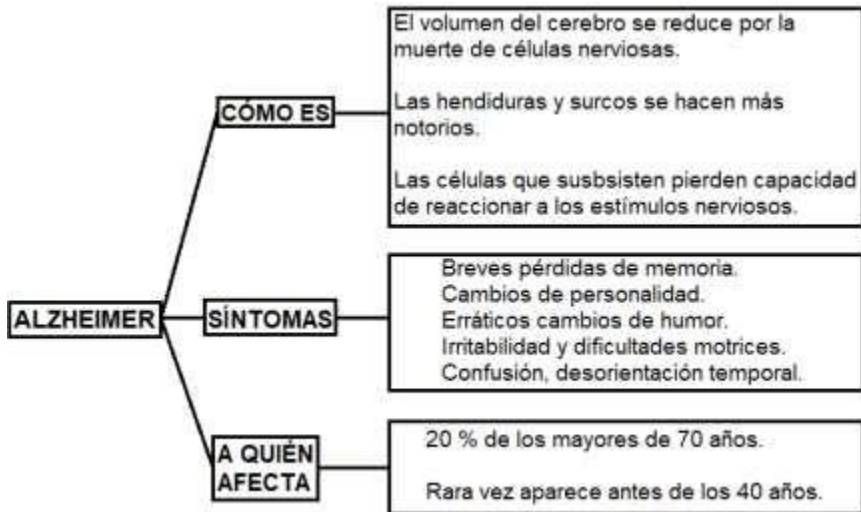
**Figura 28: Alzheimer y cerebro.**

**Fuente:** <https://www.infosalus.com/mayores/noticia-identifican-causa-progresion-alzheimer-cerebro-20211102071749.html>

Hay que tener en cuenta que, a nivel inmunohistoquímico, las características principales de esta enfermedad radican en la presencia de placas neuríticas y ovillos neurofibrilares. Se produce pérdida neuronal, deterioro de las conexiones sinápticas y gliosis reactiva, esta última causante de la

inflamación característica de la EA (Giulian, 1999; Wyss-Coray & Mucke, 2002).

Las zonas cerebrales a las que más afectan los cambios neuropatológicos son el hipocampo, la corteza entorrinal, la corteza cerebral y las estructuras subcorticales (Arnold et al., 1991). En la figura 29 se muestra de manera esquemática cómo es la enfermedad, qué síntomas presenta y a quién afecta.



**Figura 29: Enfermedad de Alzheimer.**

*Fuente: Ignacio Campo Palacio*

Esta enfermedad puede tener un desarrollo temprano o tardío. En caso de que se produzca tempranamente, se determina que es un Alzheimer familiar, con aparición

temprana (a partir de los 50 años) y con baja prevalencia (5%). El Alzheimer familiar se encuentra relacionado con un patrón de herencia autosómico dominante. En cambio, la variante de la EA tardía está ligada al envejecimiento con factores de riesgo como obesidad, diabetes, medio ambiente o alimentación y se manifiesta de forma tardía a partir de los 65 años (Blennow et al., 2006; Lindsay et al., 2002; Munoz & Feldman, 2000; Nussbaum & Ellis, 2003; Withers et al., 1998). A pesar de estas diferencias, en ambas se pueden observar cambios en la actividad de la proteína presenilina 1 (PSEN<sub>1</sub>) (Alzheimer's Disease Collaborative Group, 1995; Sherrington et al., 1995), de la presenilina 2 (PSEN<sub>2</sub>) (Levy-Lahad et al., 1995; Oshima & Schellenberg, 1996) y de la proteína precursora del amiloide (APP) (Goate et al., 1991; Mullan et al., 1992). Cabe destacar que, respecto al Alzheimer familiar, se localizan polimorfismos específicos de la apolipoproteína E (Hoenicka, 2006; Williamson et al., 2009). Estas mutaciones son las culpables de la presencia de cambios metabólicos a nivel celular, teniendo como consecuencia un mal procesamiento de la proteína precursora del amiloide (APP) (Bailey et al., 2011; Y. Deng et al., 2013), y desembocando en un aumento de la producción del péptido amiloide A $\beta$ <sub>1-42</sub>, y A $\beta$ <sub>1-40</sub>, precursores de las placas neuríticas presentes en la enfermedad de Alzheimer (Scheuner et al., 1996).



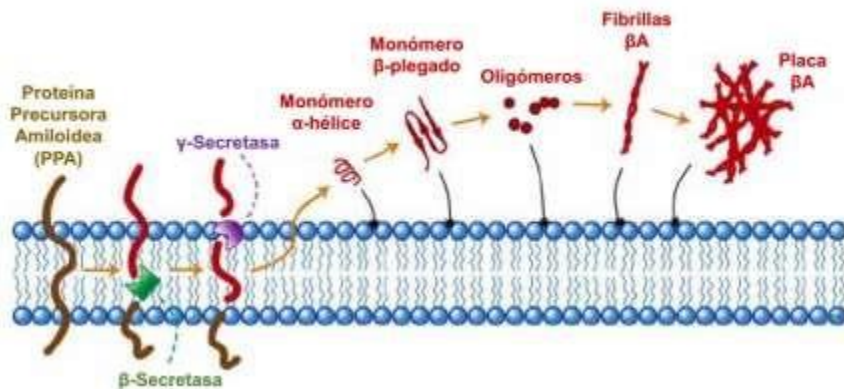
### 1.5.1 EL PÉPTIDO A $\beta$ Y SU SÍNTESIS

Respecto a las placas seniles, se pueden diferenciar tres tipos principales. Pueden ser placas difusas, es decir, depósitos de amiloide no fibrilar que no acostumbran a acarrear deterioro cognitivo, debido a que no provocan una respuesta glial ni el neuropilo (región entre somas neuronales) se ve afectado. En segundo lugar, encontramos las placas amiloideas, que son las que poseen un centro más o menos denso. En tercer lugar, están las placas compactas o neuríticas, que tienen naturaleza tóxica, siendo específicas de la EA. Estas últimas, no solo contienen placas neuríticas, sino también astrocitos y microglía activada (Cacabelos, 1999).

La naturaleza química de estas placas está formada de manera principal por un péptido de 1-40 a 1-42 aminoácidos. Esta información fue publicada en la década de los 80 (a mediados), denominándose primeramente A4 y, más tarde, péptido  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ). Este péptido, con peso molecular de 4 kDa, tiene una secuencia proteica primaria de 42-43 aminoácidos. Además, puede seguir la ruta secretora a la hora de producirse (retículo endoplasmático, aparato de Golgi y endosomas) o se puede introducir en las células gracias al receptor de lipoproteínas de baja densidad. Se puede ver la existencia de dos variantes distintas de este péptido, el A $\beta$ <sub>1-40</sub> y el A $\beta$ <sub>1-42</sub>, produciéndose como consecuencia del catabolismo de la APP mediante enzimas  $\beta$  y  $\gamma$ -secretasas. El más tóxico

de estas dos variantes es el  $A\beta_{1-42}$ , ya que da lugar al origen de agregados y placas de forma más sencilla que el  $A\beta_{1-40}$ .

El péptido  $A\beta$  se produce como resultado de la proteólisis secuencial de la APP mediante la actividad del complejo enzimático de las  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ - secretasas (Iida et al., 2002; J. Kang et al., 1987) (Fig. 30). La  $\alpha$ -secretasa pertenece a la familia de proteínas adamalislina o ADAMs (desintegrinas y metaloproteinasas) que incluyen entre otras la convertasa del factor  $\alpha$  de necrosis tumoral (Asai et al., 2003). La  $\beta$ -secretasa es una aspartil proteasa asociada a membrana, que actúa en el sitio  $\beta$  de la proteína APP (Farzan et al., 2000; Vassar, 2004). La  $\gamma$ -secretasa posee actividad catalítica modulada por los genes PSEN 1 y PSEN 2 (Kimberly et al., 2003) (Fig. 30).



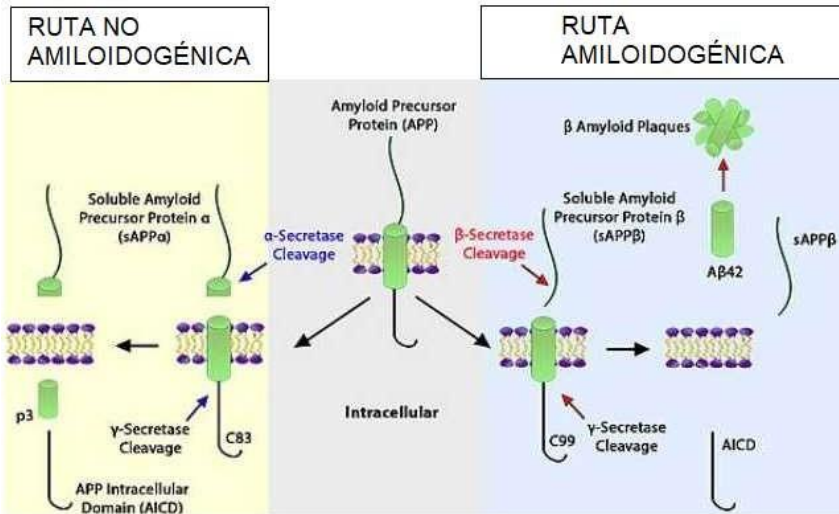
**Figura 30: Formación del péptido  $\beta$ -amiloide.**

**Fuente:** <https://www.bacon.com.ar/?seccion=detalleNovedad&id=18>

La APP, tras finalizar su síntesis en el retículo endoplasmático rugoso, continua hasta el aparato de Golgi, lugar donde se produce su glicosilación y su posterior empaquetado en vesículas de transporte. De esta manera, cruza el citoplasma insertándose en la membrana de la célula para ser procesada por el complejo enzimático  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -secretasas, siguiendo dos rutas (no amiloidogénica y amiloidogénica) (LaFerla et al., 2007). La primera ruta o ruta no amiloidogénica es la principal encargada del procesamiento de APP, excluyendo la producción de péptido  $\beta$ -amiloide gracias a la acción de la  $\alpha$ -secretasa, que previene la formación del péptido amiloide  $A\beta_{1-42}$  impidiendo la formación de los depósitos (Selkoe, 1991). En esta ruta se efectúa un corte entre los aminoácidos 687 y 688 (residuos 16 y 17 del péptido  $A\beta$ ) a cargo de la  $\alpha$ -secretasa. Esto da lugar a la secreción del dominio N-terminal, forma truncada de la proteína APP, denominada APP soluble  $\alpha$  (sAPP $\alpha$ ) (Allinson et al., 2003). La sAPP $\alpha$  se encuentra implicada en la sinaptogénesis (Morimoto et al., 1998), teniendo gran relevancia a la hora de formar y consolidar la memoria (Huber et al., 1993; Meziane et al., 1998) además de su almacenamiento (Roch et al., 1994). Por otra parte, también se origina un fragmento C-terminal de 83 aminoácidos, denominado como C83 o como  $\alpha$ -CTF, permaneciendo anclado en la membrana. Seguidamente, este fragmento se procesa a cargo de la enzima  $\gamma$ -secretasa, que

corta entre los aminoácidos 712, 714 ó 715 (residuos 40, 42 ó 43 del péptido A $\beta$ ), originando un pequeño péptido de nombre p3 (Haass et al., 1993) y un fragmento intracelular de APP conocido como AICD (APP Intracellular Cytoplasmic Domain) o como  $\gamma$ -CTF (Haass et al., 1993). En cambio, en la ruta amiloidogénica (también necesita la acción secuencial de dos proteasas) sí que se da la producción del péptido A $\beta$  (Haass, 2004). En primer lugar, la  $\beta$ -secretasa se encarga de realizar el primer corte en el extremo N-terminal del péptido A $\beta$  (entre aminoácidos 671 y 672), liberando el fragmento APP soluble  $\beta$  (sAPP $\beta$ ). Además, en este caso se genera un fragmento C-terminal de 99 aminoácidos, denominado C99 ó  $\beta$ -CTF (Vassar, 2001). Después de esto, el complejo  $\gamma$ -secretasa juega su papel al procesar el fragmento C99, dando lugar al péptido A $\beta$  y al fragmento  $\gamma$ -CTF (Gandy, 2005). Como resultado, en la ruta amiloidogénica se obtienen una especie de 40 aminoácidos denominado A $\beta$ <sub>40</sub> y una especie de 42 aminoácidos denominado A $\beta$ <sub>42</sub>. Se puede observar que, a pesar de que alrededor del 90 % de estas especies pertenece a la A $\beta$ <sub>40</sub> y de que ambas son neurotóxicas e insolubles, es el péptido A $\beta$ <sub>42</sub> el más propenso a la formación de placas amiloides debido a que se agrega con mayor facilidad (Iwatsubo et al., 1994). En condiciones normales los dos péptidos tóxicos se producen en muy bajos niveles. Se diferencian en dos aminoácidos, teniendo propiedades

fisicoquímicas muy diferentes. Respecto a  $A\beta_{1-42}$ , posee una tendencia a su polimerización, dando lugar al origen de oligómeros solubles, agregándose en protofibrillas que conforman la estructura terciaria de la hoja  $\beta$  plegada, característica de los péptidos amiloides. Además, la concentración de este péptido se encuentra muy regulada, con un equilibrio entre su génesis y su eliminación. De esto se encargan las enzimas degradadoras como la neprilisina, la enzima degradadora de insulina (EDI) y la enzima convertidora de la angiotensina I (ECA1) (Cacabelos, 1999). En pacientes con EA, se pueden encontrar estas placas presentes, estando implicadas desencadenando una cascada de procesos que acarrearán muerte neuronal masiva (Giulian, 1999) (Fig. 31).



**Figura 31: Procesamiento de la proteína APP.**

**Fuente:** <https://www.news-courier.com/neuroscience/product-news/amyloid-precursor-protein-and-detection-biolegend-284969>

### 1.5.2 ACTIVIDAD DEL β AMILOIDE

Esta actividad está relacionada con funciones de la proteína β-amiloide que no se encuentran asociadas a la enfermedad de Alzheimer. Entre estas funciones encontramos la protección contra estrés oxidativo (Baruch-Suchodolsky & Fischer, 2009; Zou et al., 2002), la regulación del transporte de colesterol (Igbavboa et al., 2009; Yao & Papadopoulos, 2002), actuando como un factor de transcripción (Maloney & Lahiri, 2011), la activación de quinasas (Bogoyevitch et al., 2004; Tabaton et al., 2010) y la actividad antimicrobiana especialmente asociada con su acción pro-inflamatoria (Moir & Tanzi, 2018; Soscia et al., 2010).

### 1.5.3 ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA B AMILOIDE

La proteína  $\beta$ -amiloide forma un conjunto de estructuras con conformación terciaria compacta. Por ello, la información que se tiene de esta proteína tiene como procedencia estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y de dinámica molecular, ya que no puede ser cristalizada. La información obtenida a partir de los modelos derivados de RMN muestra que esta proteína es un polipéptido que posee 26 aminoácidos, formado a partir de  $\beta$ -amiloide  $A\beta_{10-35}$ , sin una estructura secundaria significativa, pero mostrando una distribución en espiral (S. Zhang et al., 2000).

Asimismo, se ha demostrado a partir de ensayos de dinámica molecular que esta proteína se puede localizar en diferentes estados (M. Yang & Teplow, 2008). Cabe añadir que, según simulaciones realizadas mediante RMN, da la impresión de que las proteínas  $A\beta_{1-40}$  y  $A\beta_{1-42}$  poseen estados de conformación muy diferentes (Sgourakis et al., 2007) con el fragmento C-terminal de la  $A\beta_{1-42}$  siendo más estructurado que el de los fragmentos de la  $A\beta_{1-42}$ .

La información estructural, desde el punto de vista oligomérico, es aún escasa. Se pueden aislar los oligómeros en pentámeros (forma de disco de la proteína) si las condiciones son de baja temperatura y salinidad. Además, Ahmed y colaboradores vieron que son carentes de estructura

beta (Ahmed et al., 2010). En cambio, en presencia de detergentes parecen tener un contenido importante de láminas beta con caracteres paralelos y antiparalelos (L. Yu et al., 2009).

#### 1.5.4 ESTRATEGIAS CONTRA EL AMILOIDE

Dentro de las estrategias vigentes contra el amiloide, los investigadores apuntan las siguientes como las más recomendables (Citron et al., 1992; Essalmani et al., 1996):

- Inhibidores de  $\beta$ -secretasa: encargados de evitar la primera división de APP fuera de la célula.

- Inhibidores de  $\gamma$ -secretasa (semagacestat): frenan la producción de  $A\beta$  y de sus fragmentos tóxicos al inhibir la segunda división de APP en la membrana celular.

- Agentes reductores selectivos de  $A\beta_{1-42}$  (por ejemplo, tarenflurbil): son los encargados de regular la función de la  $\gamma$ -secretasa, reduciendo así la formación de  $A\beta_{1-42}$  y dando lugar a fragmentos más cortos de  $A\beta$ .

- Inmunoterapias: su papel consiste en incentivar al sistema inmune en el reconocimiento y eliminación del  $A\beta$ . Proveen de anticuerpos que evitan la deposición de la placa o que mejoran su eliminación.

- Agentes antiagregantes (De Felice et al., 2004; Lashuel et al., 2002) (apomorfina): juega su papel evitando la



acumulación de fragmentos del A $\beta$  o impidiendo su eliminación si ya se produjo una agregación previa (De Felice et al., 2004; Hanaki et al., 2018).

También, existen diversos suplementos de melatonina que se ha observado que podrían presentar eficacia frente a la proteína  $\beta$ -amiloide, ya que producen inhibición de la agregación del péptido tóxico (Lahiri et al., 2005; Pappolla et al., 1998; Wan et al., 2008). Hay que tener en cuenta que, si ya se han formado fibrillas u oligómeros de  $\beta$ -amiloide, la melatonina no consigue invertir esta situación. La melatonina sólo se relaciona con los dímeros del péptido  $\beta$ -amiloide soluble. Se ha sugerido que, según experimentos en ratones transgénicos, la administración temprana de la melatonina puede ser importante a la hora de prevenir o evitar el depósito de amiloide, pero no es eficaz una vez se ha producido su deposición, siendo ineficaz en el tratamiento de la enfermedad. Por otra parte, investigaciones realizadas recientemente refuerzan la relación entre la melatonina y la EA. Esto es así porque la hormona denominada orexina, inducida en estado de vigilia, tiene influencia en el péptido  $\beta$ -amiloide (J.E. Kang et al., 2009). Además, la melatonina puede influir en los niveles de colesterol, siendo capaz de enmendar ligeras elevaciones en su concentración, como se ha podido observar en experimentos realizados en animales. Es importante debido a que el colesterol es un factor de riesgo temprano en la

formación de placas de amiloide. Curiosamente, el cannabinoide HU-210 previene la inflamación promovida por  $\beta$ -amiloide (J.E. Kang et al., 2009), al igual que el cannabinoide Win (Aguirre-Rueda, Guerra-Ojeda, Aldasoro, Iradi, Obrador, Mauricio, et al., 2015).

### 1.5.5 MEDICIÓN DE LA PROTEÍNA $\beta$ AMILOIDE

Existen diferentes formas de medición de la proteína  $\beta$  amiloide:

- La prueba de ELISA consiste en un método altamente sensible basado en un inmunoensayo útil detectando  $\beta$ -amiloide. Para ello, es necesaria la ayuda de dos anticuerpos específicos que funcionan como marcadores.
- Mediante inmunomarcación se realiza la medición semicuantitativa del  $\beta$ -amiloide, estableciendo también su ubicación. La  $\beta$ -amiloide puede ser principalmente vascular o situarse en las placas seniles y vasculares.
- Compuestos por imágenes que de forma selectiva pueden unirse a  $\beta$  amiloide in vitro e in vivo (particularmente el Compuesto Pittsburgh-B, (BTA-1, un thioflavin). Al combinar esta técnica con imágenes PET resulta muy efectiva, utilizándose para áreas de imagen de los depósitos de placa en los pacientes con Alzheimer.

- Microscopía de fuerza atómica que tiene como finalidad visualizar superficies moleculares a escala nanométrica. Sirve para realizar la determinación del estado de agregación del  $\beta$ -amiloide in vitro (Rekas et al., 2007).
- Interferometría de polarización dual, es una técnica óptica que utiliza la medición del tamaño molecular y la densidad de las fibras alargadas para cotejar las primeras etapas de agregación del  $\beta$ -amiloide y la inhibición (Gengler et al., 2007).

### **1.5.6 TEORIAS DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Las principales teorías sobre el origen de la EA son:

#### **1.1.5.6 TEORÍA DEL PÉPTIDO B-AMILOIDE**

En el origen de la EA, existen vertientes del pensamiento científico que relacionan la influencia de un aumento de la producción del péptido  $\beta$ -amiloide con el desarrollo de la enfermedad. Esta suposición también se conoce como “la hipótesis de la cascada amiloide” (Hardy & Higgins, 1992), apareciendo los ovillos neurofibrilares como consecuencia del deterioro ocasionado por este péptido en las neuronas. El péptido tóxico  $\beta$ -amiloide, es decir, la forma oligomérica de este péptido, ha quedado demostrado mediante numerosos estudios de cultivo primario (Aguirre-Rueda, Guerra-Ojeda, Aldasoro, Iradi, Obrador, Ortega, et al., 2015; Valles et al., 2010) que resulta tóxico para las neuronas, ejerce efectos

tróficos sobre las células gliales y da lugar a la respuesta inflamatoria (no son subproductos de esta). En fases tempranas de la inflamación, se produce una mayor acumulación del péptido tóxico como consecuencia de la liberación de las citocinas, agravando el problema (Tuppo & Arias, 2005). En la actualidad, se ha podido comprobar que, la reacción inflamatoria en el cerebro de individuos que padecen Alzheimer es originada por el péptido tóxico  $\beta$ -amiloide. Además, se han detectado varios marcadores inflamatorios que se expresan de forma exacerbada en esta enfermedad (Walsh & Selkoe, 2007).

#### **1.2.5.6 TEORÍA DE LA PROTEÍNA TAU**

Según esta teoría, la causa de los daños neuronales corre a cargo de la hiperfosforilación de la proteína Tau, debido a que esta proteína se encuentra presente en los ovillos de degeneración neurofibrilar, constituyendo una de las características histológicas de la enfermedad. Se encuentran en el citoplasma formados por multitud de filamentos helicoidales que presentan características que difieren de los considerados normales, dependiendo de su cantidad a la hora de establecer la severidad de la patología. Esta proteína, que es una de las fundamentales, se localiza anormalmente fosforilada en los microtúbulos de la enfermedad de Alzheimer (Boutajangout & Wisniewski, 2014).

### **1.3.5.6 MUTACIONES GENES CROMOSOMAS 17 Y 21**

Existen mutaciones que pueden derivar en el desarrollo de la enfermedad, como mutaciones en el cromosoma 21 que afecten al gen de la proteína precursora amiloidea, siendo responsables del 5 al 20 % de los casos de enfermedad de Alzheimer familiar precoz. Esta proteína puede dar lugar al  $\beta$ -amiloide que es depositado en las placas seniles causando efectos tóxicos sobre las neuronas, al seguir la vía amiloidogénica durante su procesamiento. En cambio, en el cromosoma 17 se puede encontrar el gen encargado de codificar la síntesis de la proteína Tau, siendo que, mutaciones en este gen, afectan a esta proteína provocando su fosforilación irreversible y ocasionando una función anormal que favorecerá la autoagregación de los ovillos neurofibrilares. Existen muchos investigadores que consideran esta teoría como la más veraz, debido a que ha quedado demostrada la correlación entre lesiones patológicas e intensidad de la enfermedad con la presencia de ovillos neurofibrilares. La producción de una serie de procesos negativos como serían la disfunción sináptica, la inflamación glial, la hiperfosforilación y la agregación de Tau en ovillos neurofibrilares tendría como origen un desequilibrio entre la formación y la eliminación de  $A\beta$  y su posterior acumulación, desembocando en la muerte neuronal. La principal novedad de la hipótesis radicó en conferir

a la A $\beta$  un papel causal y muy importante sobre la vía de la proteína Tau, que sería un evento de naturaleza secundaria (Murray et al., 2009).

#### **1.4.5.6 TEORÍA VASCULAR**

Hace ya unos años, tras realizar unas investigaciones en ratas envejecidas sometidas a hipoperfusión cerebral crónica, se enunció la teoría vascular de la EA (De Jong et al., 1997), la cual ha ido ganando importancia en la actualidad hasta ser considerada como la más aceptada entre los autores. Es el pilar fundamental de un gran número de estudios de neuroimagen utilizados para analizar los cambios hemodinámicos cerebrales y, particularmente, la hipoperfusión que aparece en pacientes mayores con riesgo importante de desarrollar la EA. Por ello, la mayoría de neuroradiólogos consideran la alteración del riego sanguíneo como marcador biológico en la progresión del deterioro cognitivo leve que se detecta en fases tempranas de la enfermedad. De hecho, la hipoperfusión cerebral se ha convertido actualmente en un predictor preclínico decisivo a la hora de catalogar a los pacientes con alto o bajo riesgo a originar deterioro cognitivo, evaluando también la efectividad de las intervenciones terapéuticas. La investigación realizada en neuroimagen tiene como objetivo principal conseguir nuevas perspectivas para el incremento de la comprensión de esta patología, mejorando la calidad de vida de los pacientes. Estos métodos sirven para la

monitorización de la actividad cerebral normal y dañada, siendo técnicas muy potentes que tienen como función diagnosticar, cuantificar, pronosticar y predecir el deterioro cognitivo que se produce en estadios tempranos, incluso antes del desarrollo del Alzheimer. Además, las imágenes multimodales nos ofrecen nuevas ideas para el tratamiento y prevención del deterioro cognitivo leve en avanzada edad y un mejor entendimiento de la organización funcional y estructural del cerebro humano (Armstrong, 2013; Rentoumi et al., 2014).

#### **1.5.5.6 HÍGADO GRASO**

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD, por sus siglas en inglés) es la enfermedad hepática crónica más común, afectando al 25 % de la población mundial y se encuentra asociada con trastornos metabólicos con un mayor riesgo de demencia. Esto se debe a que, pacientes que desarrollan NAFLD presentan cognición deficiente, sugiriéndose un vínculo entre ellos. En la actualidad, existen multitud de estudios e investigaciones que han examinado el riesgo a desarrollar demencia en NAFLD, siendo que la principal hipótesis de su relación sería por vía vascular (Kjærgaard et al., 2021). Además, el riesgo de demencia puede aumentar aún más por enfermedades cardiovasculares (ECV), ya que estas afecciones a menudo son concomitantes, siendo las enfermedades cardiovasculares la principal causa de muerte en pacientes con NAFLD. Sin embargo, el posible

efecto conjunto de NAFLD y enfermedades cardiovasculares sobre el riesgo de demencia no se conoce bien (Shang et al., 2022).

#### **1.6.5.6 INSULINA**

A pesar de no conocer la causa y su relación, la presencia de diabetes en el organismo implica un mayor riesgo a la hora de desarrollar algún tipo de demencia o deterioro cognitivo, existiendo la hipótesis de que la alteración de la secreción de insulina es la responsable de esta asociación. Según diversos estudios realizados se pudo observar que una baja respuesta a la insulina está asociada a un mayor riesgo de desarrollar EA. De hecho, los resultados sugieren que la resistencia a la insulina se encuentra asociada con un peor procesamiento de la glucosa y un peor rendimiento de la memoria inmediata, siendo que podría aumentar el riesgo a desarrollar EA al alterar la forma en la que el cerebro emplea la glucosa (principal combustible cerebral). Además, la resistencia a la insulina aumenta el riesgo de ECV y derrame cerebral pudiendo dañar el corazón y los vasos sanguíneos. El daño producido en los vasos sanguíneos cerebrales podría contribuir también en el desarrollo de la enfermedad (Rönnemaa et al., 2008; Willette et al., 2015).



## 1.6 RITMOS CIRCADIANOS Y ALZHEIMER

Gracias a una publicación realizada en el año 2009, se pudo observar la existencia de una relación entre la formación del  $\beta$  amiloide y el ritmo circadiano<sup>5</sup>, siendo que su producción se ve incrementada cuando el individuo se encuentra en estado de vigilia y disminuida durante el sueño (J.E. Kang et al., 2009). Hay que tener en cuenta que, durante el estado de vigilia, la producción de orexina (neuropéptido) es imprescindible para que se produzca el ritmo circadiano del  $\beta$ -amiloide. En este artículo queda demostrado que se puede producir un depósito crónico del  $\beta$ -amiloide durante largos períodos de vigilia, es decir, podría derivar en el desarrollo de la EA (de forma hipotética) (J.E. Kang et al., 2009) (Fig. 32). Estos hallazgos han sido corroborados por recientes descubrimientos, en los cuales la privación crónica o excesiva de sueño está asociada con el inicio de Alzheimer.



**Figura 32: Ciclo circadiano.**

**Fuente:** <https://activepharmaceutica.com.br/blog/o-papel-do-ciclo-circadiano-na-homeostase-da-microbiota-intestinal>

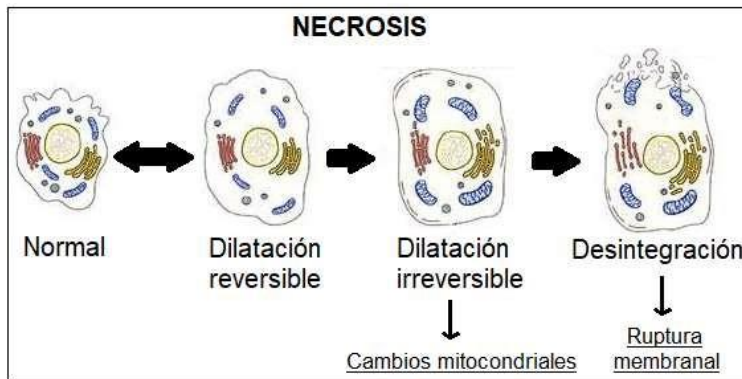
Existe un fenómeno conocido como fenómeno “crepuscular”, debido a que, en pacientes con EA que tienen placas amiloides en el hipotálamo, se produce una exacerbación de los síntomas al finalizar el día. Esto está relacionado con la melatonina, ya que tiene que ver con el mantenimiento del ritmo circadiano. El fenómeno “crepuscular” puede tener relación, de forma directa o indirecta, con el descubrimiento actual sobre el aumento continuo en la producción del  $\beta$ -amiloide durante el transcurso del día (comentado anteriormente) (Fig. 32).

## 1.7 MUERTE CELULAR

La muerte celular puede estar programada o ser accidental. La primera está regulada genéticamente y su fin es eliminar células dañadas o mutadas. Tanto el inicio como la ejecución de la muerte celular son procesos complejos y se clasifican según las formas de muerte celular dependiendo de las características bioquímicas y/o morfológicas.

### 1.7.1 NECROSIS

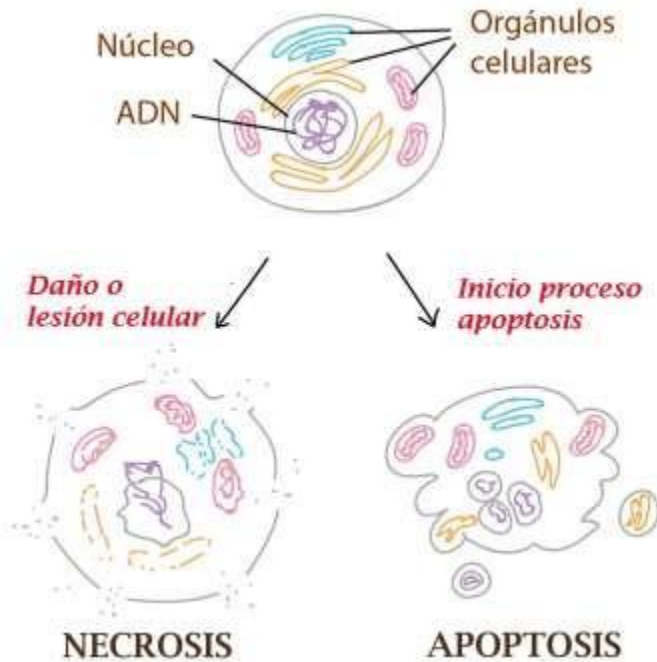
El término necrosis lleva implicado la ruptura de la membrana e hipoxia, dando lugar a procesos como la disminución del ATP, liberación de enzimas lisosomales, colapso metabólico, edematización y disolución de la célula, produciendo un proceso inflamatorio (Becerra et al., 2009) (Fig. 33).



**Figura 33: Proceso de necrosis.**

**Fuente:** modificado de <https://www.pinterest.es/pin/163748136435634874/>

Por el contrario, este proceso inflamatorio no se observa en la apoptosis, debido a que se produce la muerte celular sin romper su membrana (Xing et al., 2009) (Fig. 34).



**Figura 34: Diferencias principales entre necrosis y apoptosis.**

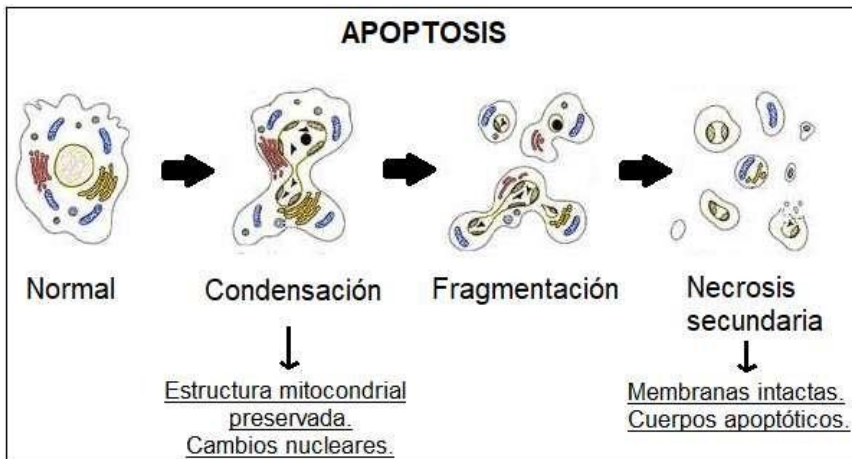
**Fuente:** <https://www.funeralnatural.net/articulos/la-velocidad-de-la-muerte-celular>

### 1.7.2 APOPTOSIS

El proceso de apoptosis fue inicialmente descrito por William Councilman en 1890 y, en el año 1914, Rober Schröder encontró la presencia de partículas con cromatina condensada en las glándulas endometriales, es decir, necrosis por

encogimiento. No fue hasta el año 1972 que el término apoptosis se acuñó para definir este proceso.

También se conoce como muerte celular programada, afectando generalmente a células de forma individual (más que a tejidos) y siendo una medida fisiológica para la renovación celular. Se encuentra bajo control genético y se caracteriza por el colapso celular, condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN (Fig. 35).



**Figura 35: Muerte por apoptosis.**

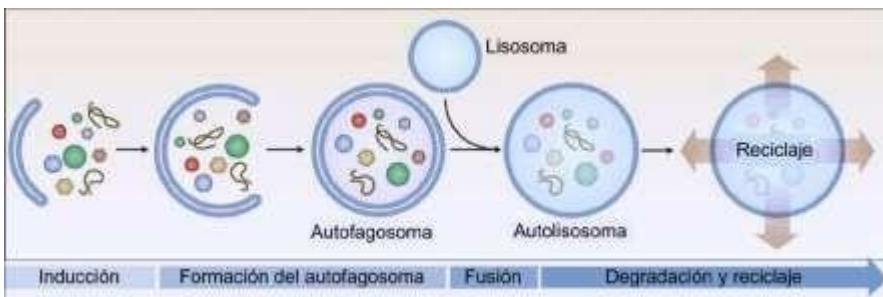
**Fuente:** modificado de <https://www.pinterest.es/pin/163748136435634874/>

Los macrófagos son los encargados de fagocitar las células en estado de apoptosis, para evitar la reacción inflamatoria por secreción de citocinas. De esta manera se mantiene la homeostasis tisular, asegurando el correcto estado de salud del organismo. Existe una diversidad de factores externos que pueden inducir este estado en el sistema nervioso

del adulto. Entre ellos encontramos isquemia, trauma, infecciones y enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson y Esclerosis Lateral Amiotrófica, entre otros. También son fundamentales en las interacciones entre las células del sistema vascular, glial y neuronal (Becerra et al., 2009; Ortega-Camarillo et al., 2001).

### 1.7.3 AUTOFAGIA

La autofagia o muerte celular autofágica (MCA) es un proceso por el cual se produce una vacuolización masiva del citoplasma, dando lugar a una acumulación de vacuolas autofágicas de doble membrana, sin condensación de cromatina y con una escasa o ausente captación por parte de los fagocitos in vivo (Fig. 36). Hay que tener en cuenta que este término solamente debería ser usado en caso de muerte celular por procesos autofágicos exclusivamente, es decir, que no haya implicación de la necrosis o la apoptosis.



**Figura 36: Proceso de autofagia.**

**Fuente:** <https://sebbm.es/acercate-a/autofagia-como-nuestras-celulas-se-reciclan/>

## 1.8 MUERTE CELULAR EN LA EA

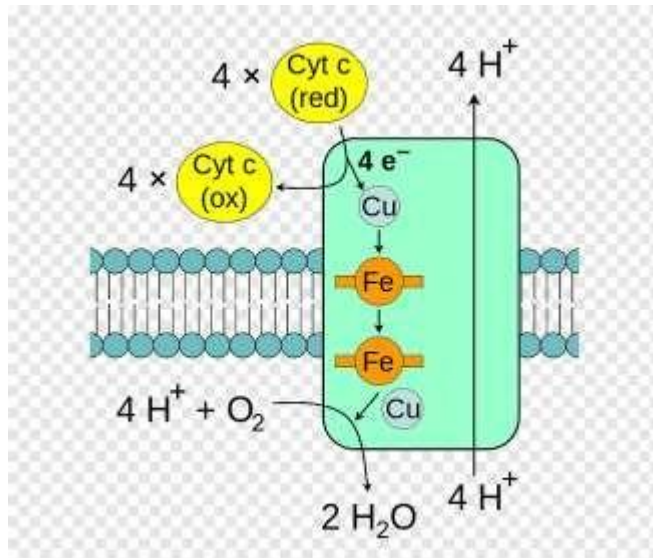
En las etapas de desarrollo del SNC, se puede observar la presencia de una tasa de muerte celular que se puede considerar patogénica, pero que es necesaria para su correcto funcionamiento a posteriori (Baehrecke, 2002). En cambio, si se produce este fenómeno en el SNC del adulto nos encontramos ante una enfermedad neurodegenerativa. El origen de esta muerte celular puede ser muy diverso, desde la pérdida de su correcta función, pasando por daño mecánico o infecciones por microorganismos o virus, hasta acción de tóxicos o falta de nutrientes. Independientemente de las causas, esta muerte celular es llevada a cabo por diferentes mecanismos fisiológicos como la apoptosis o la autofagia. Además, existe una tercera opción denominada necrosis, que es un proceso irreversible y sin control (Camins et al., 2008; Degterev & Yuan, 2008).

De las tres, las evidencias existentes relacionan la EA con el proceso de apoptosis, en el cual se da una condensación de la cromatina, con fragmentación del ADN y el núcleo celular, procesos que se pueden observar en esta enfermedad (además de depósitos de amiloide y de ovillos neurofibrilares) (Combs et al., 2001; Lassmann et al., 1995). También aparecen cuerpos apoptóticos (Lockshin & Zakeri, 2004) y activación de caspasas (Cribbs et al., 2004) en las neuronas con ovillos neurofibrilares (Su et al., 1994). Por otra parte,

mutaciones en las presenilinas causan que el déficit de factores tróficos o la presencia de factores de estrés provoquen una mayor vulnerabilidad en las neuronas a la apoptosis (Guo et al., 1997). En la vía extrínseca de la apoptosis, los receptores de muerte, que son receptores de membrana pertenecientes a la familia TNFR (receptores de la familia de tumor necrosis factor), son activados por agentes apoptóticos (Danial & Korsmeyer, 2004). En la vía intrínseca, también conocida como vía mitocondrial, en esta activación participan proteínas reguladoras de la familia Bcl-2, dando lugar finalmente, por parte de la mitocondria, al citocromo C (Fig. 37) y al AIF (factor inductor de apoptosis). De esta forma, se conforma el complejo apoptosoma y se activan las caspasas.

Estas vías se han relacionado, con el paso de los años, con patologías neurodegenerativas (Haass & Baumeister, 1999; Harada & Sugimoto, 1999; S. Zhang et al., 2000), jugando un papel protagonista el complejo IV, conocido como citocromo C oxidasa, al acoplar la oxidación del citocromo C con la reducción del O<sub>2</sub> a agua (Haass & Baumeister, 1999; S. Zhang et al., 2000) (Fig. 37).





**Figura 37: Complejo IV.**

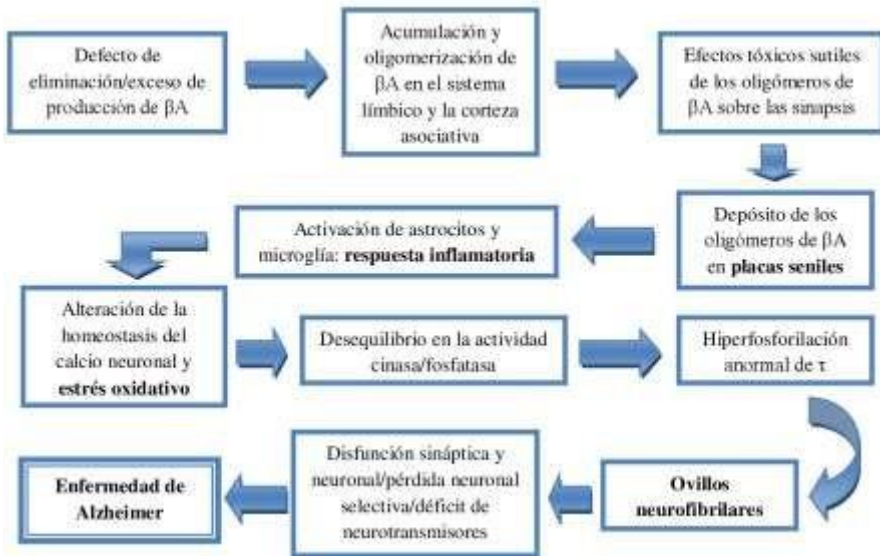
*Fuente:* <https://www.pngegg.com/es/png-efehe>

Existen estudios que también han relacionado enfermedades neurológicas y neurodegenerativas con los procesos autofágicos (Lockshin & Zakeri, 2004). Como quedó recogido por Yu y sus colaboradores en 2003, podría existir una fuente interna de A $\beta$  debido a la presencia de vesículas autofágicas de forma continuada. En ellas se puede encontrar APP y secretasas, pudiendo contribuir al aumento de los depósitos de A $\beta$  en la EA (W.-F. Yu et al., 2003). Además, diferentes autores en 2002 reflejaron que existe una relación entre autofagia y apoptosis, siendo que alteraciones en procesos autofágicos inducen la muerte por apoptosis en la EA

(Brunk & Terman, 2002; Tolkovsky et al., 2002). Cabe añadir que, cuando la vía de las caspasas y, por lo tanto, la muerte por apoptosis se encuentra inhibida, se produce una activación de una vía alternativa de muerte celular, la autofagia (Camins et al., 2008).

### **1.9 NEURODEGENERACIÓN EN LA ENFERMEDAD**

Se conoce la existencia de diversos procesos que desembocan en neurodegeneración, induciendo como consecuencia la muerte celular. Entre ellos encontramos la cascada A $\beta$ , la relación con el colesterol, la hiperfosforilación de TAU, el estrés oxidativo, la inflamación, los procesos de excitotoxicidad y de cambios en el ciclo celular (Neumann & Wekerle, 1998). Es importante debido a que estos mecanismos pueden perturbar las vías de señalización que participan en la muerte celular y la progresión del daño (Fig. 38).

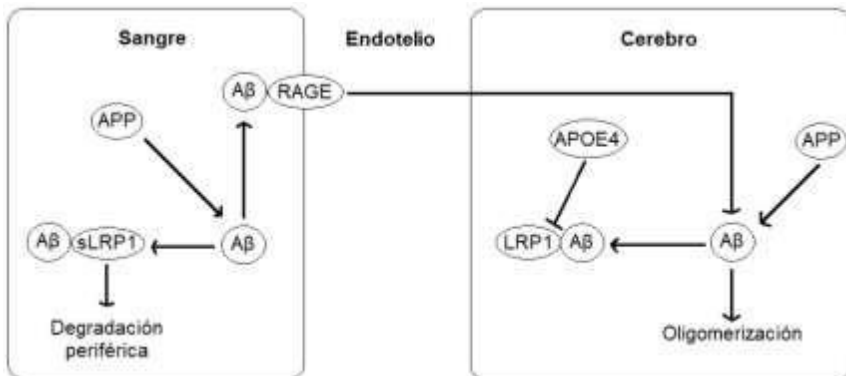


**Figura 38: Cascada amiloide en el Alzheimer.**

*Fuente: Serrano, 2015*

Entre el cerebro y la sangre se encuentra una relación necesaria para la alimentación y excreción de sustancias, ya que el cerebro necesita la glucosa (única fuente de alimentación) y oxígeno constante para realizar sus funciones básicas. Esta comunicación no se produce para proteínas grandes y complejas (como APP), debido a que son incapaces de cruzar la BHE. Si se producen daños en la BHE o no se ha desarrollado, proteínas como APP sí que pueden atravesar la BHE, ocasionando diversos efectos.

En cuanto al cerebro se refiere, la proteína APP puede dar lugar a un incremento del péptido tóxico A $\beta$ , produciendo su acumulación en forma de oligómeros. Esto provoca, a posteriori, la precipitación de esta proteína originando placas amiloideas. Por otra parte, la proteína A $\beta$  en sangre puede causar la destrucción del péptido tóxico por degradación periférica o acoplarse a la proteína RAGE, dando lugar a la entrada del péptido al cerebro con su consecuente agravamiento de la enfermedad (Fig. 39).

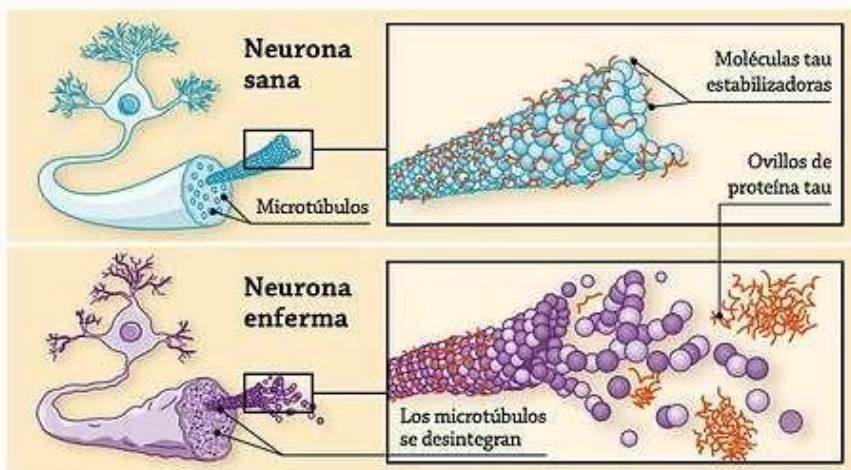


**Figura 39: Cerebro, endotelio, sangre y movimiento de A $\beta$ .**

**Fuente:** Ignacio Campo Palacio

La muerte neuronal causada por depósitos del péptido A $\beta_{1-42}$  puede deberse a diferentes mecanismos, entre los que destacan la hiperfosforilación de la proteína TAU y la reacción inflamatoria local. En el interior neuronal se puede localizar la proteína TAU, que forma parte del citoesqueleto celular y

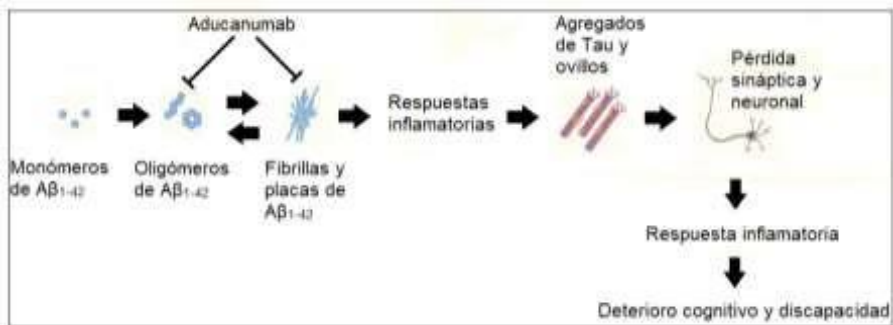
asume el papel del transporte de sustancias tróficas y neurotransmisoras, debido a su carácter microtubular. Esta proteína está hiperfosforilada en la EA, causando una disrupción de la proteína, con un cambio conformacional, imposibilitando la realización de sus funciones. Esto produce que la célula sea incapaz de alimentarse y de distribuir tanto los nutrientes como la energía (LaFerla & Oddo, 2005), ya que en vez de formar túbulos regulares pasa a constituir ovillos neurofibrilares enmarañados, siendo imposible realizar el transporte a través del axón (Fig. 40).



**Figura 40: Proteína TAU.**

**Fuente:** <http://residenciafontpineda.com/envejecimiento-activo-el-cerebro/>

El péptido  $A\beta_{1-42}$  también puede acumularse en la neurona produciendo agregación de su forma monomérica a oligomérica pudiendo ocasionar la hiperfosforilación de TAU y su consecuente pérdida de funcionalidad neuronal (sináptica y comunicativa). Además, este hecho afecta también a las mitocondrias, causando la pérdida de su funcionalidad, presentando una clara pérdida de la comunicación sináptica (disminuyendo esta de manera acumulativa) con disfunción en la homeostasis del calcio (LaFerla et al., 2007) (Fig. 41).

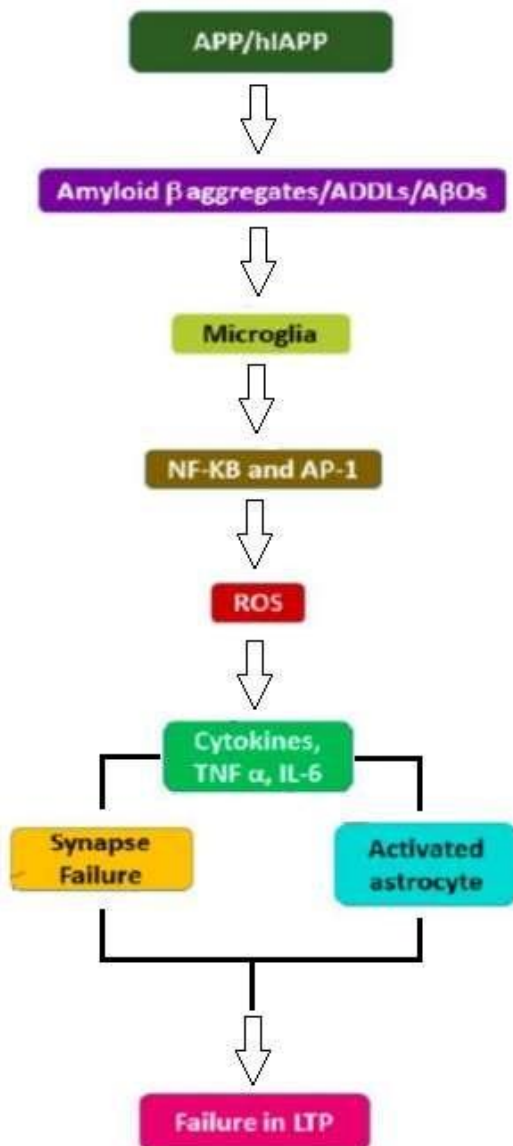


**Figura 41: Hiperfosforilación de la proteína TAU.**

**Fuente:** <https://www.savatnet.cl/cienciaymedicina/progresosmedicos/ataque-sobre-peptidos-amiloides-para-el-alzheimer.html>

Los astrocitos y la microglía juegan un papel significativo a la hora de producir una reacción inflamatoria local, con un aumento en las proteínas proinflamatorias (IL-1 y TNF- $\alpha$ , por ejemplo) y en el estrés oxidativo al liberar sus especies reactivas (Mrak & Griffin, 2005), activándose receptores como

los tipo Toll (Akira & Takeda, 2004). Estos procesos inflamatorios pueden derivar en modificaciones de la neurotransmisión, causando muerte neuronal e imposibilidad a la hora de realizar la sinapsis entre ellas (Wyss-Coray & Mucke, 2002) (Fig. 42). Además, se puede producir la inducción de citocinas pro-apoptóticas (IL-1, TNF- $\alpha$ , TRAIL o FasL, entre otras) durante este mecanismo, dando lugar a la apoptosis en neuronas degeneradas que expresen el receptor de muerte correspondiente. Como los receptores de muerte también pueden expresarse en células normales del parénquima cerebral, puede provocarse un riesgo mayor de aparición de neurotoxicidad (Wyss-Coray, 2006) (Fig. 42). Cabe añadir que los astrocitos y la microglía contribuyen a la eliminación mediante fagocitosis del tejido dañado por apoptosis (Lööv et al., 2012).



**Figura 42: Neurotoxicidad celular.**

**Fuente:** Ignacio campo Palacio desde [https://dspace.uib.es/xmlui/bitstream/handle/11201/149858/Marcos\\_Cantarero\\_JC\\_arlos.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://dspace.uib.es/xmlui/bitstream/handle/11201/149858/Marcos_Cantarero_JC_arlos.pdf?sequence=1&isAllowed=y)



En la actualidad, la opinión existente en relación con la muerte celular es que, la hiperfosforilación de la proteína Tau junto con la inflamación causada por la presencia del péptido A $\beta$ , juegan un papel protagonista en este proceso (LaFerla et al., 2007; LaFerla & Oddo, 2005). Mediante el uso del diagnóstico por imagen en estudios sobre la EA, se ha podido observar que el péptido tóxico A $\beta$ <sub>1-42</sub> es uno de los posibles culpables del proceso inflamatorio, pudiendo dar lugar a la activación de la microglía y los astrocitos (Eikelenboom & van Gool, 2004; Rothstein et al., 1996; X. Zhu et al., 2004). Este proceso inflamatorio se realiza en dos fases, empezando por liberar mediadores proinflamatorios debido a la inflamación. De este modo, se inhibe la proliferación de agentes tóxicos protegiendo las células que presentan daños (Allan & Rothwell, 2001, 2003). Durante la segunda fase, se observa una mayor agresividad debido a la prolongación y aumento en cantidad de los mediadores proinflamatorios, que acaban destruyendo las células con el consecuente aumento de la neurodegeneración detectada en la EA (Strohmeyer & Rogers, 2001).

Ha quedado evidenciado en estudios epidemiológicos y en modelos experimentales de Alzheimer (Griffin & Mrazek, 2002; Sala et al., 2003) que, en el cerebro, se produce un incremento de sustancias proinflamatorias como la IL-1 $\beta$  o el Factor de Crecimiento Transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y de COX-2 (Luterman et al., 2000), siendo estas sustancias que ayudan al avance de

la enfermedad. Además, se ha podido observar que el proceso degenerativo que encontramos en estos pacientes puede ser reducido mediante el uso de terapias con antiinflamatorios (Dzenko et al., 1997; Hüll et al., 1999; McGeer et al., 1996; Rogers et al., 1993; Z.-Y. Zhang et al., 2013). En principio, estos datos expresan que el daño que aparece en las neuronas podría no estar causado por el acúmulo de A $\beta$  (teniendo efectos neuroprotectores en un inicio, pero efectos neurodegenerativos de forma crónica), sino por el proceso inflamatorio cerebral (Wyss-Coray et al., 2002). En esta segunda fase de la EA, además de producir y liberar moléculas proinflamatorias se provoca una sobreactivación de las células gliales alrededor de las placas amiloideas por su exposición al tóxico A $\beta_{1-42}$  (Liu & Hong, 2003). Las sustancias proinflamatorias producen un incremento en la sensibilidad neuronal a radicales libres, ayudando al avance del daño (Combs et al., 2001) y disminuyéndola expresión de proteínas antiinflamatorias (Aguirre-Rueda, Guerra-Ojeda, Aldasoro, Iradi, Obrador, Mauricio, et al., 2015; Aguirre-Rueda, Guerra-Ojeda, Aldasoro, Iradi, Obrador, Ortega, et al., 2015). Todo esto demuestra la importancia que posee el proceso inflamatorio en la progresión de esta enfermedad.

Si se origina una descompensación en el equilibrio redox aparece el estrés oxidativo en las células, presentando un aumento de los niveles de radicales libres y especies reactivas

de oxígeno (ion superóxido ( $O_2^-$ ), hidroxilo ( $OH^\bullet$ ) y óxido nítrico ( $NO^\bullet$ ), entre otros) (Ghosh et al., 2012). Cuando esto se produce, la defensa antioxidante se ve insuficiente a la hora de regular esta descompensación, lo que desemboca en el daño y muerte neuronal (J. M. C. Gutteridge & Halliwell, 2010), consecuencias que pueden ser leves o crónicas (Trushina & McMurray, 2007). Esto es importante ya que el equilibrio puede ser restablecido por el sistema antioxidante a nivel agudo, pero, si la descompensación se cronifica, se producen alteraciones metabólicas con consecuencias como la rotura de moléculas de ADN (Iida et al., 2002; Mecocci et al., 1994), el incremento del calcio intracelular (Abeti & Duchen, 2012; S. Yamamoto et al., 2007), el daño en transportadores de membrana celular (Abeti & Duchen, 2012) y el daño a proteínas y/o peroxidación de lípidos (Jiménez-Jiménez et al., 2006) (Fig. 43). En estas alteraciones se puede observar que el estado oxidativo, la edad, la nutrición y los factores genéticos del individuo influyen (Jayasena et al., 2013; Novo et al., 2013; Z.-Y. Zhang et al., 2013), estando presente este desequilibrio en varias enfermedades neurodegenerativas (incluyendo la EA) (Costacou et al., 2013; Jiménez-Jiménez et al., 2006; Quintanilla et al., 2012; Yan et al., 2013) (Fig. 43).

El incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno y radicales libres por parte de las células gliales (Gubandru et al., 2013; Jiménez-Jiménez et al., 2006; Phillips

et al., 2014; Sutherland et al., 2013) conlleva la disfunción mitocondrial (Abeti & Duchon, 2012; Lesnefsky et al., 2001; Reddy & Beal, 2008) y la disminución en los niveles de glutatión (GSH) (Abeti & Duchon, 2012; Johnson et al., 2012).



**Figura 43: Estrés oxidativo.**

**Fuente:** <https://www.institutovalencianodeozonoterapia.com/estres-oxidativo/>

El estrés oxidativo posee diversas rutas o mecanismos que derivan en el daño y la muerte celular, entre los que destacan la peroxidación lipídica, la oxidación de proteínas y la oxidación de ADN (Halliwell, 1992; Halliwell et al., 1992; Jiménez-Jiménez et al., 2006; Reiter, 1995). Por un lado, en modelos de estudio animal sobre la EA, se ha evidenciado que la formación de placas amiloideas es posterior a la

peroxidación lipídica (Praticò et al., 2001). Por otro lado, en los estudios realizados en humanos, se ha demostrado la existencia de un incremento de los marcadores de peroxidación lipídica en sujetos con Alzheimer, destacando principalmente este proceso en el córtex temporal y en el hipocampo. Entre estos marcadores encontramos las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y malonil-dialdehído (MDA) (Karelson et al., 2001; Lovell et al., 1995; Marcus et al., 1998; A. M. Palmer & Burns, 1994; W.-F. Yu et al., 2003), 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) (Götz et al., 2002; Markesbery & Lovell, 1998; Sayre et al., 1997) y algunos isoprostanos (Pratico et al., 1998). Entre estas sustancias, algunas son capaces de alterar estructuralmente la apolipoproteína E3 (apoE3), modificando también su metabolismo (Montine et al., 1996). En los pacientes de este tipo se observa, adicionalmente, un acúmulo de proteínas oxidadas (Carney et al., 1994) con incrementos significativos de marcadores biológicos (contenido de proteínas carbonilo fenilhidracina-reactiva, actividad de la glutamina sintetasa (GS) y creatina quinasa (CK)) (Hensley et al., 1995) y posible aumento en la peroxidación lipídica por acumulación de productos finales de glicación proteica (Gasic-Milenkovic et al., 2003; Shuvaev et al., 2001) y carbonil-reductasa (Balcz et al., 2001). El estrés oxidativo es el culpable de la aparición de daño en el ADN en zonas cerebrales (relacionado con las fases tempranas de la EA) (Gabbita et al., 1998; Iida et al., 2002;

Lyras et al., 1997; Nunomura et al., 2001). Además, provoca un aumento en la expresión génica de ERCC-80 y 89 (relacionados con la actividad reparadora del ADN) (Love et al., 1999; Yuan et al., 2001), que podría ser una respuesta al daño oxidativo (Hermon et al., 1998). Estos resultados indican que el estrés oxidativo tiene una función esencial en el desarrollo y la evolución de la enfermedad de Alzheimer.

### **1.10 TRATAMIENTOS PARA LA EA**

Como ya vimos, estudios realizados sobre epidemiología y también en modelos experimentales (Griffin & Mrak, 2002; Sala et al., 2003) demuestran un aumento significativo de sustancias proinflamatorias en el cerebro en la EA, como IL-1 $\beta$ , el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y COX-2 (Luterman et al., 2000). Este incremento promueve el progreso de la enfermedad mientras que el tratamiento con antiinflamatorios puede disminuir el proceso neurodegenerativo que afecta a estos pacientes (Dzenko et al., 1997; Hüll et al., 1999; McGeer et al., 1996; Rogers et al., 1993; Z.-Y. Zhang et al., 2013). Estas moléculas potencian la progresión del daño al aumentar la sensibilidad de las neuronas a los radicales libres (Combs et al., 2001). Por lo tanto, tratamientos donde se regula el nivel de inflamación cerebral podrían ayudar a la contención del desarrollo de la enfermedad.

Otras aproximaciones para controlar la enfermedad han sido dirigidas al control oxidativo producido de manera clara en dicha enfermedad. Cuando se pierde el equilibrio de óxido-reducción se produce un estrés oxidativo, caracterizado por elevación de los radicales libres y de las especies reactivas de oxígeno que no puede ser compensado por los sistemas de defensa antioxidante, conduciendo al daño y muerte celular. Estas alteraciones pueden ser reversibles o no y esto depende del estado oxidativo, de la edad y estado nutricional del individuo y de factores genéticos (Halliwell et al., 1992; Jayasena et al., 2013; Novo et al., 2013; Z.-Y. Zhang et al., 2013). Este desequilibrio es característico de muchas enfermedades neurodegenerativas (Costacou et al., 2013; Halliwell et al., 1992; Quintanilla et al., 2012) incluida la enfermedad de Alzheimer (Jiménez-Jiménez et al., 2006; Quintanilla et al., 2012; Yan et al., 2013). La presencia de moléculas proinflamatorias inducidas por  $A\beta_{1-42}$  en la enfermedad de Alzheimer estimula la producción de especies reactivas de oxígeno y radicales libres por las células gliales (Gubandru et al., 2013; Jiménez-Jiménez et al., 2006; Phillips et al., 2014; Sutherland et al., 2013) responsables de la disfunción mitocondrial (Abeti & Duchon, 2012; Lesnefsky et al., 2001) y de la reducción de los niveles de glutatión (GSH) (Abeti & Duchon, 2012; Johnson et al., 2012). Los mecanismos de daño y muerte ocasionados por el estrés oxidativo son, la

peroxidación lipídica, la oxidación de proteínas y la oxidación de ADN (Halliwell, 1992; Halliwell et al., 1992; Jiménez-Jiménez et al., 2006; Reiter, 1995).

Tanto el estrés oxidativo como la inflamación son mecanismos desencadenantes de la patología de esta enfermedad por lo que tanto su estudio como sus posibles interacciones, pueden contribuir al desarrollo de nuevas terapias farmacológicas en el tratamiento del Alzheimer. Desde el punto de vista no farmacológico, diversas estrategias se han considerado beneficiosas en cuanto a la mejora del bienestar y calidad de vida de los pacientes (de Sant'Anna & Morat, 2013; Guétin et al., 2009; Olazarán et al., 2004; S. Ramesh et al., 2018). Maniobras como la musicoterapia, fisioterapia, psicomotricidad, cuidados básicos, terapia ocupacional, laboraterapia, terapia con animales y la psicoestimulación cognitiva se consideran herramientas muy útiles encaminadas a ejercitar y reforzar capacidades cognitivas que todavía preserva el paciente de Alzheimer sin pretender recuperar las que ya se han perdido (de Sant'Anna & Morat, 2013; Guétin et al., 2009; Olazarán et al., 2004).

En la actualidad, no existe una cura para la enfermedad de Alzheimer y su progreso tampoco puede ser desacelerado. El uso de fármacos como terapia se ha dirigido a retrasar y controlar los síntomas con el fin de mejorar la calidad de vida y el bienestar de los pacientes, pero con nula efectividad.



Además, existen multitud de efectos secundarios que presentan estos medicamentos. En los últimos años se han intensificado las investigaciones para el estudio de los efectos acaecidos en la enfermedad como el uso de neuro protectores antioxidantes y antiinflamatorios. También el uso de compuestos naturales basados en el control nutricional por plantas sobre diferentes vías de señalización asociadas a la inflamación y al estrés oxidativo.

### **1.11 EXPERIMENTACIÓN ANIMAL**

La experimentación animal es un método científico que emplea animales para la realización de experimentos científicos. Esta metodología se recomienda usar exclusivamente si no existen alternativas con la misma evidencia científica, es por ello que es necesaria una aprobación previa del proyecto por parte del Comité de Ética correspondiente (según RD 53/2013). Entre otras cosas, se valoran las condiciones del experimento que se va a llevar a cabo, que no haya alternativas adecuadas o que los animales no vayan a sufrir innecesariamente (solo se podrán utilizar animales cuando su uso esté justificado por la finalidad que se persigue, valorando su oportunidad siempre en términos de sus potenciales beneficios) (Fernandes & Pedroso, 2017) (Fig. 44).



**Figura 44:** Aspectos éticos e importantes a considerar en investigación con animales.

*Fuente:* Ignacio Campo Palacio.

En la experimentación animal se emplean animales para la investigación básica, como los estudios de comportamiento y genética, mientras que otros ensayos con animales se lleva a cabo en beneficio de los seres humanos. En la actualidad la experimentación animal sigue desempeñando un papel de primer orden en muchos ámbitos como agroalimentación, biotecnología, sanidad o investigación genómica (Fernandes & Pedroso, 2017).

### 1.11.1 EXPERIMENTACIÓN CON RATONES

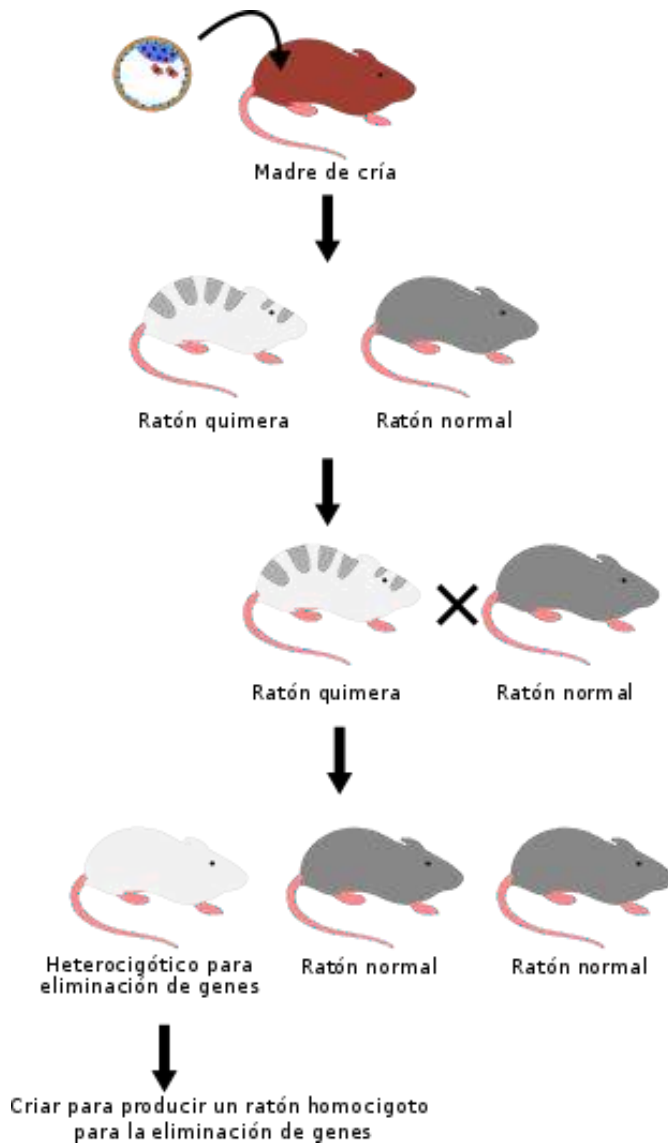
Según el tipo de estudio o los objetivos de interés al realizar los experimentos, se pueden utilizar diferentes tipos de animales, pero, principalmente, se utilizan los ratones (M. L. Andersen & Winter, 2019).

Un ratón de laboratorio es un roedor, usualmente de la especie *Mus musculus*, que se utiliza para la investigación científica. Entre otras características, el ratón de laboratorio es el modelo biológico más utilizado en investigación debido a su fácil manejo, alto número de crías, breve periodo de gestación y no requieren demasiados cuidados (García Jordá, 2010). En la actualidad se utilizan ratones que se han manipulado genéticamente. Los modelos de ratón transgénico y knock-out son particularmente útiles para estudiar problemas biológicos complejos, ya que se puede analizar la acción de un gen o una proteína en particular (Navabpour et al., 2020).

### 1.11.2 RATONES KNOCK-OUT

Un ratón knock-out es un organismo que ha sido modificado genéticamente, de tal manera que carece de la expresión de un gen concreto. Esto sirve para el estudio del funcionamiento o acción de un gen en particular bioquímica y fisiológicamente. Este tipo de ratones suele utilizarse en investigación del cáncer y de otras enfermedades complejas (Majzoub & Muglia, 1996).

Para su obtención es necesario realizar la “extracción” del gen de interés y su posterior selección positiva mediante el uso de un gen marcador (suele utilizarse el gen de resistencia a la neomicina). Tras ello, se consigue en cultivo la supervivencia de las células denominadas recombinantes, las cuales son microinyectadas en embriones de ratón, obteniendo los organismos conocidos como quimeras. Con las quimeras se realizan diversos cruces, hasta generar la cepa modificada (C. Wang & Sun, 2019) (Fig. 45).



**Figura 45: Esquema de obtención de ratones knock-out.**

**Fuente:** [https://es.wikipedia.org/wiki/Bloqueo\\_de\\_genes](https://es.wikipedia.org/wiki/Bloqueo_de_genes)

Entre otras, las principales desventajas de este tipo de ratones en investigación radican en la elevada mortalidad embrionaria o de individuos recién nacidos o que la presencia de la modificación se encuentra presente en todas las células (no ocurre en algunos tipos de cáncer).

### 1.11.3 RATONES TRANSGÉNICOS

Un ratón transgénico es un ratón que porta un fragmento de ADN ajeno a su genoma. En su producción, primero es necesario hacer un plásmido de ADN para introducir el gen en la célula diana, de forma que se inserte al azar en el genoma mediante técnicas recombinantes o de transfección. Estos ratones se utilizan para conocer los mecanismos de la expresión génica de un gen o de un fragmento de este. Algunos ratones transgénicos pueden expresar un nuevo fenotipo debido a la inactivación de otro gen debido al lugar de inserción del transgén, lo cual es una desventaja de la técnica. En general, los modelos generados permiten estudiar la ganancia de una función (Babinet et al., 1989; Hickman-Davis & Davis, 2006).

Para estudiar la enfermedad de Alzheimer, existen diversos tipos o modelos de ratón transgénico, destacando principalmente en cuanto a uso en la actualidad (Fig. 46)



**Figura 46: Modelos de ratón transgénico.**

**Fuente:** <https://infotiti.com/2015/12/animales-modelos-experimentales-de-la-enfermedad-de-alzheimer/>

- Modelos basados en la proteína precursora amiloide (APP): son ratones transgénicos que sobreexpresan la proteína precursora amiloide, la APP humana. Estos ratones son de utilidad, debido a que esta proteína produce la sustancia  $\beta$ -amiloide, principal componente de las placas que aparecen en los enfermos de Alzheimer (Manzano Fernández et al., 2009).
- Modelos basados en la presenilina (PS): este modelo es utilizado debido a que el Alzheimer puede ser hereditario, siendo causa de mutaciones en diversos genes, entre los que se encuentran los que codifican las presenilinas. Estos ratones por sí mismos no son viables para su estudio debido a que no llegan a expresar los signos de la enfermedad. Debido a ello, se cruzan con

los ratones del modelo APP, de manera que, al añadir el transgén mutado de PS1, se acelera marcadamente la patología amiloide (Rudbeck et al., 2017).

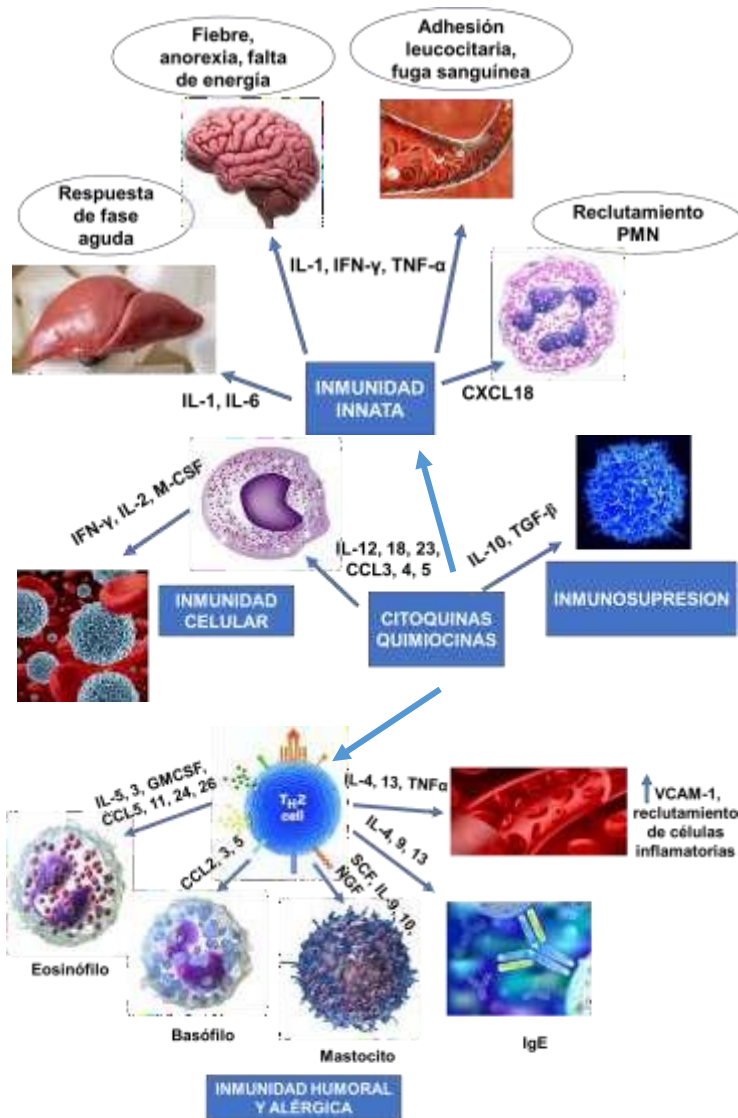
- Modelos basados en Tau: estos modelos expresan la proteína Tau humana, proteína de interés porque, en la enfermedad de Alzheimer, sufre un proceso dañino dando lugar a los ovillos neurofibrilares, que finalmente conducen a la muerte neuronal (Lewis et al., 2001).
- Modelos basados en apolipoproteína E (APOE): el estudio de ratones con las diferentes variantes de APOE es de suma importancia. Esto es así, porque la variante E4 de la APOE es uno de los factores de riesgo más conocidos de la enfermedad de Alzheimer en individuos pasados los 65 años principalmente (Rolyan et al., 2011).
- Triples transgénicos: son aquellos mutados para APP, preselina y Tau (Oddo et al., 2003).

## 1.12 CITOQUINAS Y QUIMIOCINAS

Las citoquinas o citocinas son proteínas con un bajo peso molecular y de un tamaño pequeño, producidas principalmente por el sistema inmune y esenciales debido a su papel en diversas funciones fisiológicas importantes. Son moléculas de señalización responsables de la comunicación intercelular. Intervienen en la proliferación, diferenciación celular y en los



procesos del sistema inmune como la apoptosis, la inflamación, la reparación celular y tisular y/o la hematopoyesis. Las citoquinas son fundamentalmente producidas por linfocitos y macrófagos activados, pero también las pueden producir las células del tejido conjuntivo, epiteliales, endoteliales, miocitos, adipocitos, leucocitos polimorfonucleares, células neurales, etc. (Borish & Steinke, 2003) (Fig. 47).

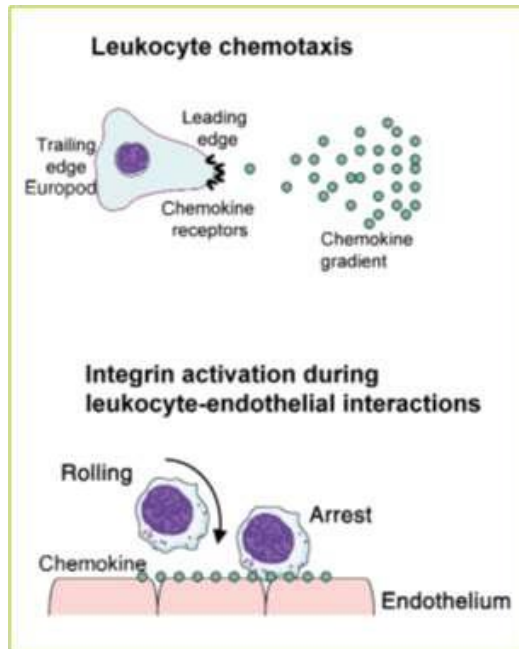


**Figura 47: Funciones de las quimiocinas y sus receptores.**

**Fuente:** Ignacio Campo Palacio desde Borish & Steinke, 2003.

Las quimiocinas son un grupo de polipéptidos pequeños, moléculas estructuralmente relacionadas que regulan el tráfico

celular de varios tipos de leucocitos. Son quimioatrayentes y juegan un papel vital en la migración celular a través de las venas sanguíneas hacia tejidos y viceversa y también en la inducción del movimiento celular en respuesta a un gradiente químico (quimiocina) por la quimiotaxis (Ransohoff, 2009) (Fig. 48).



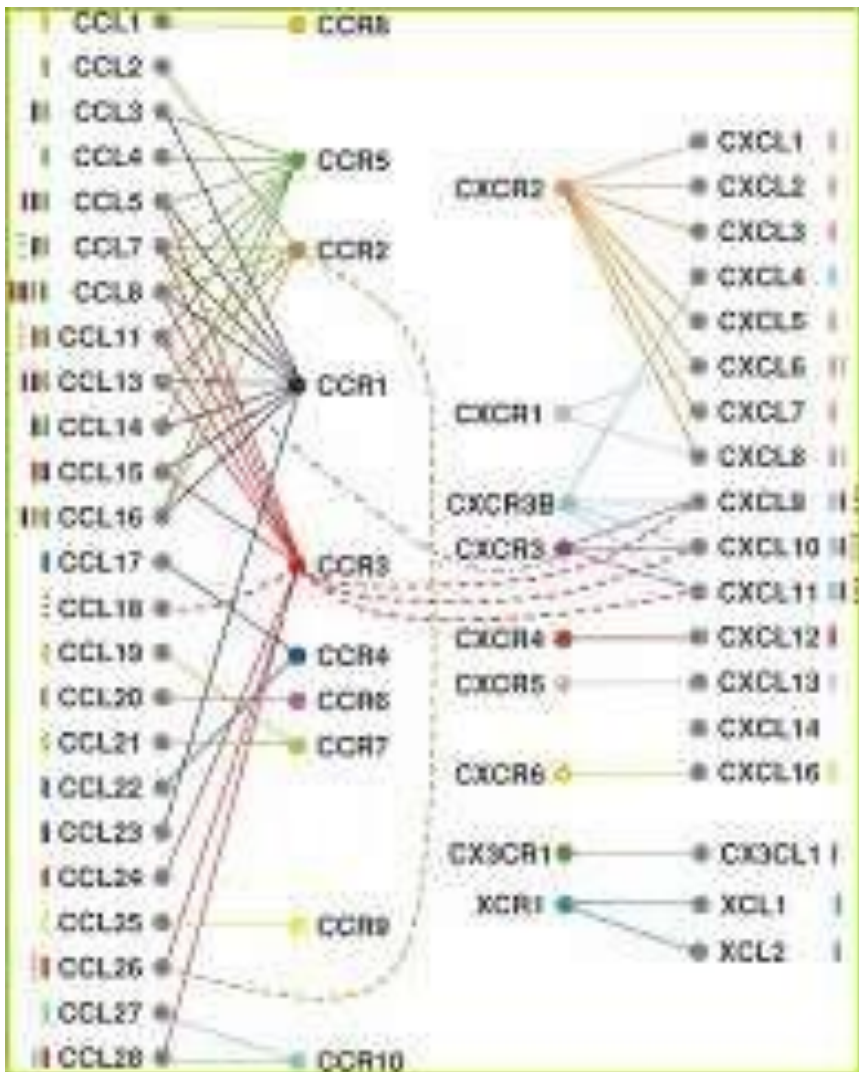
**Figura 48: Funciones de las quimiocinas.**

**Fuente:** Ignacio Campo Palacio desde Mackay, 2001.

La respuesta celular a las quimiocinas solo se produce en células que expresan el receptor de quimiocina complementario. Los receptores de quimiocinas pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G (GPCRs). Estos presentan 7 dominios transmembrana que se unen a ligandos extracelulares e inician por

consiguiente la señal intracelular. Cuando una quimiocina se une a su receptor se crea una cascada de señal de calcio, que resulta en una activación de GTPasas pequeñas. Esto provoca una señal intracelular con efectos tales como activación de integrinas (moléculas implicadas en la adhesión celular) y polimerización de actina, resultando la formación de pseudópodos (proyección celular), polarización de la morfología celular y finalmente movimiento de la célula (Hughes & Nibbs, 2018).

De acuerdo con su composición de aminoácidos las quimiocinas se agrupan y se nombran y en concreto a los dos primeros residuos de cisteínas que se encuentran en el motivo tetra-cisteína conservado. Los dos grupos más grandes son las CC y CXC (Dairaghi et al., 1997). También se pueden considerar quimiocinas las moléculas CX3CL1, XCL1 y XCL2. Existen 47 quimiocinas conocidas y 19 receptores de quimiocinas (Fig. 49), produciendo un alto grado de especificidad. De esta manera, las moléculas de señalización producidas por una célula determinarán hacia que célula o tejido deben migrar. Un ejemplo sería lo que realizan las células que expresan el receptor de quimiocinas CCR7 que migran a los ganglios linfáticos que es donde se expresan los ligandos del receptor, CCL19 y CCL21 (Le et al., 2004).



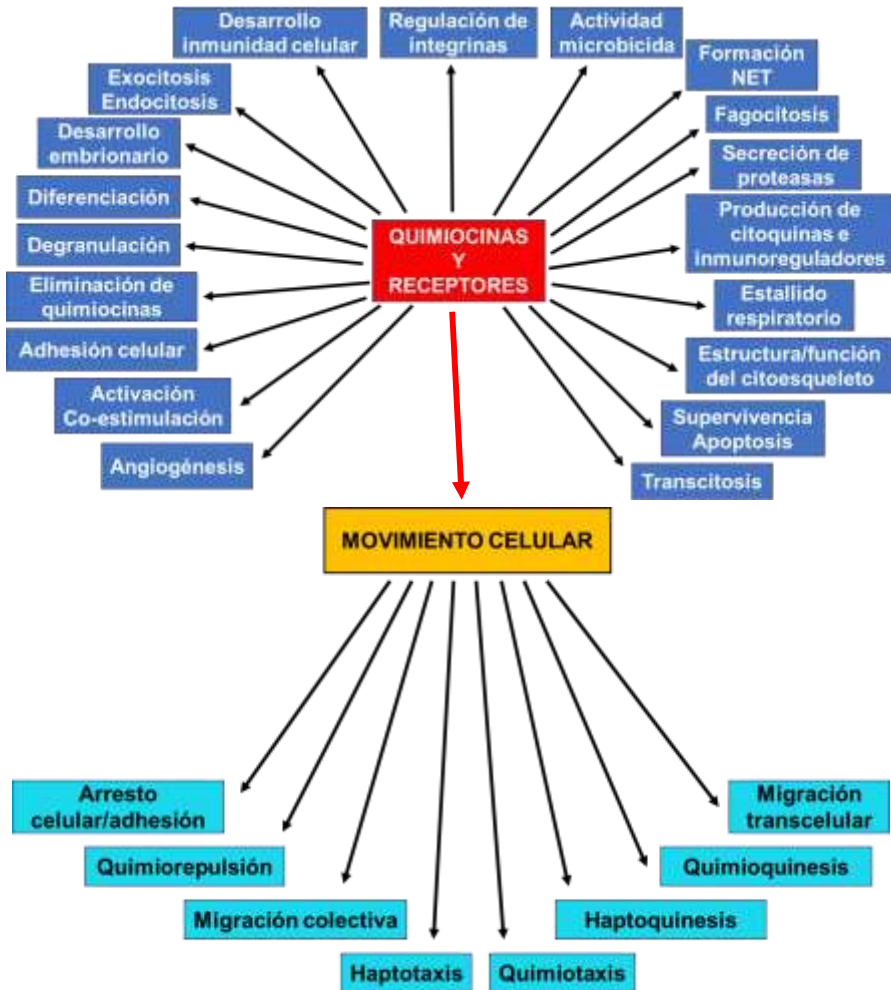
**Figura 49: Quimiocinas: interacción con el receptor.**

Las líneas sólidas representan interacción con el receptor agonista y las líneas punteadas interacción con el receptor antagonista.

**Fuente:** Ignacio Campo Palacio desde Rot & von Andrian, 2004.

Las quimiocinas pueden también agruparse según su función, homeostáticas o inflamatorias. Las primeras se expresan de manera

constitutiva y juegan un papel crucial en la migración de linfocitos y en el desarrollo de órganos linfoides. Las inflamatorias son producidas cuando se liberan citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF) o IL-1 (Interleucina 1) y su función es reclutar leucocitos. Otra clasificación es la de las quimiocinas CXC que pueden ser agrupadas según la función angiogénica o angioestática. Las quimiocinas CXC con el motivo aminoácido ELR (CXCL1-3, 5-8, 14 y 15) tienden a ser angiogénicas, sin embargo, las quimiocinas CXC ELR negativas principalmente son angioestáticas y solo CXCL12 es una excepción (M. Li & Ransohoff, 2008). En resumen, las quimiocinas presentan unas características estructurales comunes, como su disposición tridimensional y la presencia de pares de cisteína unidos por puentes de disulfuro. También juegan papeles fundamentales en el desarrollo, homeostasis y función del sistema inmunológico y tienen efectos sobre las células del sistema nervioso central, así como sobre las células endoteliales involucradas en la angiogénesis y en la inducción del movimiento celular en respuesta a un gradiente químico (quimiocina) por un proceso denominado quimiotaxis (Figura 50). También son capaces de regular el desarrollo de órganos linfoides, la diferenciación de linfocitos T, intervienen en metástasis celular, y recientemente se ha demostrado que tienen una función como neuromoduladoras.



**Figura 50: Funciones de las quimiocinas y sus receptores.**

**Fuente:** Ignacio Campo Palacio desde Hughes & Nibbs, 2018.

Las quimiocinas y receptores estudiados en este proyecto fueron las siguientes:

### 1.12.1 QUIMIOCINA CCL1

Es una glicoproteína pequeña, con un peso molecular de aproximadamente 15-16 kDa, que es secretada por monocitos/macrófagos activados, linfocitos T y células endoteliales. CCL1 actúa uniéndose a su receptor, CCR8, induciendo quimiotaxis, regulando la apoptosis y la entrada de calcio al interior celular. Esta quimiocina pertenece a la subfamilia CC de las quimiocinas y está relacionada a las células Th2 debido a la expresión de su receptor en ellas y no en las células Th1. Participa en procesos inflamatorios a través del reclutamiento de leucocitos y podría jugar un papel crucial en la angiogénesis y otros procesos virales y tumorales (Denis et al., 2012; Korbecki et al., 2020).

### 1.12.2 RECEPTOR CCR8

Es una proteína con un peso molecular aproximado de 41 kDa perteneciente a la familia de receptores de quimiocinas  $\beta$ , cuyo ligando es CCL1. Se expresa de forma constitutiva en monocitos/macrófagos, Th2 y linfocitos T reguladores. Los estudios de este receptor y sus ligandos sugirieron su papel en la regulación de la quimiotaxis de monocitos y la apoptosis de células tímicas. Más específicamente, este receptor puede contribuir al posicionamiento adecuado de las células T activadas dentro de los sitios de desafío antigénico y las áreas



especializadas de los tejidos linfoides (H.L. Li et al., 2020; Moser, 2022).

### **1.12.3 QUIMIOCINA CCL3**

Es una quimiocina también conocida como proteína inflamatoria de macrófagos 1  $\alpha$ , que tiene un peso molecular de aproximadamente 8 kDa. CCL3 pertenece a la subfamilia CC de las quimiocinas y es producido por linfocitos, macrófagos y células dendríticas, y está implicado en la respuesta inflamatoria de los monocitos sanguíneos y los macrófagos tisulares. Por ello, juega un papel en las respuestas inflamatorias agudas mediante el reclutamiento y activación de leucocitos polimorfonucleares a través de la unión a los receptores CCR1, CCR4 y CCR5 (Okamura et al., 2012; Pelisch et al., 2020).

### **1.12.4 QUIMIOCINA CCL4**

Es una quimiocina que se produce durante la inflamación, el daño u otros procesos dinámicos importantes como angiogénesis para atraer células inmunitarias cuando los leucocitos atraviesan el endotelio vascular y migran a los tejidos periféricos. Tiene un peso molecular aproximado de 7,8 kDa y pertenece a la subfamilia CC de las quimiocinas. Es producido por: monocitos, células B, células T, células NK, células dendríticas, neutrófilos, fibroblastos, células endoteliales tales como células del músculo liso vascular,

células endoteliales de microvasos cerebrales, microglía fetal y células epiteliales. Posee funciones quimiocinéticas e inflamatorias y es uno de los principales factores supresores del VIH producidos por las células T CD8+ (Chang et al., 2020; Estevao et al., 2021).

#### **1.12.5 QUIMIOCINA CCL5**

Es una quimiocina con 99 kDa de peso molecular, que funciona como un quimioatrayente para los monocitos sanguíneos, las células auxiliares T de memoria y los eosinófilos. Perteneciente a la subfamilia CC de quimiocinas, provoca la liberación de histamina de los basófilos y activa los eosinófilos. CCL5 funciona como uno de los ligandos naturales para el receptor CCR5. Esta quimiocina, junto con CCL4, es uno de los principales factores supresores del VIH producidos por las células CD8+ (Aldinucci et al., 2020; Appay & Rowland-Jones, 2001).

#### **1.12.6 RECEPTOR CCR5**

Es un receptor contribuye a la movilidad de distintos tipos de leucocitos, incluyendo los linfocitos T CD4+ necesarios para generar respuestas inmunes potentes tanto a nivel celular como en la producción de anticuerpos. Este receptor se une con alta afinidad a las quimiocinas CCL3, CCL4, CCL5 y CCL8. Permite la activación de la proteína G y la activación de cascadas de transducción de señales, como la proteína

quinasa B y las vías NF- $\kappa$ B, el reordenamiento del citoesqueleto y la migración celular quimiotáctica. Además, CCR5 es un correceptor necesario para la infección por el virus del SIDA (Aldinucci et al., 2020; Ridley et al., 2003).

### **1.12.7 INTERLEUCINA IL-3**

Es una citoquina producida por linfocitos T CD4+ que tiene un peso molecular de 28 kDa. Promueve la proliferación de células hematopoyéticas, induciendo la formación de colonias eritroides, mieloides, megacarcóticas y linfoides. También facilita la proliferación de mastocitos y su liberación de histamina. Además, está involucrada en una variedad de actividades celulares como el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis. Se ha demostrado que esta citoquina también posee actividad neurotrófica y puede estar asociada con trastornos neurológicos (Barhanpurkar-Naik et al., 2017; Krammer et al., 2022).

### **1.12.8 QUIMIOCINA CCL2**

Es una quimiocina que tiene un peso molecular aproximado de 13-15 kDa (según sus niveles de glicosilación) y pertenece a la subfamilia CC de las quimiocinas. CCL2 muestra actividad quimiotáctica para monocitos y basófilos, pero no para neutrófilos o eosinófilos. Se ha implicado en la patogenia de enfermedades caracterizadas por infiltrados monocíticos, como la psoriasis, la artritis reumatoide y la

aterosclerosis. Se une a los receptores de quimiocinas CCR2 y CCR4 (M. Xu et al., 2021, p. 2; Yadav et al., 2010).

#### **1.12.9 QUIMIOCINA CCL7**

Es un miembro de la subfamilia C-C de quimiocinas que se caracterizan por tener dos residuos de cisteína adyacentes. Puede tener un peso molecular de 11, 13, 17 y 18 kDa. Este gen codifica una quimiocina que atrae a los macrófagos durante la inflamación y la metástasis. La proteína es un sustrato in vivo de la metaloproteinasa de matriz 2, una enzima que degrada los componentes de la matriz extracelular (Popiolek-Barczyk et al., 2020; Xue et al., 2021).

#### **1.12.10 QUIMIOCINA CCL12**

Es una pequeña quimiocina que tiene un peso molecular de 10 kDa y se ha descrito en ratones. Esta quimiocina activa la actividad de unión al receptor de quimioquinas CCR2 y está involucrada en la angiogénesis, la respuesta inflamatoria y la quimiotaxis de monocitos. Se expresa en sistema nervioso central y retina. Ortólogo a CCL2 y CCL8 humanos (Huang et al., 2020; B.H. Li et al., 2020).

#### **1.12.11 RECEPTOR CCR2**

Es un receptor (peso molecular 42 kDa) para la proteína quimioatrayente de monocitos 1, una quimioquina que media específicamente la quimiotaxis de monocitos. La proteína

quimioatrayente de monocitos 1 está involucrada en la infiltración de monocitos en enfermedades inflamatorias como la artritis reumatoide, así como en la respuesta inflamatoria contra los tumores. La proteína codificada media la movilización de calcio dependiente de agonistas y la inhibición de la adenilil ciclasa (Lim et al., 2016; Raghu et al., 2017).

#### **1.12.12 QUIMIOCINA CCL17**

La quimiocina codificada por este gen es un miembro de la subfamilia C-C que muestra actividad quimiotáctica para los linfocitos T, pero no para los monocitos ni los granulocitos. Posee un peso molecular de 11 kDa y se une a los receptores de quimiocinas CCR4 y CCR8. Esta quimiocina juega un papel importante en el desarrollo de células T en el timo, así como en el tráfico y la activación de células T maduras (S. Deng et al., 2021; Fülle et al., 2018).

#### **1.12.13 QUIMIOCINA CCL22**

Es una pequeña citoquina perteneciente a la familia CC de quimiocinas que posee un peso molecular de aproximadamente 10 kDa. Muestra actividad quimiotáctica para monocitos, células dendríticas, células asesinas naturales y para linfocitos T crónicamente activados. También muestra una actividad leve para los linfocitos T activados primarios y no tiene actividad quimioatrayente para los neutrófilos, eosinófilos y linfocitos T en reposo. Se une al receptor de quimioquinas

CCR4. Esta quimiocina puede jugar un papel en el tráfico de linfocitos T activados a sitios inflamatorios y otros aspectos de la fisiología de los linfocitos T activados (Röhrle et al., 2020; Scheu et al., 2017).

#### **1.12.14 RECEPTOR CCR4**

Es un receptor que pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G y tiene como ligandos las quimiocinas CCL2, CCL4, CCL5, CCL17 y CCL22. Posee un peso molecular correspondiente a 41 kDa. Este receptor a menudo se expresa en células leucémicas en linfoma cutáneo de células T (S. Deng et al., 2021; J. Y. Kim et al., 2022).

#### **1.12.15 QUIMIOCINA CXCL4**

Es una quimiocina identificada por primera vez en megacariocitos y plaquetas. Tiene un peso molecular de unos 10-11 kDa. Es una potente quimiocina antiangiogénica y también promueve la fibrosis inflamatoria. Se puede utilizar como marcador pronóstico de la esclerosis sistémica fibrosante (enfermedad autoinmune) (Affandi et al., 2018; Fox et al., 2018).

#### **1.12.16 RECEPTOR CCR1**

Este gen codifica un miembro de la familia de receptores de quimiocinas  $\beta$  y tiene un peso molecular de 41 kDa. Es un receptor cuyos ligandos incluyen CCL3, CCL5, CCL7 y CCL23.

Los estudios de *knockout* en ratones sugirieron las funciones de este gen en la protección del huésped contra la respuesta inflamatoria y la susceptibilidad a virus y parásitos (Fox et al., 2018; Shao et al., 2022).

#### **1.12.17 QUIMIOCINA CCL11**

Esta quimiocina, un miembro de la subfamilia CC con un peso molecular de 8.4 kDa, muestra actividad quimiotáctica para los eosinófilos, pero no para las células mononucleares ni para los neutrófilos. Se cree que esta quimiocina específica de eosinófilos está implicada en enfermedades inflamatorias eosinofílicas como la dermatitis atópica, la rinitis alérgica, el asma y las infecciones parasitarias (Suzuki et al., 2021; D. Wu et al., 2014).

#### **1.12.18 RECEPTOR CCR3**

Es un receptor que pertenece a la familia 1 de los receptores acoplados a proteína G y tiene un peso molecular de 41 kDa. Se une y responde a una variedad de quimiocinas, que incluyen CCL11, CCL26, CCL7, CCL13 y CCL5. Se expresa en gran medida en eosinófilos y basófilos, y también se detecta en células TH1 y TH2, así como en células epiteliales de las vías respiratorias. Este receptor puede contribuir a la acumulación y activación de eosinófilos y otras células inflamatorias en las vías respiratorias alérgicas (Bertrand & Ponath, 2000).

### **1.12.19 QUIMIOCINA CCL25**

Es una quimiocina con un peso molecular de unos 16.6 kDa y pertenece a la subfamilia de genes CC de citocinas pequeñas. Muestra actividad quimiotáctica para células dendríticas, timocitos y macrófagos activados, pero es inactiva en linfocitos y neutrófilos de sangre periférica. Se une al receptor de quimioquinas CCR9 (X. Wu et al., 2021; B. Xu et al., 2020, p. 25).

### **1.12.20 RECEPTOR CCR9**

Es un receptor que se expresa diferencialmente en los linfocitos T del intestino delgado y el colon, y su interacción con CCL25 contribuye a que los linfocitos intraepiteliales intestinales se dirijan al intestino delgado. Este receptor y su ligando exclusivo, CCL25, se sobreexpresan en una variedad de tumores malignos y están estrechamente asociados con la proliferación tumoral, la apoptosis, la invasión, la migración y la resistencia a los fármacos (X. Wu et al., 2021; B. Xu et al., 2020).

Otras proteínas que se analizaron durante la realización de este estudio fueron:



### **1.12.21      PROTEÍNA GFAP**

La GFAP (proteína ácida fibrilar glial) es una proteína cerebral específica de los astrocitos, formando los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular. Está implicada en diferentes procesos funcionales, como apoyar la actividad neuronal y participar en la regulación de la barrera hematoencefálica (Brenner, 2014).

### **1.12.22      PROTEÍNA MAP-2**

Pertenece a una familia de proteínas cuya función es estabilizar la forma neuronal mediante el impulso de la síntesis de microtúbulos y el entrecruzamiento con otros componentes del citoesqueleto, lo que implica un papel en la determinación y estabilización de la forma dendrítica durante el desarrollo de la neurona. Por ello, esta proteína es un marcador sensible y específico de neuroblastoma (Shafit-Zagardo & Kalcheva, 1998).

### **1.12.23      ABCF-1**

La proteína codificada por este gen es un miembro de la superfamilia de transportadores de cassette de unión a ATP (ABC). Las proteínas ABC transportan varias moléculas a través de membranas extracelulares e intracelulares. Esta proteína puede estar regulada por el factor de necrosis tumoral

$\alpha$  y desempeñar un papel en la mejora de la síntesis de proteínas y el proceso de inflamación (Wilcox et al., 2017).

Como conclusión, el aumento de la concentración del péptido tóxico  $A\beta$  es una de las características de la enfermedad de Alzheimer, así como la presencia de la proteína TAU hiperfosforilada y situada en el interior de las neuronas. La enfermedad de Alzheimer es una patología degenerativa que cursa con acúmulo de placas neuríticas (encontrándose en ellas el péptido tóxico) y ovillos neurofibrilares (producidos por hiperfosforilación de la proteína TAU), responsables de la pérdida neuronal, el deterioro en las conexiones sinápticas y de la gliosis reactiva de respuesta inflamatoria (Giulian, 1999; Mrak & Griffin, 2005; Wyss-Coray & Mucke, 2002). Crucial también en esta enfermedad es el estado oxidativo donde el estrés oxidativo celular provoca aumento de marcadores de daño oxidativo tanto a proteínas, lípidos, ADN, ARN o a procesos como biogénesis mitocondrial, metilación e incluso acetilación (Jiménez-Jiménez et al., 2006; Quintanilla et al., 2012; Yan et al., 2013). Por otra parte, la inflamación, aparecida con anterioridad o con posterioridad al estrés oxidativo, presenta también un papel fundamental en el desarrollo y la evolución de la enfermedad de Alzheimer.

A nivel celular, la integridad neuronal, así como el buen funcionamiento de los astrocitos, juegan un papel fundamental

en la recuperación y no avance de la enfermedad de Alzheimer. Los astrocitos, al igual que la microglía, como células inmunológicas del cerebro, pueden poseer gran importancia como diana terapéutica en respuesta a procesos inflamatorios (Fuller et al., 2010; Furman et al., 2012) y de estrés oxidativo (Agostinho et al., 2010).



**HIPÓTESIS**



## **2. HIPÓTESIS**

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la presencia de placas de amiloide con proteínas peptídicas tóxicas, como son  $A\beta_{1-42}$  y  $A\beta_{1-40}$ . En segundo lugar, por la hiperfosforilación de la proteína TAU del interior de las neuronas y en tercer lugar, por el incremento de la inflamación cerebral.

Las células encargadas de intervenir en el proceso inflamatorio cerebral son los astrocitos y la microglía.

Utilizando un modelo animal de la enfermedad de Alzheimer, como es el transgénico APP/PS1 (proteína precursora de amiloide/presenilina 1), se podrían detectar cambios en la expresión de las citocinas y quimiocinas en este modelo animal comparado con los animales de tipo salvaje.





## **OBJETIVOS**



### 3. OBJETIVOS

1. Estudiar los cambios de motricidad en el ratón transgénico APP/PS1 comparando con los detectados en el ratón de tipo salvaje.
2. Analizar la posible diferencia respecto al número de neuronas y astrocitos tanto en el ratón salvaje como en el ratón APP/PS1.
3. Determinar los cambios en la memoria y el aprendizaje en el ratón transgénico APP/PS1 comparado con el ratón de tipo salvaje.
4. Estudiar los cambios a nivel de expresión de ARNm de las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias en el ratón transgénico respecto al de tipo salvaje.
5. Analizar los cambios a nivel de expresión proteica de las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias en el ratón transgénico comparado con el ratón de tipo salvaje.
6. Determinar la expresión de ARNm de las quimiocinas en el ratón transgénico con respecto al de tipo salvaje.
7. Analizar la expresión proteica de los receptores de quimiocinas en el ratón transgénico con respecto al de tipo salvaje.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1 APARATOS

Los aparatos utilizados para la realización del proyecto fueron:

1. **Aparatos ópticos:**
  - a. Lector de microplacas SpectraMax Plus 384.
  - b. Sensor de imágenes ImageQuant LAS 4000 de GE Healthcare.
2. **Aparatos de electroforesis y de transferencia.**
  - a. Fuentes de alimentación LKB, ISCO.
  - b. Fuente de electroforesis de alto voltaje. ISCO. Modelo 453.
  - c. Aparatos para minigeles, de la casa Bio-Rad. Mini-Protean II Cell 10/0,75.
  - d. Aparato para transferencia en semi-seco de la casa Bio-Rad. Trans-Blot Turbo
3. **Aparatos para la realización de RT-PCR**
4. **Centrífugas.**
  - a. Centrífuga Heraeus Multifuge 3SR Plus.
  - b. Centrífuga refrigerada de eppendorf 5415 R, de Marshall Scientific.
5. **Estufas e incubadores.**
  - a. Cabina de seguridad microbiológica Telstar BIO II
  - b. Incubador Sanyo CO2.

c. Estufa Memmert GmbH + Co. KG, modelo UNB 400.

**6. Balanzas.**

a. Balanza de precisión Denver MAXX-601.

**7. Microscopios.**

- a. Cari Zeiss M.P.M. II con condensador para contraste de fases.
- b. Zeiss de fluorescencia con dispositivo Epi iluminación.
- c. Laser Confocal Leica TCS SP8 (Leica Microsystems).

**8. Otros.**

- a. Máquina de hielo. Scotsman. AF-30.
- b. Agitadores magnéticos: Corning Stirrer PC-353. P-Selecta Agilux.
- c. Campana de flujo laminar. Tipo UD-12.
- d. Ordenador Compaq 386 y 486.
- e. Impresora Hewlett packard laserjet 4L y Deskjet 520.
- f. Pipetas eppendorf, Gibco y Amersham
- g. pHmetro Standart PH M 62.
- h. Congeladores: de -20°C y -70°C.
- i. Autoclaves.
- j. Contador de células automático TC20, de Bio-Rad.

**4.2 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

Para este proyecto se estudiaron ratones hembra, con dos condiciones diferentes:



- Tipo salvaje: ratón de laboratorio utilizado para la investigación científica, sobre todo, debido a su fácil manejo. Usualmente de la especie *Mus musculus*.
- APP/PS1 (B6C3-Tg): ratón transgénico utilizado como modelo de investigación para Alzheimer. El ratón presenta una quimera ratón/humano de APP 695 cDNA conteniendo la mutación sueca (Swedish mutation) (KM670/671 NL) integrada con el gen humano de la presenilina 1 (PS1) portando la mutación DE9.

En el análisis de comportamiento, el tamaño muestral utilizado fue de 25 ratones de tipo salvaje y 25 ratones APP/PS1, mientras que para los análisis de factores bioquímicos el tamaño muestral correspondió a una n=4 de experimentos independientes.

Se analizaron dos grupos de ratones, APP/PS1 y tipo salvaje (Wild type) y ambos fueron alimentados a voluntad de los ratones (ad libitum) con una dieta estándar (Letica, Barcelona, España). Los ratones fueron expuestos a ciclos de luz y oscuridad (12 h luz/12 h oscuridad) y con temperatura de la habitación mantenida a 22° C.

Todos los procesos realizados con los animales se llevaron a cabo de acuerdo con la legislación europea para el uso y cuidado de animales de laboratorio (CEE 86/609). La investigación experimental se realizó con la aprobación del

comité de ética en experimentación animal de la Universidad de Valencia.

### **4.3 ANÁLISIS DE COMPORTAMIENTO**

#### **4.4 TIEMPO EN RECORRER UNA BARRA ESTRECHA**

Para explorar si la motricidad de los ratones se veía alterada, se procedió a una serie de experimentos. Uno de ellos fue el de determinar el tiempo necesario para atravesar una barra estrecha. En esta prueba se evalúa la capacidad de los ratones para pasar a través de una barra estrecha, registrando el tiempo requerido para cruzar al otro extremo de la barra.

##### **4.4.1 NÚMERO DE FALLOS EN LA PATA**

En esta prueba se determinó el número de caídas de la barra que experimenta una pata, o lo que podríamos denominar fallos de una pata al atravesar una barra. Se registró el número de resbalones de las patas delanteras y traseras, definido como cualquier pata que saliera de la parte superior de la barra o cualquier miembro que se usara en el costado de esta.

##### **4.4.2 FUERZA DE AGARRE EN LOS RATONES**

La fuerza de agarre se analizó midiendo el tiempo que usaban los ratones sin caerse de la barra durante un tiempo determinado de 60 segundos. Las ventajas son que la fuerza de agarre es reproducible y se puede medir repetidamente en

roedores para detectar déficits motores progresivos, valor de la terapia y modificaciones genéticas.

#### **4.4.3 EXPLORACIÓN DE DOS OBJETOS IDÉNTICOS**

Para analizar el comportamiento de los ratones respecto al tiempo de exploración de dos objetos idénticos, se presentaba a los ratones dos tazas idénticas para determinar si exploraban más una taza u otra. Las tazas se encontraban en diferentes localizaciones del espacio a analizar por los ratones. Se midieron los segundos utilizados en 5 minutos.

#### **4.4.4 RECONOCIMIENTO DE UN OBJETO**

En este caso, cuando a un ratón se le presenta tanto un objeto nuevo como un objeto familiar recientemente presentado, pasará mucho más tiempo explorando el objeto nuevo. Para determinar el índice de discriminación de los dos tipos de ratones, se les presentó una taza dejando el tiempo necesario para su reconocimiento. Posteriormente la taza fue eliminada y tras un breve espacio de tiempo de 10 minutos, se le volvía a presentar el objeto. Se midió el tiempo que tardaban en analizar el objeto.

#### **4.4.5 MEMORIA DE UBICACIÓN DE UN OBJETO**

Cuando a un ratón se le presentan dos objetos idénticos conocidos, pero uno de ellos está ubicado en una posición diferente, pasará mucho más tiempo explorando el objeto en la

nueva ubicación. Por ello, en esta prueba a los ratones se les presentaba un objeto que analizaban durante un tiempo. Posteriormente (10 minutos), se cambiaba la posición del objeto en el espacio de análisis y se determinaba el tiempo que gastaba el ratón en el objeto cuando lo encontraba.

## **4.5 ANÁLISIS BIOQUÍMICOS**

### **4.5.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE TEJIDO**

Se pesan las muestras antes de incubarlas y ponerlas en nitrógeno líquido para poder saber de antemano que cantidad aproximada de tejido tendremos por muestra.

1. Sabiendo la cantidad de muestras que vamos a procesar, y el peso de cada una, preparamos el tampón de lisis (TL) con inhibidor de proteasas (IP). Por cada 50 mg de tejido/220  $\mu$ l de TL+ 30  $\mu$ l IP (100x). Los tejidos obtenidos de los ratones de tipo salvaje y de los ratones transgénicos fueron tratados con tampón de extracción de tejidos e inhibidor de proteasas (concentración 10  $\mu$ L/mL).
2. Homogenizamos la muestra mediante disgregación mecánica para liberar las proteínas, evitando su degradación por la acción de las proteasas (teniendo en cuenta que la muestra ha de estar en hielo).

3. Se centrifuga la muestra a 4°C, 10.000 g. durante 10 minutos.
4. Tras la centrifugación, se recoge el sobrenadante en otro eppendorf de 1,5 ml y se descarta el pellet.
5. En este paso se extrajo la cantidad necesaria de muestra para determinar la concentración de proteínas totales.
6. Añadir a cada muestra azul de bromofenol al 1% concentración final y 2-β-mercaptoetanol 0.5 % y calentar a 95° centígrados durante 5 minutos.
7. Guardar la muestra a -20°C hasta su uso.

#### **4.5.2 MÉTODO DE LOWRY**

Es un ensayo bioquímico para la determinación del nivel total de las proteínas en una disolución, donde la concentración total de proteínas se detecta por la diferencia de color con respecto a una proteína dada (BSA=Siero Albumina Bovina). Para ello, preparamos una curva patrón a partir del BSA debido a que se conoce la concentración de la proteína. Para la curva patrón se utilizarán concentraciones crecientes de la proteína BSA. Se utilizará para determinar la concentración de la proteína a medir por comparación con la proteína BSA.

En la preparación de la curva y las muestras, el primer paso necesario consiste en añadir la solución Lowry (una solución alcalina de sulfato de cobre y tartrato de sodio) a cada

uno de los tubos en los que se vaya a medir la absorbancia. Se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente (en este punto la reacción sería amarilla). A continuación, se añade a cada tubo el reactivo de Folin y se deja incubar 30 minutos a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. Tras este paso, podremos ver un color azul si hubiera proteínas presentes en la muestra, cuya concentración se mide utilizando un espectrofotómetro. Normalmente se utilizará una longitud de onda de 750 nm, pero si se esperan concentraciones elevadas, se pueden utilizar 500 nm. Por lo tanto, según la ley de Beer-Lambert la concentración es proporcional a la absorbancia.

**Tabla 1: Curva de calibración por el método de Lowry.**

CURVA DE CALIBRACIÓN						
TUBO	0	1	2	3	4	5
ALBUMINA (µg/µl)	0 µl	5 µl	10 µl	20 µl	40 µl	80 µl
AGUA (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
REACTIVO DE LOWRY (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Agitar y dejar 10 minutos a temperatura ambiente.

**Tabla 2: Adición de Folin por el método de Lowry.**

FOLIN						
FOLIN (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

Agitar y dejar 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

**Tabla 3: Lectura de absorbancia y extrapolación del valor de la proteína.**

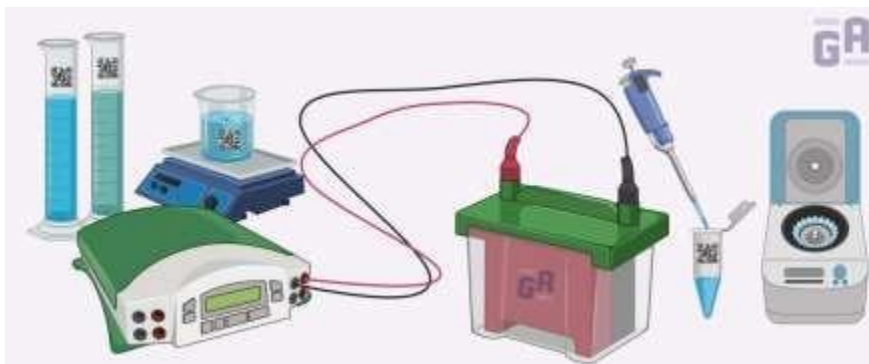
ABSORBANCIA (750 nm)						
PROTEINAS ( $\mu\text{g}$ )	0.0	5	10	20	40	80

Se extrapola el valor de la proteína BSA al de la proteína de la muestra a analizar.

#### 4.5.3 WESTERN-BLOT

Después de extraer las proteínas y realizar su determinación mediante el ensayo Lowry, estas se separan en geles de SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Pollyacrilamide Gel Electrophoresis), que es una técnica muy utilizada para la separación de proteínas de acuerdo con su movilidad electroforética, migrando influenciadas solo por su tamaño.

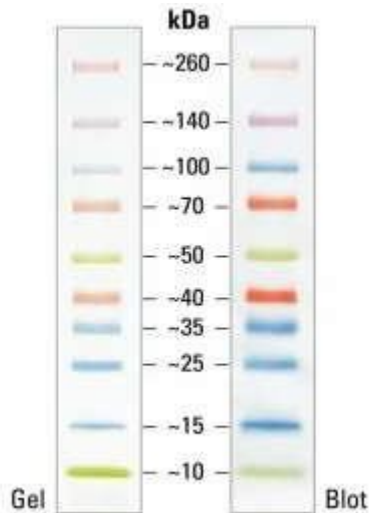
Los geles poseían un espesor de 0.75 mm, con un tamaño de las placas de 8.5 x 6 cm (Minigeles) (Fig. 51). El gel concentrador contenía acrilamida al 4.5% en tampón Tris-HCl 125 mM pH 6.8 y SDS 0.1%. El gel de resolución presentaba concentraciones de acrilamida variables, según la proteína a estudiar, entre el 7 y el 15% en tampón Tris-HCl 375 mM pH 8.8 y SDS 0.1%. El tampón utilizado en la electroforesis era Tris-HCl 50 mM pH 8.3, glicina 384 mM y SDS 0.1%.



**Figura 51: Esquema de material usado en Western-blot.**

Se realizó la carga de las muestras en los pocillos de los geles, utilizando una proteína estándar multicolor (Broad MultiColor Pre-Stained Protein Standard, GenScript) (Fig. 52) para comprobar la eficacia de la transferencia y determinar el tamaño aproximado de las proteínas de interés. La electroforesis se realizó en presencia de un tampón de migración (Tris 25 mM, glicina 200 mM y SDS al 0,1% (p/v), pH 8,3) y se aplicó un voltaje constante de 140 V durante 50-60 minutos.





**Figura 52:** Patrón de peso molecular de una proteína estándar multicolor.

Una vez finalizada la electroforesis, estos geles fueron transferidos a membranas de PVDF (Poli-Vinilo de Fluoruro) en un ambiente húmedo, utilizando un tampón de transferencia (Tris 25 mM, glicina 190 mM, 20% metanol) y aplicando un voltaje constante de 50 V durante 60 minutos.

Además, como comprobación del correcto estado de las muestras y del correcto funcionamiento de la electroforesis, una vez transferidas las membranas, los geles se sumergieron en una solución de Azul de Coomassie durante 15 minutos, de manera que las bandas proteicas presentes en el gel quedaron teñidas, mostrando si la migración se había producido adecuadamente.

Tras finalizar la transferencia de las membranas, éstas se bloquearon con Suero Albúmina Bovina (BSA) al 5% en tampón salino TBS-T (0,05% de Tween-20) durante 30 minutos y se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante 24 horas a 4<sup>o</sup> centígrados. Al finalizar la incubación de 24 horas, se realizaron 3 lavados, de 5 minutos cada uno, con tampón de lavado TBS-T (TBS, 0,2% Tween-20) y se incubaron con anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón) durante 1 hora.

Se realizó el lavado de las membranas nuevamente 3 veces, 5 minutos cada una, con TBS-T (TBS, 0,2% Tween-20) y se procedió a su posterior revelado. Para ello, se mezclaron los reactivos del revelado (Western Blotting Luminol Reagent: sc-2048) (dilución 1:1) y se aplicó la mezcla en las membranas entre 1-3 minutos. Posteriormente, se obtuvieron las imágenes utilizando el sistema de imagen digital ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Science, Barcelona, España). La señal obtenida se cuantificó por densitometría utilizando el software ImageJ.

Los anticuerpos que se emplearon durante el análisis fueron los siguientes:

- Anticuerpo anti-tubulina monoclonal (1:1000) (sc-5286) obtenido de Santa Cruz Biotechnology Barcelona, España.
- Anticuerpo monoclonal anti-GFAP (1:500) (sc-33673). Se utiliza como un marcador específico de astrocitos, ya

que es el principal componente de sus filamentos intermedios. Además, sirve para distinguir los astrocitos diferenciados de otras células gliales en el desarrollo del SNC. Obtenido de Sigma-Aldrich Biotechnology, Madrid, España.

- Anticuerpo anti-MAP-2 (1:500) (sc-74421). Es una proteína del citoesqueleto que es importante en las neuronas. Obtenido de Santa Cruz Biotechnology Barcelona, España.
- Anticuerpo monoclonal anti-CCR5 (1:500) (ab65850) obtenido de Abcam Biotechnology
- Anticuerpo monoclonal anti-CCR8 (1:500) (ab140796) obtenido de Abcam Biotechnology.
- Anticuerpo monoclonal anti-CCR2 (ab203128) obtenido de Abcam Biotechnology.
- Anticuerpo monoclonal anti-CCR1 (ab205719) obtenido de Abcam Biotechnology.
- Anticuerpo monoclonal anti-CCR4 (ab275980) obtenido de Abcam Biotechnology.
- Anticuerpo monoclonal anti-CCR3 (ab32512) obtenido de Abcam Biotechnology.
- Anticuerpo monoclonal anti-CCR9 (ab32556) obtenido de Abcam Biotechnology.
- Anticuerpo secundario: se utilizó o bien el secondary horseradish peroxidase-linked anticuerpo IgG anti-

conejo o el anti-ratón (Cell Signaling Technologies, Barcelona, Spain).

#### 4.5.4 RT-PCR

Las muestras de corteza cerebral se añadieron a una solución RNAlater (Ambion Austin, TX, USA) que estabiliza el ARN, siguiendo las indicaciones de los fabricantes. El ARN total se trató con una solución de extracción Tripure (Roche Molecular Biochemical, Basel, Switzerland). La concentración y la integridad se analizó mediante RNA 6000 Nano Labchips using Agilent 2100 Bio-analyzer (Agilent Technologies, Foster City, CA, USA). Para la cuantificación de los genes seleccionados se usaron cebadores y sondas de Applied Biosystemse:

- CCL1 (Mm99999220\_Mh).
- CCL3 (Mm00441259\_g1).
- CCL4 (Mm00443111\_m1).
- CCL5 (Mm01302428\_m1).
- CCR5 (Mm01963251\_s1).
- CCR8 (Mm99999115\_s1).
- ABCF1 (Mm01275245\_m1).
- IL-3 (Mm00439631\_m1).
- CCL2 (Mm00441242\_m1).
- CCL7 (Mm004431p\_m1).
- CCL12 (Mm01617100\_m1).

- CCR2 (Mm99999051\_gH).
- CCL17 (Mm01244826\_g1).
- CCL22 (Mm00436439\_m1).
- CCR4 (Mm01963217\_u1).
- CXCL4 (Mm00160719\_cn).
- CCR1 (Mm00577746\_cn).
- CCL11 (Mm00441238\_m1).
- CCR3 (Mm00515543\_s1).
- CCL25 (Mm00248750\_cn).
- CCR9 (Mm00272668\_cn).
- $\beta$ -actina como referencia endógena de los genes (Mm00607939\_s1).

Se aplicó una transcripción reversa a las muestras de ARN usando hexámeros aleatorios y la MultiScribe transcriptasa reversa (Applied Biosystems). Después de obtener la síntesis complementaria de ADN, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) usando el ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems). Las muestras se procesaron por triplicado y los cambios en la expresión fueron determinados calculando el  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

#### 4.5.5 SIGNIFICACIÓN ESTADÍSTICA

Las diferencias entre ambos grupos de ratones fueron estimadas por la prueba de t-Student y por ANOVA de una vía,

seguido del Tukey's post hoc test. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el Graph-Pad Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Se aceptó como estadísticamente significativo la diferencia con una  $p \leq 0.05$ .

## **RESULTADOS**

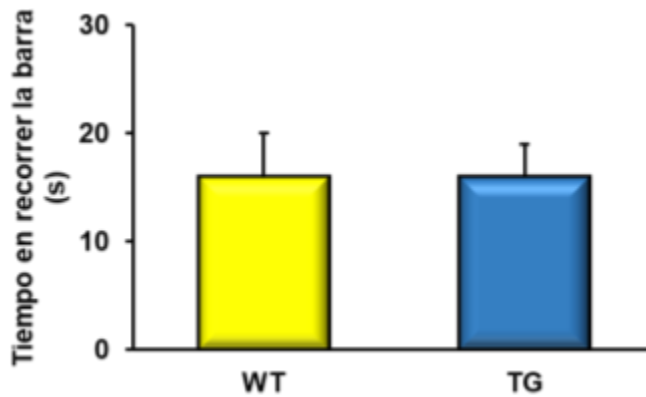




## 5. RESULTADOS

### 5.1 TIEMPO INVERTIDO EN RECORRER UNA BARRA

Para explorar si la motricidad de los ratones se veía alterada, se procedió a una serie de experimentos. Uno de ellos fue el de determinar el tiempo necesario para atravesar una barra estrecha. El tiempo que tardaron en recorrer la barra tanto los ratones de tipo salvaje como los APP/PS1 fue el mismo con un valor de más o menos 15 segundos (Fig. 53). La cantidad de ratones usados para este experimento fue suficientemente significativa (25 ratones) para determinar y conseguir un valor significativo. Además, este mismo resultado se dio en ratones de diferentes edades (7 meses y 22-24 meses), por lo que determinamos que la edad no influía en la rapidez con que se atravesaba la barra. Por otra parte, se demostró que en esta prueba no observábamos problemas de motricidad en ninguno de los ratones (Fig. 53).



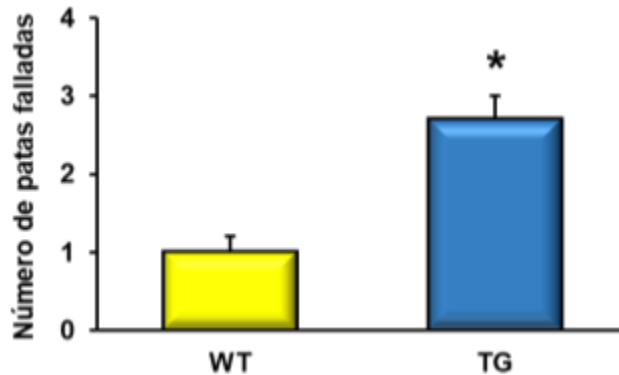
**Figura 53: Tiempo invertido en recorrer una barra (segundos).**

Ratón de tipo salvaje (WT) y ratón transgénico (TG). Los datos representan la media  $\pm$  SD de 25 ratones.

## 5.2 NÚMERO DE FALLOS EN LA PATA

En esta prueba se determinó el número de caídas de la barra que experimenta una pata, o lo que podríamos denominar fallos de una pata al atravesar una barra. Se pudo observar que sí existían diferencias significativas de fallos de las patas en la prueba de caminar en la barra en los ratones APP/PS1 de 22 a 24 meses, en comparación con los ratones de tipo salvaje ( $p < 0,001$ ) (Fig. 54). En los ratones de tipo salvaje el número de fallos fue de alrededor de 1 y en cambio en los ratones transgénicos fue de alrededor de 3. Para esta prueba también se usaron 25 ratones transgénicos y 25 ratones de tipo salvaje. Este resultado indicaba que podría haber problemas de

coordinación en los ratones APP/PS1, en comparación con los ratones de tipo salvaje (Fig. 54).

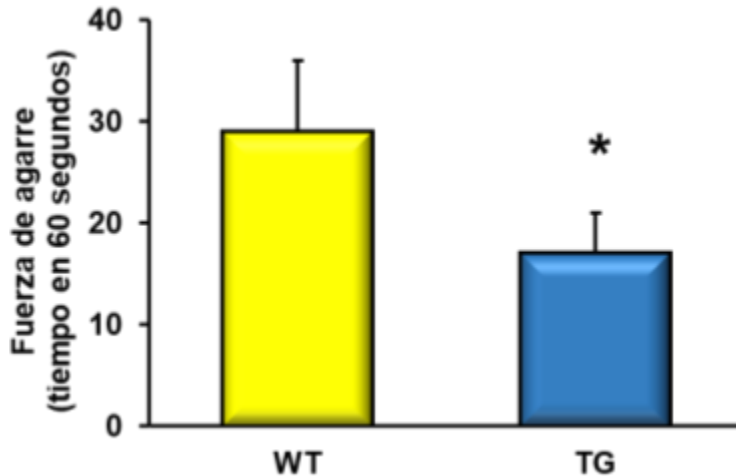


**Figura 54: Número de patas falladas.**

Ratón de tipo salvaje (WT) y ratón transgénico (TG). Los datos representan la media  $\pm$  SD de 25 ratones. \* $p < 0.05$  vs. WT.

### 5.3 FUERZA DE AGARRE DE LOS RATONES

La fuerza de agarre se analizó midiendo el tiempo (60 segundos máximo) que usaban los ratones sin caerse de una barra tras ser colgados de ella. Se pudo observar que había una tendencia a que los ratones de tipo salvaje pudieran permanecer más tiempo sujetos a la barra que los ratones transgénicos, pero este valor no fue significativo (Fig. 55).

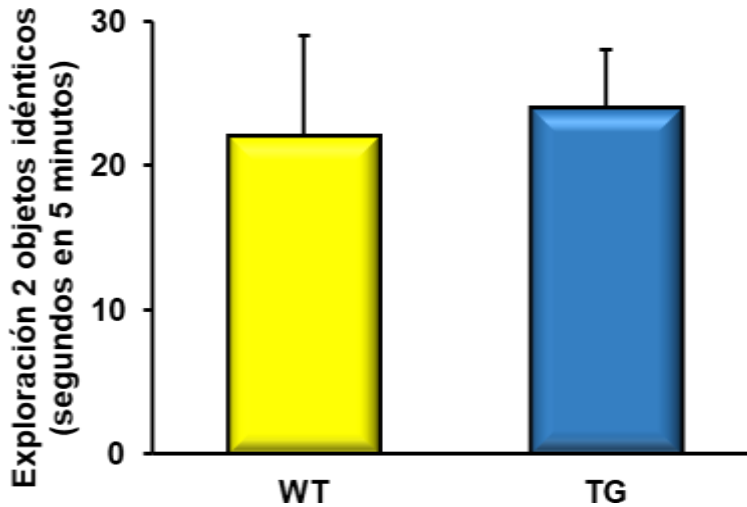


**Figura 55: Exploración de la fuerza de agarre (tiempo en 60 segundos).**

Ratón de tipo salvaje (WT) y ratón transgénico (TG). Los datos representan la media  $\pm$  SD de 25 ratones. \* $P < 0.05$  VS WT.

## 5.4 EXPLORACIÓN DE DOS OBJETOS IDÉNTICOS

Para analizar el comportamiento de los ratones respecto al tiempo de exploración de dos objetos idénticos, se presentaba a los ratones dos tazas idénticas para determinar si exploraban más una taza u otra. Las tazas se encontraban en diferentes localizaciones del espacio a analizar por los ratones. Se midieron los segundos utilizados en 5 minutos. En el caso de los ratones transgénicos y los ratones de tipo salvaje no hubo diferencias significativas, por lo que el tiempo gastado en la exploración fue el mismo en todos los casos ( $\pm 20$  segundos) (Fig. 56).

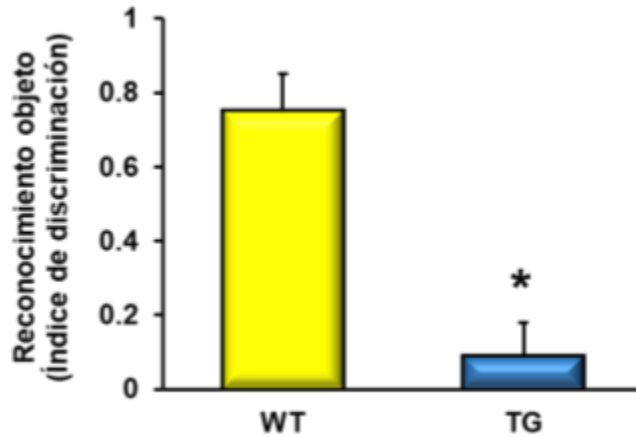


**Figura 56: Exploración de dos objetos idénticos (segundos en 5 minutos).**

Ratón de tipo salvaje (WT) y ratón transgénico (TG). Los datos representan la media  $\pm$  SD de 25 ratones.

## 5.5 RECONOCIMIENTO DE UN OBJETO

Para determinar el índice de discriminación de los dos tipos de ratones, se les presentó una taza dejando el tiempo necesario para su reconocimiento. Posteriormente la taza fue eliminada y tras un breve espacio de tiempo de 10 minutos, se les volvía a presentar el objeto. Se midió el tiempo que tardaban en analizar el objeto. Los ratones de tipo salvaje presentaron un tiempo menor para el análisis del objeto, es decir, su índice de discriminación fue mayor que en los ratones transgénicos (casi 5 veces más) (Fig. 57).

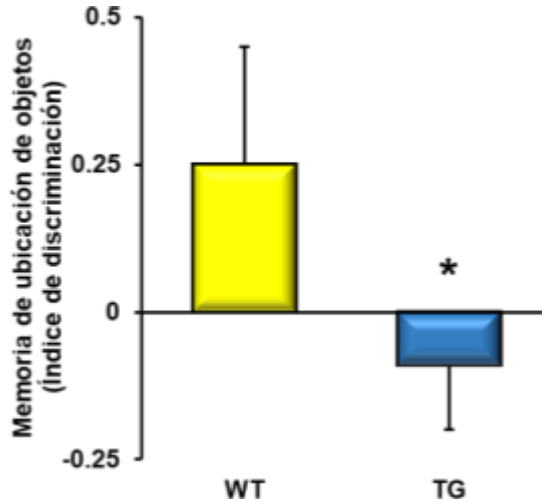


**Figura 57: Reconocimiento de un objeto.**

Ratón de tipo salvaje (WT) y ratón transgénico (TG). Los datos representan la media  $\pm$  SD de 25 ratones. \* $p < 0.05$  vs. WT.

## 5.6 MEMORIA DE UBICACIÓN DE UN OBJETO

En esta prueba a los ratones se les presentaba un objeto que analizaban durante un tiempo. Posteriormente (10 minutos) se cambiaba la posición del objeto en el espacio de análisis y se determinaba el tiempo que gastaba el ratón en el objeto cuando lo encontraba. Los ratones transgénicos gastaban más tiempo, por lo que parecía que la memoria de ubicación del objeto era menor que en los ratones de tipo salvaje. El índice de discriminación fue mayor en los ratones de tipo salvaje con respecto a los ratones transgénicos (Fig. 58).



**Figura 58: Memoria de ubicación de objetos.**

Ratón de tipo salvaje (WT) y ratón transgénico (TG). Los datos representan la media  $\pm$  SD de 25 ratones. \* $p < 0.05$  vs. WT.

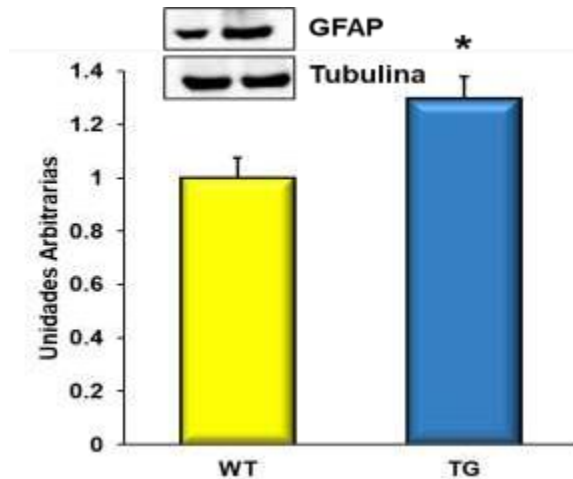
## 5.7 ANÁLISIS FACTORES BIOQUÍMICOS

Las alteraciones en el sistema motor, la memoria y el reconocimiento de objetos pueden estar relacionadas con la inflamación cerebral, la desmielinización y la infiltración celular en ratones APP/PS1.

## 5.8 PROTEÍNA GFAP EN CÓRTEX CEREBRAL

La proteína GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) es característica y exclusiva de los astrocitos, por lo que un aumento en su expresión nos indicaría un aumento en el número de astrocitos. Para determinar los cambios en la

expresión de dicha proteína se utilizó la técnica de Western-blot, tal y como se indica en material y métodos. Los resultados mostraron que la expresión de GFAP fue mayor en la corteza de los ratones APP/PS1 en comparación con los ratones de tipo salvaje (20%) (Fig. 59) lo que podría indicar un aumento significativo en el número de astrocitos en los ratones APP/PS1.



**Figura 59: Expresión de la proteína de GFAP.**

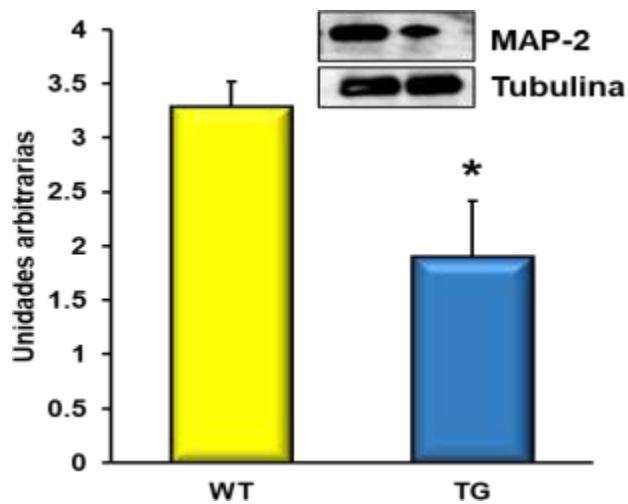
*Expresión mediante Western-blot de la proteína GFAP en córtex de APP/PS1 y ratones de tipo salvaje (WT). Un inmunoblot representativo se muestra en el panel de la gráfica. Los datos representan la media ± SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs. WT*

## 5.9 PROTEÍNA MAP-2 EN CÓRTEX CEREBRAL

En la figura 60 se muestran los cambios en la proteína MAP-2 detectados en ratones de tipo salvaje y ratones APP/PS1. Esta proteína es un marcador de ensamblaje de



microtúbulos en neuronas. Los resultados demuestran una disminución significativa (40% menos) de la expresión de la proteína MAP-2 en ratones APP/PS1 comparando con ratones de tipo salvaje (Fig. 60). Este dato indicaría una disminución del número de neuronas en el córtex cerebral de los ratones transgénicos.



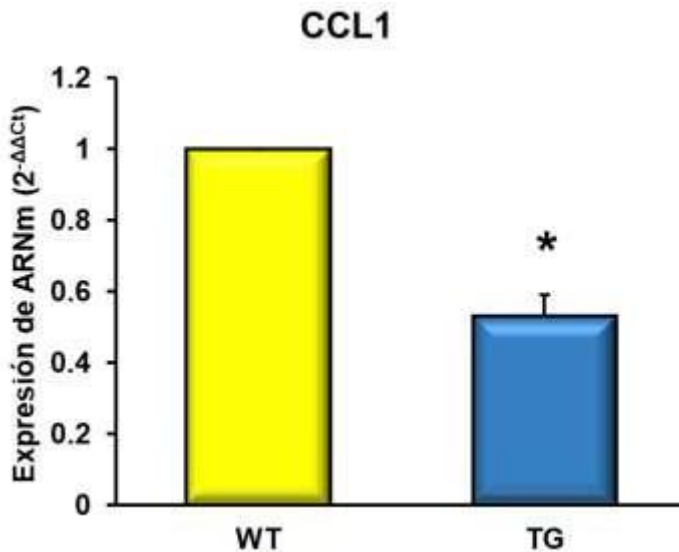
**Figura 60: Expresión de la proteína MAP-2.**

*Expresión mediante Western-blot de la proteína MAP-2 en córtex de APP/PS1 y ratones de tipo salvaje (WT). Un inmunoblot representativo se muestra en el panel de la gráfica. Los datos representan la media ± SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs. WT.*

## 5.10 EXPRESIÓN DE CCL1 EN CORTEZA CEREBRAL

CCL1 juega un papel destacado en varios desórdenes neurodegenerativos y está asociado a problemas neuro

inflamatorios. Para determinar la expresión de ARNm de la quimiocina CCL1 se utilizó la técnica de RT-PCR. La expresión de esta quimiocina fue mayor en los ratones de tipo salvaje en comparación con los ratones APP/PS1 (Fig. 61). La disminución en la expresión de CCL1 fue de un 45% en los ratones APP/PS1 comparado con los ratones de tipo salvaje.



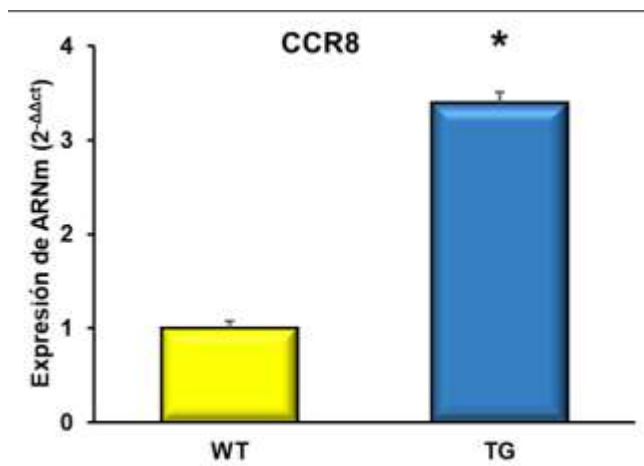
**Figura 61: Expresión de ARNm de CCL1.**

*Expresión de ARNm de CCL1 en córtex de APP/PS1 (TG) y ratones de tipo salvaje (WT). Los datos representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs. WT.*

## 5.11 EXPRESIÓN DE CCR8 EN CORTEZA CEREBRAL

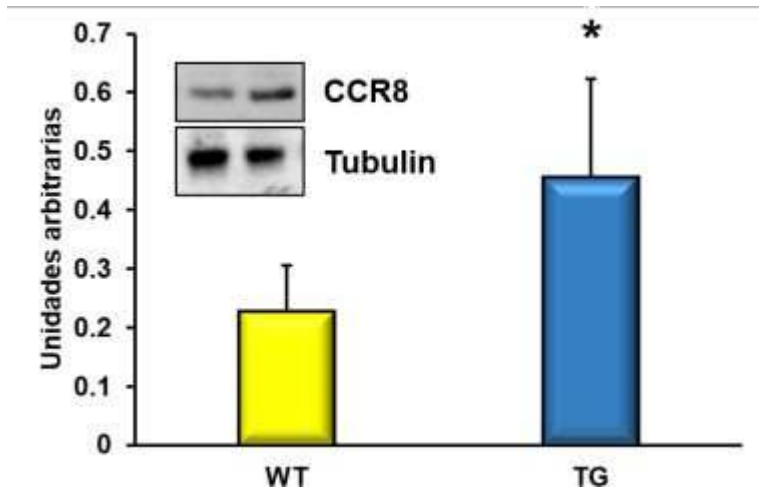
Debido a que la quimiocina CCL1 se une al receptor CCR8 (su receptor específico), se procedió al análisis de la

expresión de este receptor, ya que algunas enfermedades neurodegenerativas presentan disfunciones y desregulaciones de dicho receptor. La figura 62 muestra el análisis de la expresión de CCR8 mediante el uso de la técnica de RT-PCR. CCR8 mostró una expresión más alta en los ratones APP/PS1 en comparación con los ratones de tipo salvaje (Fig. 62). Cabe señalar que la expresión del receptor CCR8 se correlacionó inversamente con la expresión de su quimiocina CCL1 en ratones APP/PS1 (Fig. 63).



**Figura 62: Expresión de ARNm de CCR8.**

Expresión de ARNm de CCR8 en córtex de APP/PS1 (TG) y ratones de tipo salvaje (WT). Los datos representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs. WT.

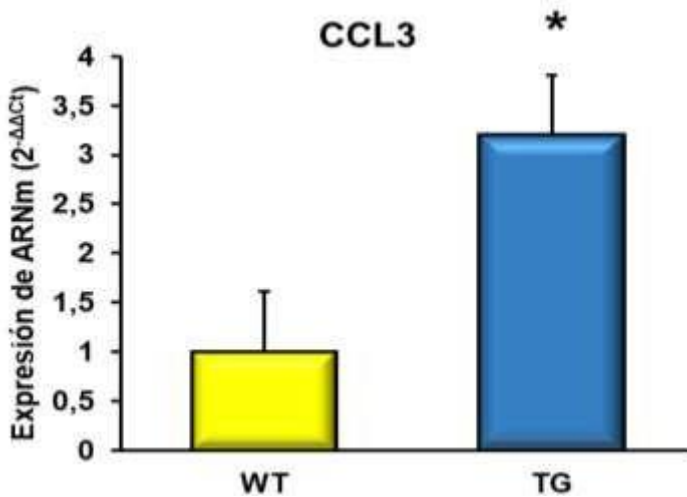


**Figura 63: Expresión de la proteína de CCR8.**

Expresión mediante Western-blot de la proteína CCR8 en córtex de APP/PS1 (TG) y ratones de tipo salvaje (WT). Un inmunoblot representativo se muestra en el panel de la gráfica. Los datos representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs. WT.

## 5.12 EXPRESIÓN DE CCL3 EN CORTEZA CEREBRAL

Para determinar la expresión del ARNm de la quimiocina CCL3 se utilizó la técnica de RT-PCR. La expresión de esta quimiocina fue mayor en los ratones APP/PS1 comparándola con los ratones de tipo salvaje. La expresión de CCL3 fue aproximadamente 3 veces mayor en ratones transgénicos que en los ratones de tipo salvaje (Fig. 64).

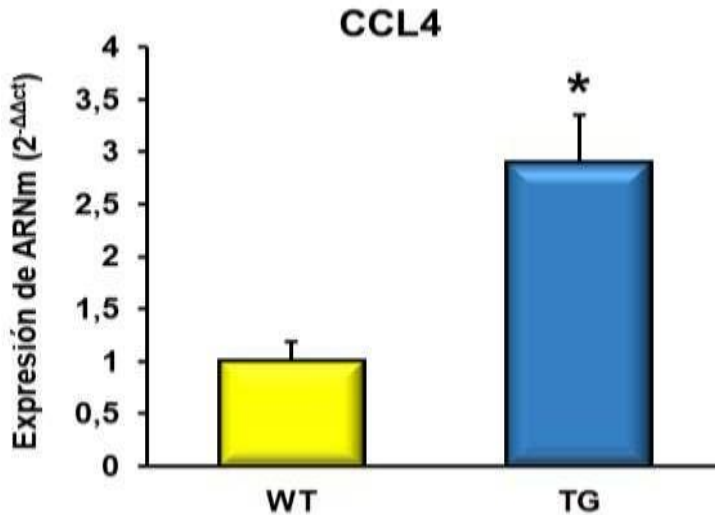


**Figura 64: Expresión de ARNm de CCL3.**

Expresión de ARNm de CCL3 en córtex de APP/PS1 (TG) y ratones de tipo salvaje (WT). Los datos representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs. WT.

### 5.13 EXPRESIÓN DE CCL4 EN CORTEZA CEREBRAL

CCL4 es otra quimiocina que se une al receptor de CCR5, al igual que CCL3 y CCL5. En la figura 65 se determinó la expresión mediante RT-PCR de la quimiocina CCL4. En ratones transgénicos se produce un aumento significativo ( $\pm 3$  veces mayor) en esta quimiocina con respecto a los ratones de tipo salvaje (Fig. 65).

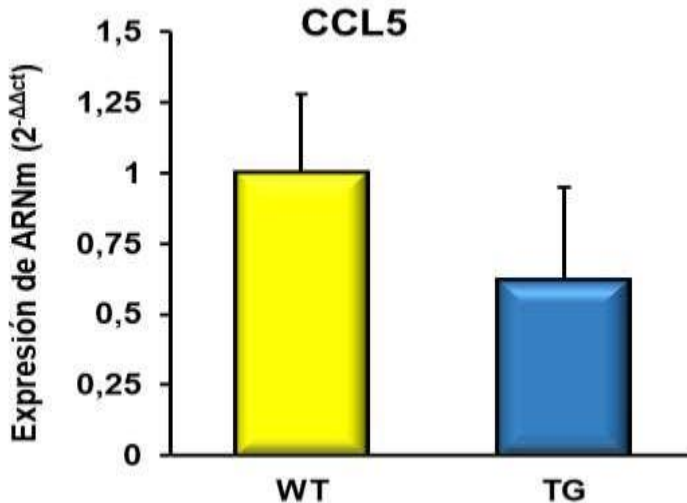


**Figura 65: Expresión de ARNm de CCL4.**

Expresión de ARNm de CCL4 en córtex de APP/PS1 (TG) y ratones de tipo salvaje (WT). Los datos representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs. WT.

#### 5.14 EXPRESIÓN DE CCL5 EN CORTEZA CEREBRAL

Para determinar la expresión de ARNm de la quimiocina CCL5 se utilizó la técnica de RT-PCR. Al contrario que las otras quimiocinas que se unen al receptor CCR5, esta no presentó cambios significativos en su expresión entre ratones APP/PS1 y de tipo salvaje (Fig. 66).



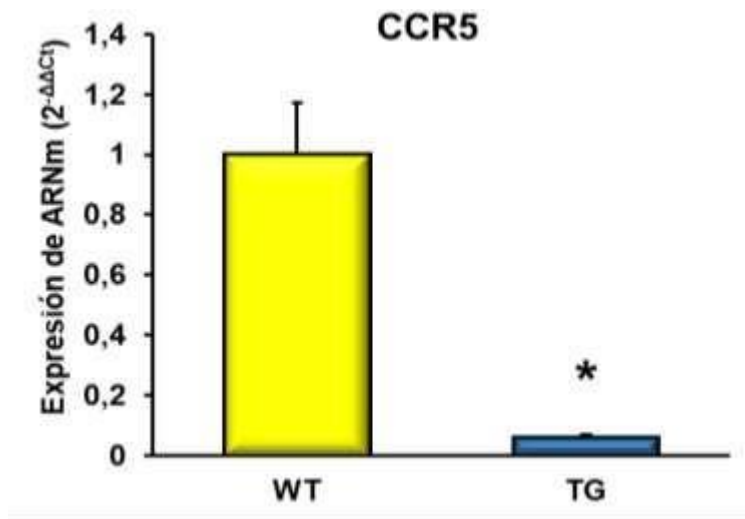
**Figura 66: Expresión de ARNm de CCL5.**

*Expresión de ARNm de CCL5 en córtex de APP/PS1 (TG) y ratones de tipo salvaje (WT). Los datos representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes.*

### 5.15 EXPRESIÓN DE CCR5 EN CORTEZA CEREBRAL

Debido a que las quimiocinas CCL3, CCL4 y CCL5 se unen al receptor CCR5 (su receptor específico), se procedió a analizar la expresión de este receptor. Se realizó RT-PCR en tiempo real y métodos de Western-blot. La figura 67 muestra el análisis de la expresión de CCR5 mediante el uso de la técnica de RT-PCR. CCR5 mostró una disminución de su expresión en ratones APP/PS1 (de más del 90 %), comparado con los ratones de tipo salvaje. El análisis de CCR5 mediante la técnica de Western-blot se presenta en la figura 68. En ella se

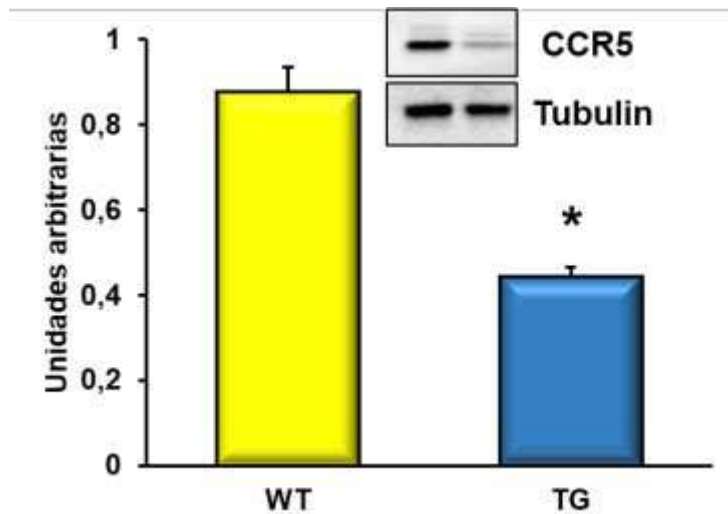
demuestra una disminución significativa ( $\pm 50\%$ ) de esta proteína en las muestras de corteza de los ratones APP/PS1 con respecto a los ratones de tipo salvaje. La expresión de CCR5 se correlacionó inversamente con la expresión de CCL3 y CCL4 en muestras de corteza de ratones APP/PS1.



**Figura 67: Expresión de ARNm de CCR5.**

Expresión de ARNm de CCR5 en córtex de APP/PS1 (TG) y ratones de tipo salvaje (WT). Los datos representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs. WT.





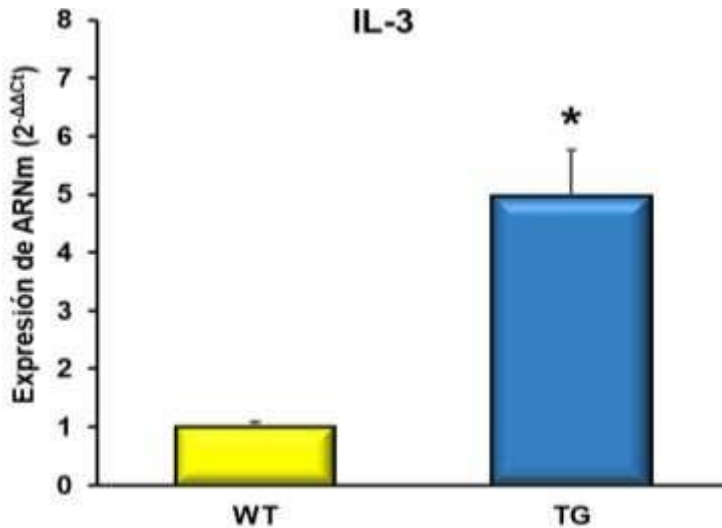
**Figura 68: Expresión de la proteína de CCR5.**

Expresión mediante Western-blot de la proteína CCR5 en córtex de APP/PS1 (TG) y ratones de tipo salvaje (WT). Un inmunoblot representativo se muestra en el panel de la gráfica. Los datos representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs. WT.

## 5.16 EXPRESIÓN DE IL-3 EN CORTEZA CEREBRAL

La citocina IL-3 regula la proliferación, supervivencia y diferenciación de las células hematopoyéticas y se ha detectado en el SNC, pero su papel fisiológico en las células neurales es poco conocido en la enfermedad de Alzheimer. La IL-3 previene la muerte neuronal inducida por A $\beta$  y se ha detectado una mayor expresión en la EA, lo que demuestra que la IL-3 podría desempeñar un papel neuroprotector frente a esta enfermedad. En la figura 69, se muestra un aumento significativo de la expresión de IL-3 en APP/PS1 en

comparación con ratones de tipo salvaje, que podría apoyar los datos detectados en la EA anteriormente mencionados (Fig. 69).



**Figura 69: Expresión de ARNm de IL-3.**

*Expresión de ARNm de IL-3 en córtex de APP/PS1 (TG) y ratones de tipo salvaje (WT). Los datos representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs. WT.*

## 5.17 EXPRESIÓN DE ABCF1 EN CORTEZA CEREBRAL

La ABCF1 (superfamilia de proteínas del casete de unión al ATP (ABC)) se encuentra en el cerebro y aprovecha la energía de la hidrólisis del ATP para transportar sustratos a través de las membranas celulares y alimentar la maquinaria celular. ABCF1 puede importar y exportar moléculas a través

de la célula e inicialmente se identificó como una proteína sobre expresada en los sinoviocitos. Además, ABCF1 es importante en el inicio de la traducción génica. Por ello, se determinó su expresión, siendo mayor en los ratones APP/PS1 en comparación con los ratones de tipo salvaje (3x) (Fig. 70).

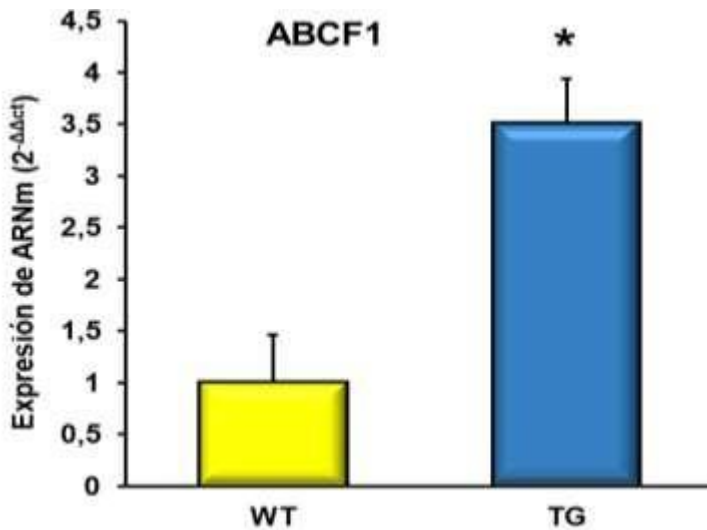


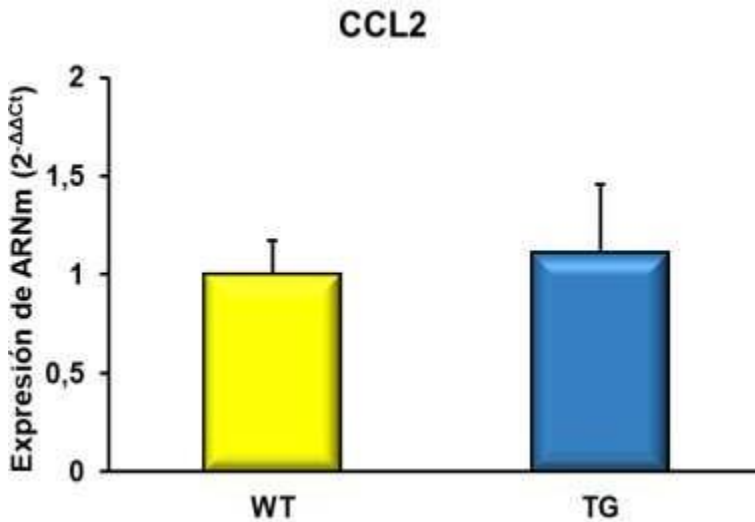
Figura 70: Expresión de ARNm de ABCF1.

Expresión de ARNm de ABCF1 en córtex de APP/PS1 (TG) y ratones de tipo salvaje (WT). Los datos representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs. WT

## 5.18 EXPRESIÓN DE CCL2 EN CORTEZA CEREBRAL

Para determinar la expresión de las quimiocinas envueltas en la quimiotaxis se determinó CCL2, CCL7 y CCL12. La figura 71 muestra que no existen diferencias

significativas, entre el ratón de tipo salvaje y el ratón transgénico, en lo que respecta a la expresión de la quimiocina CCL2.

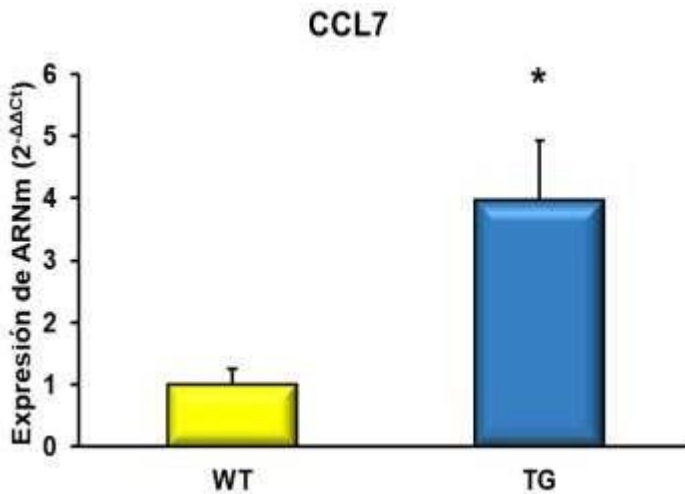


**Figura 71: Expresión de ARNm de CCL2.**

*Expresión de ARNm de CCL2 en córtex de APP/PS1 (TG) y ratones de tipo salvaje (WT). Los datos representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes.*

## 5.19 EXPRESIÓN DE CCL7 EN CORTEZA CEREBRAL

La figura 72 muestra los cambios en la expresión de ARNm de la quimiocina CCL7 medida en córtex de cerebro de ratones APP/PS1 y de tipo salvaje. Se observa un aumento significativo (4x) de la quimiocina CCL7 en los ratones transgénicos comparados con los ratones de tipo salvaje.

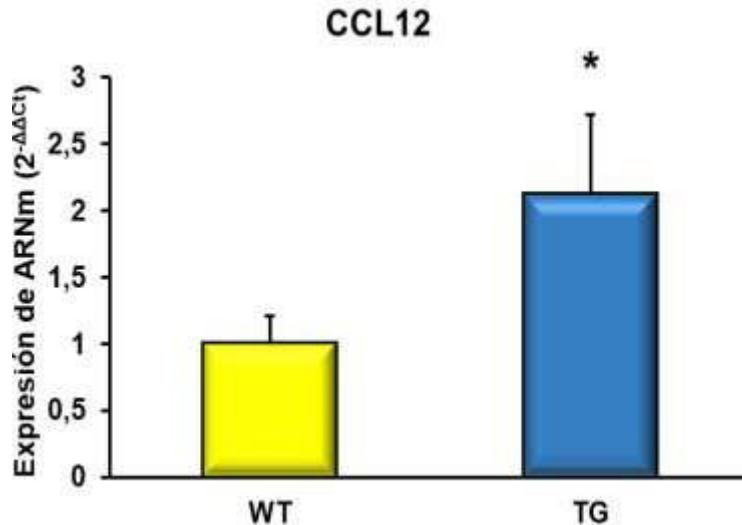


**Figura 72: Expresión de ARNm de CCL7.**

*Expresión de ARNm de CCL7 en córtex de APP/PS1 (TG) y ratones de tipo salvaje (WT). Los datos representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs. WT.*

## 5.20 EXPRESIÓN DE CCL12 EN CORTEZA CEREBRAL

Para determinar la expresión de la quimiocina CCL12 se determinó mediante RT-PCR su valor en los ratones de tipo salvaje y los ratones transgénicos. En la figura 73 podemos apreciar un incremento significativo de la expresión de esta quimiocina en las muestras de corteza cerebral de los ratones APP/PS1 con respecto a los ratones de tipo salvaje ( $\pm 2.2x$ ).



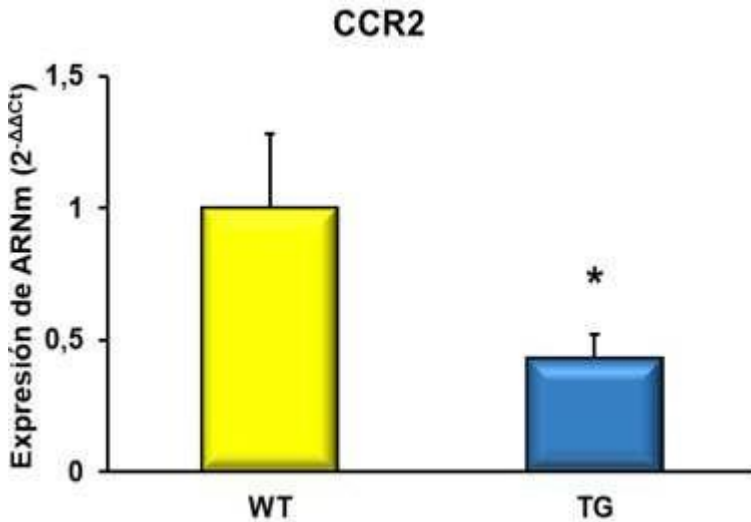
**Figura 73: Expresión de ARNm de CCL12.**

Expresión de ARNm de CCL12 en córtex de APP/PS1 (TG) y ratones de tipo salvaje (WT). Los datos representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs. WT.

## 5.21 EXPRESIÓN DE CCR2 EN CORTEZA CEREBRAL

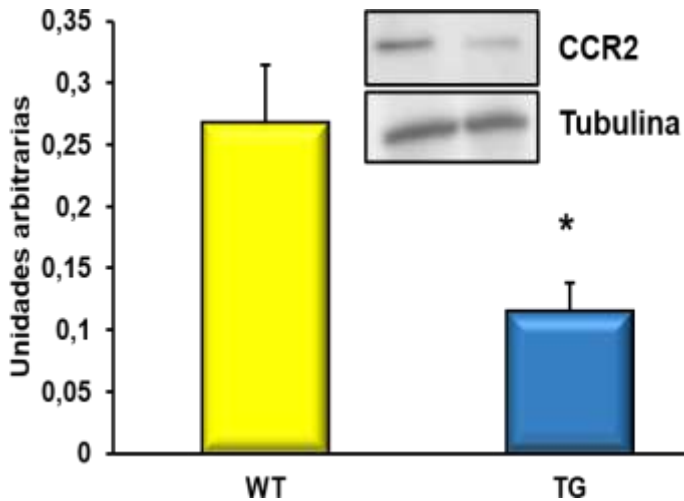
Las quimiocinas CCL2, CCL7 y CCL12 se unen al receptor CCR2 y producen cambios relacionados con diferentes enfermedades. En la figura 74, se analizó la expresión del ARNm del receptor CCR2. Observamos un 50% de disminución de la expresión en los ratones transgénicos comparando con los ratones de tipo salvaje. El análisis de CCR2 mediante Western-blot se presenta en la figura 75. En ella se demuestra una disminución significativa de esta proteína en las muestras de corteza de los ratones APP/PS1 con respecto a los ratones de tipo salvaje. La expresión de

CCR2 se correlacionó inversamente con la expresión de CCL7 y CCL12 en muestras de corteza de ratones APP/PS1.



**Figura 74: Expresión de ARNm de CCR2.**

Expresión de ARNm de CCR2 en córtex de APP/PS1 (TG) y ratones de tipo salvaje (WT). Los datos representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs. WT.



**Figura 75: Expresión de la proteína de CCR2.**

Expresión mediante Western-blot de la proteína CCR2 en córtex de APP/PS1 (TG) y ratones de tipo salvaje (WT). Un inmunoblot representativo se muestra en el panel de la gráfica. Los datos representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs. WT.

## 5.22 EXPRESIÓN DE CCL17 EN CORTEZA CEREBRAL

Para analizar proteínas que intervienen en la regulación, proliferación, supervivencia y diferenciación de las células hematopoyéticas, decidimos investigar los cambios en la expresión de las quimiocinas CCL17 y CCL22, ya que se han encontrado sobre expresadas en los pacientes con deterioro cognitivo. En la figura 76 detectamos un aumento significativo (4x) de la expresión del ARNm de la quimiocina CCL17 en los ratones transgénicos comparando con la expresión en los de tipo salvaje.

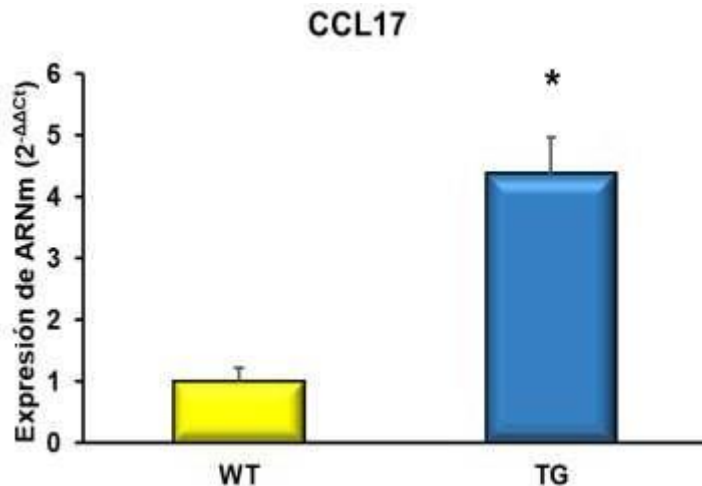


Figura 76: Expresión de ARNm de CCL17.



Expresión de ARNm de CCL17 en córtex de APP/PS1 (TG) y ratones de tipo salvaje (WT). Los datos representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs. WT.

### 5.23 EXPRESIÓN DE CCL22 EN CORTEZA CEREBRAL

La figura 77 demuestra un aumento significativo de la expresión del ARNm de la quimiocina CCL22 en las muestras de corteza cerebral de los ratones transgénicos comparando con los ratones de tipo salvaje. Por lo que ambas quimiocinas, CCL22 y CCL17 siguen el mismo patrón de expresión.

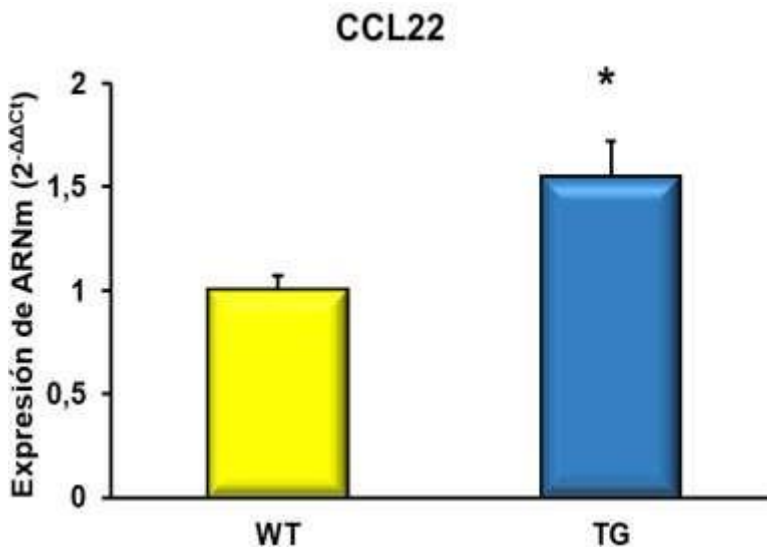


Figura 77: Expresión de ARNm de CCL22.

Expresión de ARNm de CCL22 en córtex de APP/PS1 (TG) y ratones de tipo salvaje (WT). Los datos representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs. WT.

## 5.24 EXPRESIÓN DE CCR4 EN CORTEZA CEREBRAL

Las quimiocinas CCL17 y CCL22 se unen al receptor CCR4. En la figura 78, se muestra la expresión del ARNm del receptor CCR4. Observamos un aumento significativo (2.25x) en la expresión de esta quimiocina en los ratones transgénicos con respecto a los ratones de tipo salvaje.

El análisis de CCR4 mediante la técnica de Western-blot se muestra en la figura 79. Se observa un aumento significativo (40%) de la expresión proteica del receptor CCR4 en los ratones transgénicos con respecto a los ratones de tipo salvaje. La expresión de CCR4 se correlacionó directamente con la expresión de CCL17 y CCL22 en muestras de corteza de ratones APP/PS1.

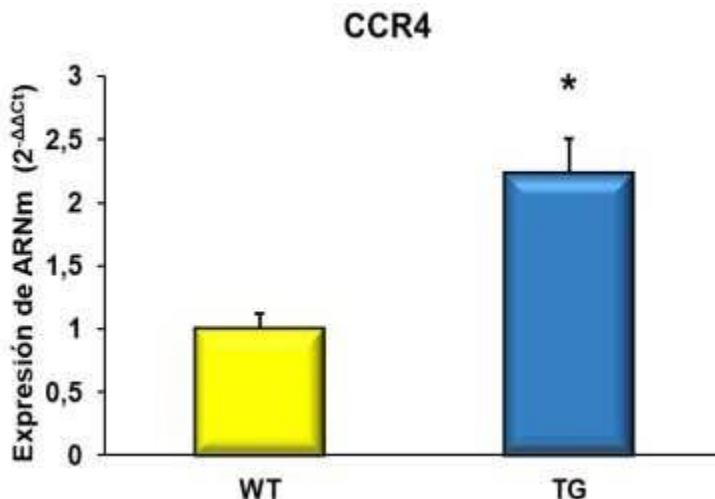
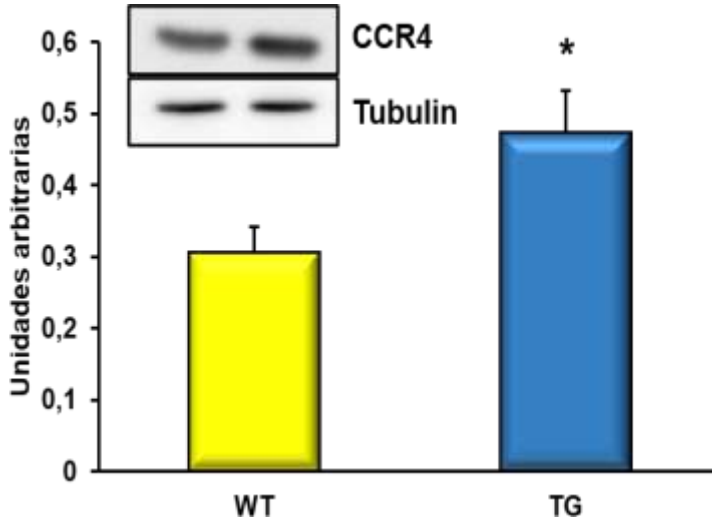


Figura 78: Expresión de ARNm de CCR4.

Expresión de ARNm de CCR4 en córtex de APP/PS1 (TG) y ratones de tipo salvaje (WT). Los datos representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs. WT.

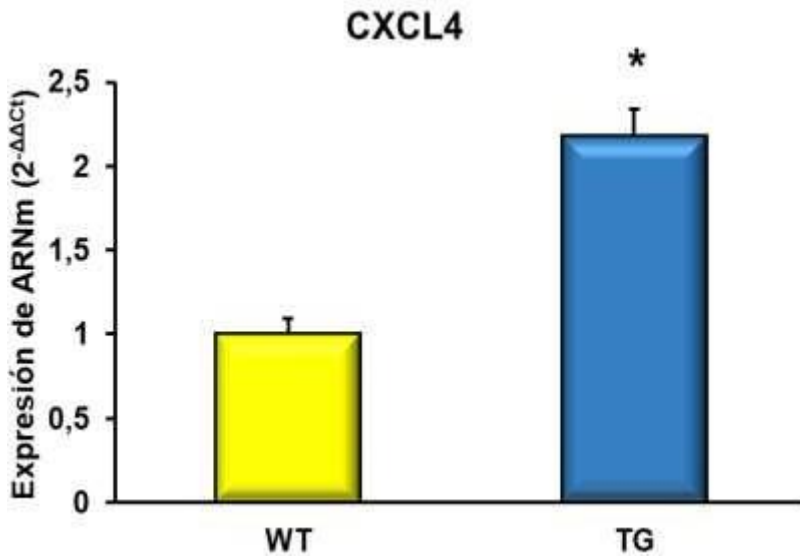


**Figura 79: Expresión de la proteína de CCR4.**

Expresión mediante Western-blot de la proteína CCR4 en córtex de APP/PS1 (TG) y ratones de tipo salvaje (WT). Un inmunoblot representativo se muestra en el panel de la gráfica. Los datos representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs. WT.

## 5.25 EXPRESIÓN DE CXCL4 EN CORTEZA CEREBRAL

Debido a que CCR1 es un marcador específico de la EA, se determinó la expresión de la quimiocina CXCL4 y su receptor. La figura 80 muestra los cambios en la expresión del ARNm de la quimiocina CXCL4. Los ratones transgénicos presentaron un aumento significativo (2x) de esta quimiocina con respecto a los ratones de tipo salvaje (Fig. 80).

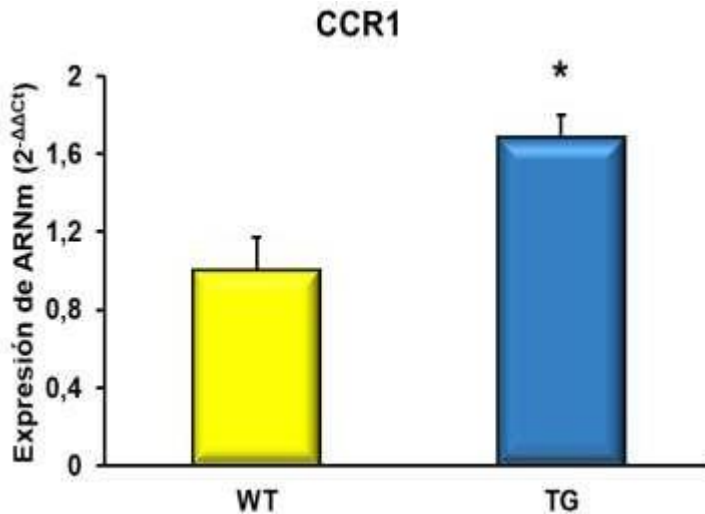


**Figura 80: Expresión de ARNm de CXCL4.**

Expresión de ARNm de CXCL4 en córtex de APP/PS1 (TG) y ratones de tipo salvaje (WT). Los datos representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs. WT.

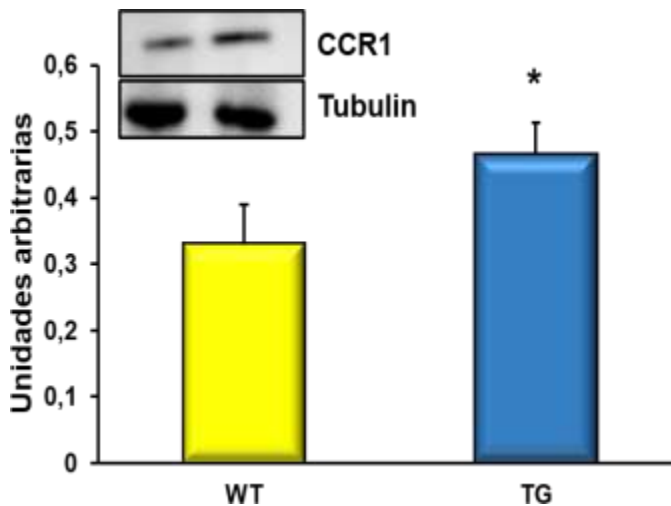
## 5.26 EXPRESIÓN DE CCR1 EN CORTEZA CEREBRAL

En la figura 81, se muestra la expresión del ARNm del receptor CCR1. Se observa un aumento significativo ( $\pm 70\%$ ) en la expresión de esta quimiocina en los ratones transgénicos con respecto a los ratones de tipo salvaje. La figura 82 muestra la expresión de CCR1 mediante la técnica de Western-blot. Un aumento significativo de  $\pm 41\%$  se detectó en las muestras de los ratones transgénicos comparándolos con los ratones de tipo salvaje.



**Figura 81: Expresión de ARNm de CCR1.**

Expresión de ARNm de CCR1 en córtex de APP/PS1 (TG) y ratones de tipo salvaje (WT). Los datos representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs. WT.

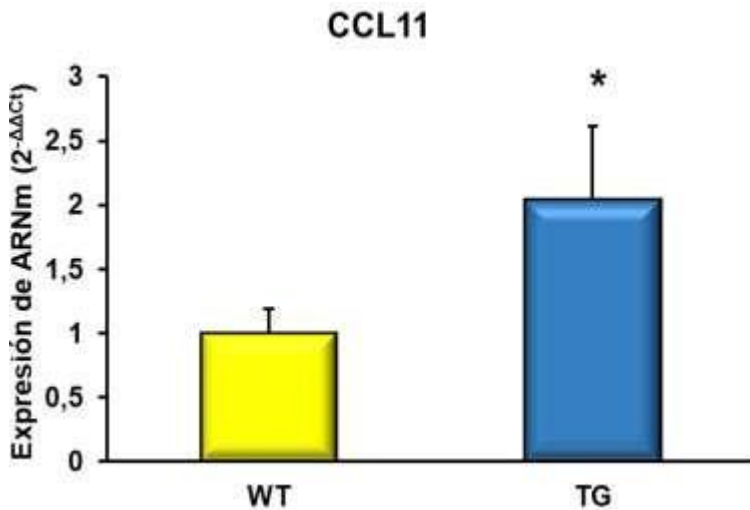


**Figura 82: Expresión de ARNm de CCR1.**

Expresión mediante Western-blot de la proteína CCR1 en córtex de APP/PS1 (TG) y ratones de tipo salvaje (WT). Un inmunoblot representativo se muestra en el panel de la gráfica. Los datos representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs. WT.

## 5.27 EXPRESIÓN DE CCL11 EN CORTEZA CEREBRAL

La figura 83 muestra la expresión del ARNm de la quimiocina CCL11. Según muestra la figura, se produjo un aumento significativo ( $\pm 2x$ ) de esta quimiocina en las muestras de los ratones transgénicos en comparación con las de tipo salvaje.

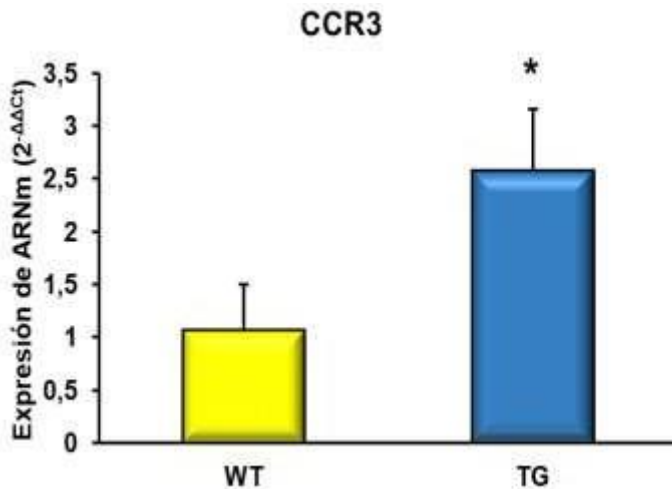


**Figura 83: Expresión de ARNm de CCL11.**

*Expresión de ARNm de CCL11 en córtex de APP/PS1 (TG) y ratones de tipo salvaje (WT). Los datos representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs. WT.*

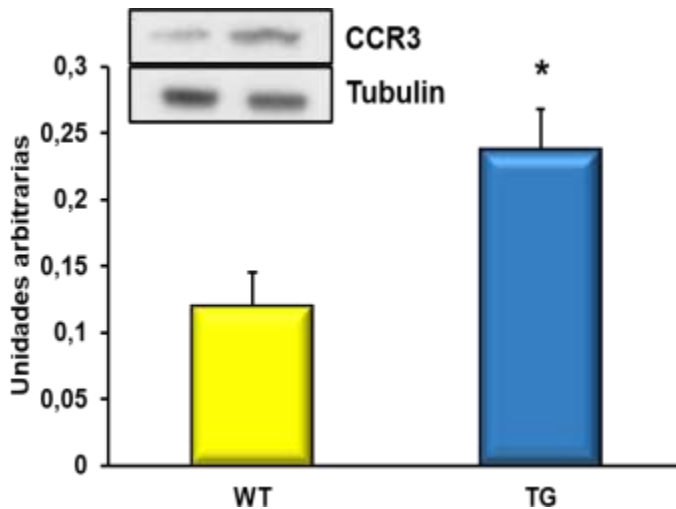
## 5.28 EXPRESIÓN DE CCR3 EN CORTEZA CEREBRAL

En la figura 84, se muestra la expresión del ARNm del receptor CCR3. Se observó un aumento significativo ( $\pm 2.5x$ ) en la expresión de esta quimiocina en los ratones transgénicos con respecto a los ratones de tipo salvaje. La figura 85 muestra la expresión de CCR3 mediante la técnica de Western-blot. Un aumento significativo de ( $\pm 2x$ ) se detectó en las muestras de los ratones transgénicos comparándolos con los ratones de tipo salvaje.



**Figura 84: Expresión de ARNm de CCR3.**

*Expresión de ARNm de CCR3 en córtex de APP/PS1 (TG) y ratones de tipo salvaje (WT). Los datos representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs. WT.*



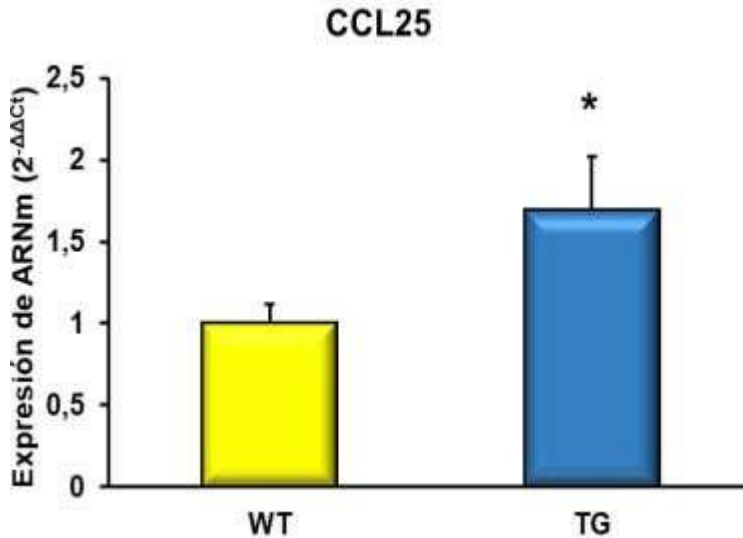
**Figura 85: Expresión de la proteína de CCR3.**

Expresión mediante Western-blot de la proteína CCR3 en córtex de APP/PS1 (TG) y ratones de tipo salvaje (WT). Un inmunoblot representativo se muestra en el panel de la gráfica. Los datos representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs. WT.

## 5.29 EXPRESIÓN DE CCL25 EN CORTEZA CEREBRAL

La quimiocina CCL25 es un marcador de degeneración cognitiva en pacientes con deterioro cognitivo leve y en modelos animales. En la figura 86 se midió los cambios en la expresión de ARNm de los ratones de tipo salvaje y los de APP/PS1. Se detectó un incremento significativo (70%) en la expresión de CCL25 en los ratones transgénicos con respecto a los ratones de tipo salvaje (Fig. 86).



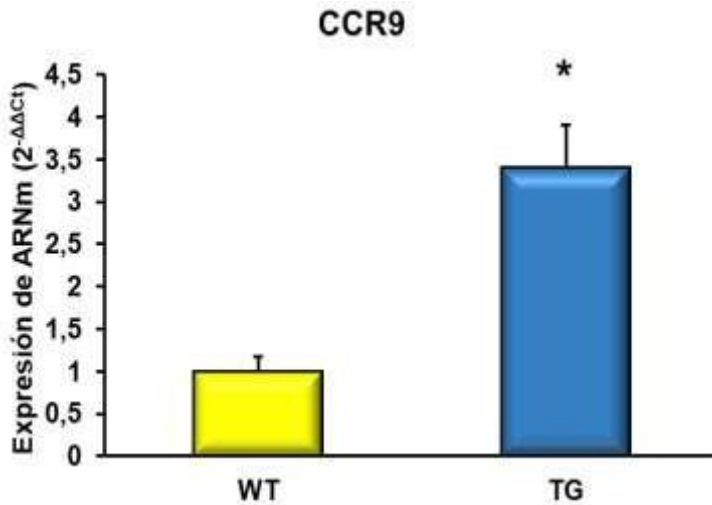


**Figura 86: Expresión de ARNm de CCL25.**

Expresión de ARNm de CCL25 en córtex de APP/PS1 (TG) y ratones de tipo salvaje (WT). Los datos representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs. WT.

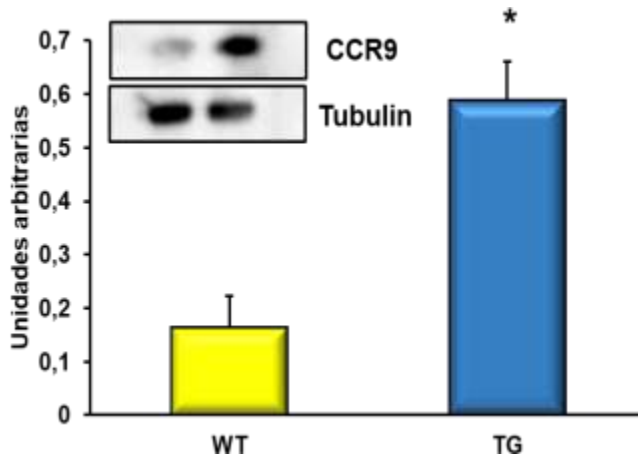
### 5.30 EXPRESIÓN DE CCR9 EN CORTEZA CEREBRAL

En la figura 87, se muestra la expresión del ARNm del receptor CCR9. Se observó un aumento significativo ( $\pm 3x$ ) en la expresión de esta quimiocina en los ratones transgénicos con respecto a los ratones de tipo salvaje. La figura 88 muestra la expresión de CCR9 mediante la técnica de Western-blot. Un aumento significativo ( $\pm 3.5x$ ) se detectó en las muestras de los ratones transgénicos comparándolos con los ratones de tipo salvaje.



**Figura 87: Expresión de ARNm de CCR9.**

Expresión de ARNm de CCR9 en córtex de APP/PS1 (TG) y ratones de tipo salvaje (WT). Los datos representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs. WT.



**Figura 88: Expresión de la proteína de CCR9.**

Expresión mediante Western-blot de la proteína CCR9 en córtex de APP/PS1 (TG) y ratones de tipo salvaje (WT). Un inmunoblot representativo se muestra en el panel de la gráfica. Los datos representan la media  $\pm$  SD de cuatro experimentos independientes. \* $p < 0.05$  vs. WT.

## **DISCUSIÓN**



## 6. DISCUSIÓN

Se ha demostrado que el péptido A $\beta$  causa estrés oxidativo en las neuronas (Vallés et al., 2008) y en astrocitos en cultivo primario (Valles et al., 2010). Además, existe un mecanismo importante para atacar objetivos opsonizados, mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) realizado por células inflamatorias. Por otro lado, las células gliales activadas pueden producir grandes cantidades de ROS/RNS por varios mecanismos (X. Zhu et al., 2007).

Los ratones APP/PS1 son un modelo animal para el estudio de la enfermedad de Alzheimer. Según nuestros datos, en estos ratones los déficits de comportamiento no son detectados hasta una edad avanzada ( $\pm$  24 meses). Los resultados de esta tesis indican que las alteraciones en la corteza de los ratones APP/PS1 de 7 meses tienen lugar con anterioridad a que se produzcan déficits en el comportamiento. Los resultados mostraron que los ratones transgénicos (APP/PS1) (22-24-meses) presentaban una descoordinación severa motora y deterioro amnésico patente tanto en la memoria de reconocimiento de objetos como en la ubicación de dichos objetos. Por el contrario, los experimentos de comportamiento con ratones de 7 meses no mostraron cambios entre ratones transgénicos y de tipo salvaje.

Uno de los objetivos de esta tesis fue evaluar si en los ratones APP/PS1 podía existir una desregulación de la expresión de ciertas quimiocinas involucradas en la desmielinización, fagocitosis y quimiotaxis. Se realizaron los estudios en ratones de 7 meses, ya que a esa edad se pueden apreciar cambios significativamente en comparación con los animales de 24 meses de edad, donde se produce una destrucción neuronal importante y una inflamación crónica. Por otra parte, se analizó la corteza de estos ratones porque esta es la segunda región del cerebro más afectada cuando la memoria se encuentra dañada.

Nuestros resultados demuestran una disminución en la expresión de CCL1 y un aumento de la expresión de su receptor CCR8 en los ratones transgénicos en comparación con los ratones de tipo salvaje. Además, existe una expresión incrementada de las quimiocinas CCL3 y CCL4 con reducción de la expresión de su receptor CCR5 en los ratones APP/PS1 en comparación con los ratones de tipo salvaje. El gen de CCR8 codifica para uno de los receptores perteneciente a la familia de receptores de quimiocinas  $\beta$ , cuyo ligando es la quimiocina CCL1 (Garlisi et al., 1999). En esta tesis se demuestra que se producen cambios significativos en la expresión de CCR8 y su quimiocina CCL1, en los ratones APP/PS1 comparando con los ratones de tipo salvaje. La expresión de CCR8 aumentó en ratones transgénicos

indicando un mecanismo de compensación respecto a la disminución detectada en su quimiocina CCL1. CCL1 es una proteína que atrae a las células inmunitarias interactuando con el receptor de quimiocinas de la superficie celular CCR8 (Oshio et al., 2014) y contribuye al desarrollo del dolor neuropático (Akimoto, Honda, et al., 2013). La expresión de CCR8 está controlada por factores específicos dérmicos derivados de los queratinocitos de la epidermis y no por células dendríticas presentes en la piel. Además, este receptor también se expresa en neuronas, microglía y astrocitos (Akimoto, Ifuku, et al., 2013) y se sabe que produce una acumulación de células microgliales en el SNC de los ratones APP/PS1. (Akimoto, Ifuku, et al., 2013). Este dato se encuentra relacionado con la función que realizan las células mononucleares en la quimiotaxis y en la fagocitosis (Napoli & Neumann, 2009).

Trebst y sus colaboradores, han sugerido que CCR8 no se expresa en los macrófagos que rodean las placas seniles en la enfermedad de Alzheimer (Trebst et al., 2003). Sus datos incluyen estudios de tejido humano con EA, mientras que nuestros resultados se obtuvieron en ratones APP/PS1 de 7 meses (correspondiente a una edad alrededor de 30 años en humanos). A esta edad, las placas  $A\beta_{1-42}$  son también detectadas al igual que en personas de edad avanzada, pero el mecanismo de eliminación por fagocitosis de las placas amiloideas se encuentra en estado óptimo y por lo tanto estas

placas son eliminadas. Por otra parte, puede ocurrir que exista una disminución en la expresión de CCR8 cuando la EA se ha desarrollado. La combinación de  $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D3 y la prostaglandina E2 (PGE2) dan como resultado una alta expresión de CCR8, lo que demuestra la importancia de los entornos tisulares en el mantenimiento celular de redes de vigilancia inmunitaria, dentro de distintos tejidos (McCully et al., 2015). Este receptor también se expresa en cultivos primarios de microglía y astrocitos. Además, el ARNm de la quimiocina CCL1, se expresa de manera más sólida en las neuronas que en la glía (Akimoto, Ifuku, et al., 2013). Estos datos podrían indicar que CCL1 funciona como un mediador entre la neurona, el astrocito y la microglía dentro del SNC. De esta forma, una disminución en la expresión de CCL1, tal como observamos en nuestros resultados, podría indicar una reducción en la comunicación entre neuronas y glía y también una disminución en la densidad neuronal en ratones APP/PS1, como mostramos, por una reducción de la expresión de MAP-2 (proteína característica de las neuronas).

Se sabe que la inflamación es una característica importante en la enfermedad de Alzheimer con una producción de citocinas y quimiocinas que inducen progresión de la cascada inflamatoria (Gorelick, 2010; Perry et al., 2007). Por otra parte, se ha demostrado que, en un modelo de ratón con neuropatía diabética, la estimulación por lipopolisacáridos



bacterianos (LPS) en cultivos primarios de microglía produce una disminución de los niveles de CCL1, indicando que la falta de insulina, que produce daño neural, podría ocasionar disminución de ciertas quimiocinas involucradas en la inflamación cerebral y disminuir la protección frente a ataques bacterianos e incluso víricos (Zychowska et al., 2017). Los resultados expuestos en esta tesis, apoyan la hipótesis de que CCL1 presenta un papel importante como mediador en las interacciones neuro-inmunes y que la unión e interacción del receptor a la quimiocina (CCL1/CCR8) contribuye al desarrollo de la inflamación en la EA. Otra función clave y muy importante sobre CCL1 es su papel en la fagocitosis microglial y astrocítica eliminando moléculas neurotóxicas, desechos celulares y/o microbios en el entorno celular (Trebst et al., 2003). La disminución en la expresión de CCL1 podría explicar la disminución en la eliminación del A $\beta$  por fagocitosis detectada en la EA (Takata et al., 2018). Respecto al ARNm y a la proteína del receptor CCR8, este se encuentra sobreexpresado en ratas Taiep de 1 mes de edad. Esto explicaría la acumulación de células microgliales en el sistema nervioso central producida por la inducción de los procesos de quimiotaxis y fagocitosis (Soto-Rodriguez et al., 2015).

El volumen del cerebro humano presenta variaciones importantes sobre todo con la edad. El aumento en la expresión de la citoquina interleucina-3 (IL-3) está fuertemente asociado

con cambios en el volumen cerebral (Luo et al., 2012). Esta citoquina se une al receptor IL-3- $\alpha$  que se expresa en los progenitores neurales (astrocitos y oligodendroglía) y en las neuronas promoviendo la proliferación y la supervivencia de las células neurales en desarrollo (Luo et al., 2012) produciéndose una nueva función clave para esta citoquina. Nuestros resultados demuestran que esta citoquina está altamente expresada en el ratón APP/PS1 indicando cambios en el volumen cerebral lo que se ve confirmado por estudios previos (Luo et al., 2012). Además, en las lesiones cerebrales detectadas en la esclerosis múltiple se ha demostrado, mediante análisis de transcripción, que existe una correlación clara entre IL-3 y el receptor CCR8, indicando un patrón complejo en la expresión de esta citoquina en esta enfermedad (Baranzini et al., 2000). Tanto es así, que en la tuberculosis severa se observa un aumento significativo en la expresión de la citoquina IL-3 con un incremento también del receptor CCR5 (Qiu et al., 2008). La desmielinización que nosotros detectamos debe ser debido a un aumento en CCR8, como han sugerido diferentes autores y nuestros datos (Fig. 63).

CCR5 es un receptor que se encuentra expresado en neuronas que intervienen en la memoria, en monocitos, macrófagos, astrocitos y microglía. Por otra parte, se ha detectado fuera del sistema nervioso y concretamente en la piel, el endotelio, la musculatura lisa vascular y en los

fibroblastos (Corbeau & Reynes, 2009). Los ligandos envueltos en las respuestas efectoras de este receptor son las citoquinas proinflamatorias CCL3, CCL4 y CCL5 (Trifilo et al., 2003). Nuestros resultados demuestran una expresión disminuida del receptor CCR5 en los ratones APP/PS1, junto con un aumento significativo de la expresión de CCL3 y CCL4. Cabe destacar, que de las tres quimiocinas anteriormente mencionadas no observamos cambios significativos en CCL5 en los ratones de tipo salvaje en comparación con los ratones transgénicos. El papel que juega CCR5 en las células y en la enfermedad se ha estudiado ampliamente en el virus VIH (virus de la inmunodeficiencia humana) (Venuti et al., 2017). De hecho, en 1996, grupos pertenecientes a diferentes laboratorios publicaron que CCR5 es el principal correceptor para la entrada del VIH al interior de las células diana (Alkhatib et al., 1996; Choe et al., 1996; H. Deng et al., 1996), expresándose también en el SNC (Bajetto et al., 2001; Cartier et al., 2005; Rostène et al., 2007) e interviniendo en la modulación de la respuesta inmune. Por otra parte, este receptor puede intervenir en la supervivencia neuronal y se ha sugerido que podría tener un papel en los mecanismos de neuroprotección (Sorce et al., 2011), debido a que la muerte celular en el cerebro de los ratones CCR5<sup>-/-</sup> es significativamente mayor que en las células cerebrales de los ratones CCR5<sup>+/+</sup> (Kaul et al., 2007). En estos ratones se presenta también, un aumento de astrocitos

reactivos sugiriendo una activación astrocítica, y por lo tanto inflamatoria, cuando hay una eliminación génica del receptor CCR5. Además, durante el desarrollo, CCR5 se encuentra implicado en el crecimiento neuronal y en la diferenciación celular y está relacionado con la liberación de dopamina en el estriado (Hwang et al., 2016). Diferentes autores han indicado que la eliminación de CCR5 podría estar implicada en una deficiencia en las neuronas dopaminérgicas tanto en su desarrollo como en su maduración. Por otra parte, podría prevenir la desmielinización y la infiltración de macrófagos al SNC (Choi et al., 2013; Glass et al., 2001). Respecto a los depósitos de A $\beta$ , Hwang y sus colaboradores han demostrado un aumento de estos con una disminución en la memoria y un aumento de la muerte celular cuando se produce una disminución de CCR5 en pacientes con EA (Hwang et al., 2016). En los ratones knockout para CCR5, la inyección de LPS aumentó significativamente la astrogliosis, la expresión de  $\beta$ -secretasa y el depósito de A $\beta$  comparado con los ratones CCR5 control. Asimismo, la deficiencia de CCR5 causa la activación de los astrocitos y el aumento de depósitos de A $\beta$  (Hwang et al., 2016).

En nuestros resultados detectamos un aumento de la expresión de las quimiocinas CCL3 y CCL4 en la corteza de ratones APP/PS1 de 7 meses de edad. Hay dos posibilidades por las que esto es así. Bien porque el incremento de las

quimiocinas CCL3 y CCL4 ocurrido primeramente podría tener como consecuencia la disminución de la expresión de CCR5 o, por el contrario, si primeramente ocurre disminución en la expresión de CCR5, en segundo lugar, se podría dar un incremento de la expresión de las quimiocinas CCL3 y CCL4. De acuerdo con nuestros datos, no podemos deducir cuál es la secuencia de eventos que llevaría a ese proceso en ratones APP/PS1. Los estudios de Man y colaboradores (Man et al., 2007) demuestran que en los linfocitos T periféricos de pacientes de EA tienen niveles mayores de CCL3 comparado con los individuos que no sufren EA. Por otra parte, un estudio en 2017 demostró que el aumento de la expresión de CCL3 produjo una acumulación de células gliales, monocitos y linfocitos en un modelo de ratón con hipoxia y probablemente esto contribuiría a la patogénesis de la EA (F. Zhang et al., 2017). Corroborando nuestros resultados, la quimiocina CCL3 se encuentra aumentada en el sistema nervioso central en la enfermedad de Alzheimer (Lue et al., 2001; Walker et al., 2001) y se encuentra localizada en la microglía, astrocitos y macrófagos perivasculares (Ambrosini et al., 2005; Balashov et al., 1999). CCL3 forma parte de la subfamilia de las  $\beta$ -quimiocinas y está involucrada en el reclutamiento y activación de leucocitos polimorfonucleares. La acumulación de células T produce un aumento de los niveles de quimiocinas proinflamatorias y causa inflamación crónica, intensificando la

neurotoxicidad y alterando la función microglial (Mietelska-Porowska & Wojda, 2017). La infiltración celular en el cerebro podría también contribuir al deterioro cognitivo de la patología de TAU. Además, se ha demostrado que las células T del hipocampo podrían modular el estado de activación microglial y/o astrocítica y producir perjuicio en la plasticidad sináptica (Laurent et al., 2017). Por otra parte, CCL3 se expresa de manera constitutiva por las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra y modula la neurotransmisión liberando transmisores a través de los canales iónicos y produciendo la potenciación a largo plazo (Dong & Xiong, 2006). En estudios in vitro se ha demostrado que el transporte activo de CCL3 a través de la barrera hemato-encefálica en el lado luminal ocurre independientemente de sus receptores, CCR1 y CCR5. Además, el transportador leucocítico se encuentra disminuido en condiciones de inflamación (De Laere et al., 2017), sugiriendo la existencia de vías adicionales que aumenten el transporte de células inmunitarias a través de la barrera hematoencefálica, entre estas vías podría ser la realizada por ABCE1.

La expresión proteica de la quimiocina CCL4 (ARN mensajero y proteína) se encuentra aumentada en ratones APP/PS1 comparado con los ratones control y se correlaciona con los niveles aumentados de A $\beta$  (M. Zhu et al., 2014). Estos autores también han demostrado una localización conjunta de

A $\beta$  y CCL4 en los astrocitos en el cerebro de ratones transgénicos APP/PS1. Los astrocitos son una fuente de A $\beta$ 1-42, ya que producen una sobreexpresión de  $\beta$ -secretasa (BACE1), una enzima que se adhiere a la proteína precursora del amiloide (APP) para producir A $\beta$  (Rossner et al., 2005) acelerándose la producción de depósitos de A $\beta$ 1-42 y posiblemente el deterioro de la función de memoria (Y. K. Lee et al., 2009). Nuestros resultados se correlacionan bien con los datos publicados por Zhu y colaboradores, donde una limpieza de la toxicidad amiloidea tiene lugar en el interior del cerebro de ratones APP/PS1 (M. Zhu et al., 2014). La producción de CCL4 es controlada por las células mononucleares sanguíneas periféricas en los pacientes de EA (Verite et al., 2017). Song y colaboradores demostraron un aumento significativo de A $\beta$ 1-42, tanto en los depósitos como en su forma soluble en el cerebro de TL4RM (mutación 4 del receptor Toll-like). Esto estaría relacionado con la disminución de los niveles de expresión de CCL4 y CCL3 y con un proceso de incremento de las funciones cognitivas en el hipocampo de estos ratones. Como consecuencia, a través de la vía de señalización TLR4 se produce activación de la microglía reduciéndose los depósitos de A $\beta$  y preservándose las funciones cognitivas de la toxicidad mediada por A $\beta$  (M. Song et al., 2011).

Nuestros resultados demuestran un aumento de la expresión de ARN mensajero de ABCF1 en ratones APP/PS1

comparados con los ratones control. ABCF1 es un miembro de la superfamilia ABC, que puede ser dividida en tres categorías: importadores, exportadores y reparadores y traductores de ADN (Jones et al., 2009). ABCF1 carece de dominio transmembrana, con lo que se encuentra situado en la tercera categoría (Richard et al., 1998). Su función podría ser interactuar con el inicio de la traducción mediante una interacción con el factor 2 de iniciación de la traducción eucariota. Los ratones ABCF1<sup>-/-</sup> sufren muerte embrionaria, mientras que los ratones ABCF1<sup>+/-</sup> son fértiles y se desarrollan con normalidad. Esta proteína está altamente relacionada con la proliferación y diferenciación activa de los diferentes tipos celulares (Wilcox et al., 2017). Además, se expresa en muchos tejidos, incluyendo el cerebro, particularmente en las células piramidales, células de Purkinje del cerebelo y en el hipocampo. Por el contrario, su expresión se encuentra disminuida en los tractos piramidales y en el tálamo (Wilcox et al., 2017). Recientemente, diferentes investigadores han publicado que ABCF1 es un mediador crítico del promotor de la traducción de N6-metiladenosina (m6A) bajo condiciones tanto fisiológicas como de estrés (Coots et al., 2017), apoyando el papel de ABCF1 en enfermedades como EA.

Nuestros resultados demuestran que cambios en la expresión de las quimiocinas y sus receptores podrían explicar la inducción de la inflamación crónica, la desmielinización, la



fagocitosis y la quimiotaxis, que están involucradas en la enfermedad de Alzheimer. Mediadores proinflamatorios, tales como CCL3 y CCL4, en nuestros datos, se encuentran aumentados mientras que su receptor CCR5 se ve disminuido indicando, probablemente, un aumento en la astrogliogénesis y, también, en el número de astrocitos. En este estudio, detectamos un incremento en la expresión de la proteína IL-3 y, también, de ABCF1, reforzando la idea de investigadores previos que indicaban lo importante que es la entrada y/o la salida de moléculas entre las células del cerebro y que podría estar afectado en la EA. Debido a que las quimiocinas pueden atravesar la barrera hematoencefálica en el modelo de Alzheimer APP/PS1, se espera una disfunción fisiológica. Una acumulación de la microglía y la desmielinización producida por CCR8 induciría a una quimiotaxis aumentada. Todo esto nos indicaría que no existe una comunicación apropiada entre las células cerebrales en la EA.

Los ligandos y receptores de las quimiocinas son por lo general expresados tanto en adultos como en SNC desarrollado (Jaerve & Müller, 2012; Rostène et al., 2011). Se han evidenciado nuevos mecanismos y funciones fisiológicas de las quimiocinas en el SNC, incluyendo regulación endocrina, neuromodulación y diferentes efectos como los evocados por neurotransmisores (Réaux-Le Goazigo et al., 2013; Rostène et al., 2007, 2011). Las células del SNC expresan

específicamente diferentes receptores; las neuronas expresan CXCR2, CXCR3, y CXCR4; los astrocitos expresan CXCR2, CXCR4, CCR1, CCR2, CCR3, CCR5, CCR10, CCR11 y CX3CR; la microglía expresa CCR2, CCR5 y CX3CR1 (Horuk, 2007; Jorda et al., 2020). Varias quimiocinas son expresadas constitutivamente en condiciones normales. Incluyendo CCL2 y CCL19 (Jaerve & Müller, 2012; Tan et al., 2013). Otras quimiocinas aumentan su expresión tras la inflamación (CCL7 y CCL12). Las quimiocinas proinflamatorias conducen a las células al SNC inflamado mediante quimiotaxis, como CCL2, CCL7 y CCL12 (Stuart et al., 2015). La sobreexpresión transgénica de CCL2 en el cerebro produce un aumento de la acumulación de microglía y del depósito de placa amiloidea en ratones APP transgénicos (M. Yamamoto et al., 2005). Al contrario que estos autores, bajo nuestras condiciones no detectamos ningún cambio significativo en esta quimiocina.

En una línea celular primaria de microglía Ra2,  $A\beta_{1-42}$  indujo la expresión de las quimiocinas CCL3, CCL4 y CCL7 (Ito et al., 2006; Jorda et al., 2019). Se debe tener en cuenta que el factor derivado de células dendríticas 1 (Dcf1) tiene un papel en la EA neuronal y, además, los ratones Dcf1 presentan un aumento de la función microglial mediante el incremento de la expresión de marcadores de activación microglial, como determinadas quimiocinas inflamatorias (J. Wang et al., 2018). Además, CCL7 y CCL12 ejercen potentes acciones

proinflamatorias mediante quimiotaxis leucocitaria en el SNC inflamado tras isquemia en ratas (Yamagami et al., 1999). Nuestros resultados demuestran un aumento de la expresión de CCL7 y CCL12 en ratones APP/PS1 comparados con los controles. En humanos, usando RT-PCR se detectó un aumento de los niveles mRNA de CCL2 en corteza temporal comparado con los controles. En condiciones normales la quimiocina CCL12 se encuentra en los ganglios linfáticos y el timo y puede ser altamente inducida en los macrófagos (Jaerve & Müller, 2012). Se cree que CCL12 produce la coordinación del movimiento celular durante reacciones alérgicas y la respuesta inmunitaria ante patógenos (Sarafi et al., 1997). El modelo de ratón APP/PS1 desarrolla placas A $\beta$  y presenta deterioro cognitivo desde los 7 meses de edad (Jorda et al., 2019; H. Y. Kim et al., 2016). Además, parece que la activación de células gliales, unida a la presencia de quimiocinas, podría ocurrir antes de que A $\beta$  aparezca en placas. En modelos de EA en ratones, los animales sometidos a estrés mostraron un aumento de CCL12, implicada en la neuroinflamación (Novak et al., 2018).

CCR2 (C-C Motif Receptor quimiocínico 2) es una proteína que puede unirse a las quimiocinas CCL2, CCL7 y CCL12 (Charo et al., 1994; Tan et al., 2013; Yamagami et al., 1994). El receptor es expresado en astrocitos, neuronas y microglía bajo condiciones basales o inflamatorias (Banisadr

et al., 2002; Tran et al., 2007). En ratones APP/PS1, la expresión aumentada de CCL2 y CCR2 produjo amilosis con un mayor grado de formación de oligómeros (L. Li et al., 2014). Una disminución en la fagocitosis A $\beta$  y la eliminación amiloidea tiene lugar tras la deficiencia de CCL2 y CCR2, sugiriendo que esta quimiocina y su receptor puedan ser importantes en el mantenimiento de la homeostasis neuronal (G. Azizi et al., 2014). Por otra parte, los monocitos positivos a CCR2 tienen un papel importante en la protección de las células neuronales, ya que su daño puede estar asociado a degeneración neuronal (Naert & Rivest, 2013). En esta tesis se detectó una disminución de la expresión de CCR2 en ratones APP/PS1 comparados a los controles, probablemente debido a una disminución en la migración y reclutamiento de monocitos inflamatorios al espacio amiloide. De manera similar, se observó una disminución en la expresión de CCR2 con agravación del depósito amiloide y deterioro cognitivo en un modelo de ratón transgénico de EA (Naert & Rivest, 2011). En estudios con un modelo de ratón CCR2<sup>-/-</sup> se demostró una reducción en el número y la supervivencia de células microgliales, con un incremento de A $\beta$  (Mildner et al., 2011). Otros autores han indicado una disminución en la supervivencia y un aumento de la carga de A $\beta$  en ratones transgénicos APP o APP/PS1, con una reducción del número celular microglial en el cerebro junto con una disminución de la

expresión de CCR2 (El Khoury et al., 2007). Además, la deficiencia de CCR2 ha sido implicada en un rápido desarrollo de patologías similares a la EA comparado con los ratones control (El Khoury et al., 2007; Philipson et al., 2010).

CCR4 se une a las quimiocinas CCL17 y CCL22 (Kusumoto et al., 2007). Este receptor es expresado por astrocitos y neuronas (Cédile et al., 2017). Nuestros resultados muestran un aumento en CCL17, CCL22 y la expresión proteica de CCR4 en ratones APP/PS1 comparados con los controles. En pacientes con EA, el número de células expresando CCR4 está aumentado, hecho que puede constituir un nuevo objetivo para las terapias inmunes en la EA (Goldeck et al., 2013). Se han detectado niveles altos de CCL17 y CCL22 en esclerosis múltiple y, además, el eje CCL17-CCR4 ha sido propuesto como posible objetivo terapéutico en enfermedades autoinmunes (Khaibullin et al., 2017). Por otra parte, CCL17, CCL22 y CCR4 están implicados en un modelo de encefalomiелitis autoinmune (Scheu et al., 2017). La deficiencia de CCL17 está asociada a beneficios en la respuesta inmune del SNC. En ratones APP/PS1 con deficiencia de CCL17 hay una reducción del péptido A $\beta$  debido a un aumento de su eliminación y a una menor pérdida de neuronas, así como de un menor deterioro cognitivo (Neitzert et al., 2013). Se ha asociado los niveles elevados de CCL22 con el deterioro cognitivo sugiriendo una respuesta inflamatoria periférica a la

neurodegeneración (Roos et al., 2018) y se ha asociado una disminución de CCL33 con una reducción de la inflamación y la desmielinización (Cheng et al., 2015).

En este estudio detectamos un aumento significativo de CCR1 y su quimiocina CXCL4 en el modelo de ratón utilizado. CXCL4 es un agonista de CCR1 y están los dos involucrados en la migración de monocitos en humanos, induciendo quimiotaxis de monocitos y también teniendo un papel inflamatorio (Fox et al., 2018). Su función fisiológica parece ser la neutralización de moléculas similares a la heparina en el endotelio de los vasos sanguíneos, inhibiendo su actividad antitrombótica y promoviendo la coagulación (Eisman et al., 1990). CCR1 es un marcador específico de EA, pero no está relacionado con el depósito de A $\beta$ 1-42 (Halks-Miller et al., 2003). CXCL4 intensifica los efectos de CCL5 (Nesmelova et al., 2008) amplificando la captación de monocitos endoteliales (von Hundelshausen et al., 2005) y CCL5 también se une al receptor CCR1 (Marques et al., 2013). En este estudio, demostramos que no había cambios en la expresión de CCL5 en ratones APP/PS1 (Jorda et al., 2019), sugiriendo que el aumento en la expresión de CCR1 detectada podría estar ligada a la de CXCL4. En nuestros resultados, se muestra un incremento de la quimiocina CCR1 y de la expresión de CCR3.

CCL11 tiene un papel en la neuroinflamación y neurodegeneración (Furukawa et al., 2015). Su receptor, CCR3, es expresado en diferentes células del cerebro, como astrocitos y neuronas y se une a la quimiocina CCL11 de manera efectiva (Martin & Delarasse, 2018). Se ha observado una asociación entre la edad y los niveles aumentados de CCL11 en plasma, tanto en ratones como en humanos (Villeda et al., 2011). En el caso de la EA también se correlaciona la enfermedad con niveles aumentados de CCL11 en plasma (Horuk, 2007; Rostène et al., 2007). CCL11 y su receptor, CCR3, están involucrados en el envejecimiento, aumento de fosforilación TAU, depósito de A $\beta$ , astrogliosis y memoria cognitiva (Fernandez-Egea et al., 2013; C. Zhu et al., 2017). Por otra parte, ratones jóvenes expuestos a CCL11 o a plasma sanguíneo de ratones ancianos presentan una disminución de la neurogénesis y del funcionamiento cognitivo en tareas comportamentales (Fernandez-Egea et al., 2013). Además, esta quimiocina se ha encontrado en concentraciones elevadas en pacientes de esquizofrenia y en consumidores de cannabis (de Haas et al., 2008).

Nuestros resultados indican un aumento en la expresión de CCR9 y CCL35 en ratones APP/PS1. CCR9 es expresado en la microglía de la corteza cerebral, hipocampo y cerebelo (Moser et al., 2004; Nichols et al., 2019). CCL25 es un ligando de CCR9 expresado en el epitelio y en células cerebrales y (X.

Wu et al., 2021) puede predecir el deterioro cognitivo en pacientes con deterioro cognitivo leve (Y. Zhang et al., 2019). La señal de CCL25/CCR9 sirve como mediador de la infiltración de Th17 inducida por TLR-4 en encefalomielitis autoinmune experimental (Bekker et al., 2015). Además, los niveles de CCL25 están aumentados en pacientes con colitis ulcerosa, con implicación de CCR9/CCL25 como agente etiológico (Kabelitz & Wesch, 2003). Se sabe que CCR9 y su ligando CCL25, median la migración de células gamma delta T al intestino delgado (Kabelitz & Wesch, 2003). En este sentido, se ha propuesto el uso clínico de antagonistas de CCR9 y, de hecho, el antagonismo farmacológico de CCR9 reduce los niveles de quimiocinas inflamatorias y la severidad de la enfermedad de Crohn (Keshav et al., 2013). CCL25 y el receptor CCR9 debilitan la funcionalidad de las células beta e inhiben la liberación de insulina, induciendo el mecanismo de apoptosis quimioicínico. En la obesidad, el aumento de CCR9 facilita la acumulación de células inmunes y la disfunción metabólica (Atanes et al., 2020).

En conclusión, estos datos nos indican que los cambios en las quimiocinas y los receptores de quimiocinas son importantes debido a la implicación que podrían tener en la inflamación relacionada con la enfermedad de Alzheimer. Además, podrían ser una de las posibles causas para el desarrollo de este trastorno. Estos resultados sugieren que se



produce daño en la barrera hematoencefálica, con un aumento de la quimiotaxis que se daría como consecuencia de la inflamación ocurrida en el cerebro. Por otra parte, el movimiento de las moléculas a través de las membranas celulares podría ser posiblemente mayor en ratones transgénicos en comparación con los ratones de tipo salvaje, lo que sugeriría que podría existir una pérdida de energía en los ratones transgénicos si los comparamos con los ratones de tipo salvaje. Esto viene evidenciado por los resultados obtenidos respecto a los cambios detectados en la proteína ABCF1 que presentan mayor expresión en el ratón transgénico que en el ratón de tipo salvaje. Los niveles de quimiocinas y citoquinas, junto con sus receptores cambian en el ratón APP/PS1 con respecto al ratón de tipo salvaje. Este hecho podría llevar a nuevos tratamientos en la EA, con la posibilidad de actuar de manera más específica controlando todos los procesos fisiológicos ligados a la acción de estos mediadores en nuestro organismo.



## **CONCLUSIONES**



## 7. CONCLUSIONES

1. Los ratones transgénicos APP/PS1 de 22-24 meses de edad presentan descoordinación motora, disminución de la fuerza muscular y deterioro cognitivo de tipo amnésico.
2. La densidad neuronal en los ratones APP/PS1 es menor que en el ratón de tipo salvaje, como se demuestra midiendo la expresión proteica de MAP-2. Por el contrario, el número de astrocitos es mayor en el ratón transgénico como queda reflejado mediante la detección de la proteína GFAP.
3. En el ratón APP/PS1 detectamos disminución de CCL1 con aumento de la expresión de su receptor CCR8, indicando un mecanismo de compensación. Estos datos indicarían una disminución en la eliminación de moléculas tóxicas como A $\beta$ . El incremento de CCR8 concomitante con el de la citoquina IL-3 podría explicar los cambios en el volumen cerebral observados en el ratón APP/PS1 comparado con el de tipo salvaje.
4. La disminución de la expresión de CCR5 junto con el aumento de sus quimiocinas CCL3 y CCL4 en los ratones APP/PS1, indica un aumento de la astrogliogénesis y del número de astrocitos, junto con una disminución en la memoria y un aumento de la muerte celular, como ocurre en humanos.

5. Un aumento de la expresión de ABCF1 en ratones APP/PS1 sugiere una vía alternativa a la de CCR5 y CCR8, aumentando el transporte de células inmunitarias a través de la barrera hematoencefálica y reforzando la idea de la importancia de la entrada y/o salida de moléculas entre las células cerebrales.
6. El aumento en la expresión de CCL7 y CCL12 en ratones APP/PS1 comparados con los controles, indicaría un aumento de la inflamación cerebral mediante quimiotaxis leucocitaria. Por el contrario, la disminución del receptor de estas quimiocinas (CCR2) en los ratones APP/PS1, se explicaría por la presencia de A $\beta$ , como ocurre en el ratón CCR2<sup>-/-</sup>.
7. La expresión de las quimiocinas CCL17 y CCL22 y de su receptor CCR4 fue mayor en los animales transgénicos, tal y como ocurre en los enfermos de Alzheimer y puede constituir un nuevo objetivo para las terapias inmunes en la enfermedad de Alzheimer.
8. Detectamos un aumento significativo de CCR1 y de su quimiocina CXCL4 en el modelo de ratón utilizado, por lo que su función de neutralización de la actividad trombótica y de promoción de la coagulación se vería incrementada en el ratón APP/PS1.
9. CCL11 y su receptor CCR3 y CCL25 junto con su receptor CCR9 aumentan en el ratón transgénico comparado con el

control. Estas proteínas tienen un papel importante en el envejecimiento, en el aumento de la fosforilación de la proteína TAU, en el incremento de los depósitos de A $\beta$ , en la astrogliosis y en la deficiencia de la memoria cognitiva en pacientes con deterioro cognitivo leve.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que cambios en la expresión de las quimiocinas, citocinas y de sus receptores podrían explicar la inducción de la inflamación crónica, la desmielinización, el daño a la barrera hematoencefálica, la fagocitosis y la quimiotaxis, que están involucradas en la enfermedad de Alzheimer. Además, podrían ser una de las posibles causas para el desarrollo de este trastorno. El uso de dianas farmacológicas podría proporcionar nuevas estrategias para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.





## **BIBLIOGRAFÍA**



## 8. BIBLIOGRAFÍA

Abbott, N. J., Rönnebeck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(1), 41-53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>

Abeti, R., & Duchon, M. R. (2012). Activation of PARP by oxidative stress induced by  $\beta$ -amyloid: Implications for Alzheimer's disease. *Neurochemical Research*, 37(11), 2589-2596. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0895-x>

Affandi, A. J., Silva-Cardoso, S. C., Garcia, S., Leijten, E. F. A., van Kempen, T. S., Marut, W., van Roon, J. A. G., & Radstake, T. R. D. J. (2018). CXCL4 is a novel inducer of human Th17 cells and correlates with IL-17 and IL-22 in psoriatic arthritis. *European Journal of Immunology*, 48(3), 522-531. <https://doi.org/10.1002/eji.201747195>

Agostinho, P., Cunha, R. A., & Oliveira, C. (2010). Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Current Pharmaceutical Design*, 16(25), 2766-2778. <https://doi.org/10.2174/138161210793176572>

Aguirre-Rueda, D., Guerra-Ojeda, S., Aldasoro, M., Iradi, A., Obrador, E., Mauricio, M. D., Vila, J. M., Marchio, P., & Valles, S. L. (2015). WIN 55,212-2, Agonist of Cannabinoid Receptors, Prevents Amyloid  $\beta$ 1-42 Effects on Astrocytes in Primary Culture. *PLoS ONE*, 10(4), e0122843. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122843>

Aguirre-Rueda, D., Guerra-Ojeda, S., Aldasoro, M., Iradi, A., Obrador, E., Ortega, A., Mauricio, M. D., Vila, J. M., & Valles, S. L. (2015). Astrocytes Protect Neurons from  $A\beta_{1-42}$  Peptide-Induced Neurotoxicity Increasing TFAM and PGC-1 and Decreasing PPAR $\gamma$  and SIRT-1. *International Journal of Medical Sciences*, 12(1), 48-56. <https://doi.org/10.7150/ijms.10035>

Ahmed, M., Davis, J., Aucoin, D., Sato, T., Ahuja, S., Elliott, J., Van Nostrand, W., & Smith, S. (2010). Structural conversion of neurotoxic

amyloid-beta(1-42) oligomers to fibrils. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(5). <https://doi.org/10.1038/nsmb.1799>

Akimoto, N., Honda, K., Uta, D., Beppu, K., Ushijima, Y., Matsuzaki, Y., Nakashima, S., Kido, M. A., Imoto, K., Takano, Y., & Noda, M. (2013). CCL-1 in the spinal cord contributes to neuropathic pain induced by nerve injury. *Cell Death & Disease*, 4(6), e679. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.198>

Akimoto, N., Ifuku, M., Mori, Y., & Noda, M. (2013). Effects of chemokine (C-C motif) ligand 1 on microglial function. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 436(3), 455-461. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.05.126>

Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews. Immunology*, 4(7), 499-511. <https://doi.org/10.1038/nri1391>

Aldinucci, D., Borghese, C., & Casagrande, N. (2020). The CCL5/CCR5 Axis in Cancer Progression. *Cancers*, 12(7), 1765. <https://doi.org/10.3390/cancers12071765>

Alfaro Martínez, M. A., González Pimentel, J. P., Lavín Meneses, S. E., & Reyes Maulén, P. F. (2021). *Diagnóstico neuropsicológico diferencial en demencias tipo Alzheimer y demencias con Cuerpos de Lewy* [Thesis, Universidad Andrés Bello]. <https://repositorio.unab.cl/xmlui/handle/ria/22348>

Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M., & Berger, E. A. (1996). CC CKR5: A RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5270), 1955-1958. <https://doi.org/10.1126/science.272.5270.1955>

Allan, S. M., & Rothwell, N. J. (2001). Cytokines and acute neurodegeneration. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2(10), 734-744. <https://doi.org/10.1038/35094583>

Allan, S. M., & Rothwell, N. J. (2003). Inflammation in central nervous system injury. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 358(1438), 1669-1677. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1358>

- Allinson, T. M. J., Parkin, E. T., Turner, A. J., & Hooper, N. M. (2003). ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *Journal of Neuroscience Research*, *74*(3), 342-352. <https://doi.org/10.1002/jnr.10737>
- Alzheimer's Disease Collaborative Group. (1995). The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families. *Nature Genetics*, *11*(2), 219-222. <https://doi.org/10.1038/ng1095-219>
- Ambrosini, E., Remoli, M. E., Giacomini, E., Rosicarelli, B., Serafini, B., Lande, R., Aloisi, F., & Coccia, E. M. (2005). Astrocytes produce dendritic cell-attracting chemokines in vitro and in multiple sclerosis lesions. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *64*(8), 706-715. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000173893.01929.fc>
- Andersen, K., Launer, L. J., Dewey, M. E., Letenneur, L., Ott, A., Copeland, J. R., Dartigues, J. F., Kragh-Sorensen, P., Baldereschi, M., Brayne, C., Lobo, A., Martinez-Lage, J. M., Stijnen, T., & Hofman, A. (1999). Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies. EURODEM Incidence Research Group. *Neurology*, *53*(9), 1992-1997. <https://doi.org/10.1212/wnl.53.9.1992>
- Andersen, M. L., & Winter, L. M. F. (2019). Animal models in biological and biomedical research—Experimental and ethical concerns. *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias*, *91*(suppl 1), e20170238. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170238>
- Appay, V., & Rowland-Jones, S. L. (2001). RANTES: A versatile and controversial chemokine. *Trends in Immunology*, *22*(2), 83-87. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(00\)01812-3](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(00)01812-3)
- Armstrong, R. A. (2013). What causes alzheimer's disease? *Folia Neuropathologica*, *51*(3), 169-188. <https://doi.org/10.5114/fn.2013.37702>
- Arnold, S. E., Hyman, B. T., Flory, J., Damasio, A. R., & Van Hoesen, G. W. (1991). The topographical and neuroanatomical distribution of neurofibrillary tangles and neuritic plaques in the cerebral cortex of

patients with Alzheimer's disease. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 1(1), 103-116. <https://doi.org/10.1093/cercor/1.1.103>

Asai, M., Hattori, C., Szabó, B., Sasagawa, N., Maruyama, K., Tanuma, S., & Ishiura, S. (2003). Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301(1), 231-235. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(02\)02999-6](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)02999-6)

Aschner, M., & Kimelberg, H. K. (1991). The use of astrocytes in culture as model systems for evaluating neurotoxic-induced-injury. *Neurotoxicology*, 12(3), 505-517.

Atanes, P., Lee, V., Huang, G. C., & Persaud, S. J. (2020). The role of the CCL25-CCR9 axis in beta-cell function: Potential for therapeutic intervention in type 2 diabetes. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 113, 154394. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154394>

Augusto-Oliveira, M., Arrifano, G. P., Lopes-Araújo, A., Santos-Sacramento, L., Takeda, P. Y., Anthony, D. C., Malva, J. O., & Crespo-Lopez, M. E. (2019). What Do Microglia Really Do in Healthy Adult Brain? *Cells*, 8(10), Art. 10. <https://doi.org/10.3390/cells8101293>

Auld, D. S., & Robitaille, R. (2003). Glial cells and neurotransmission: An inclusive view of synaptic function. *Neuron*, 40(2), 389-400. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00607-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00607-x)

Azizi, G., Khannazer, N., & Mirshafiey, A. (2014). The Potential Role of Chemokines in Alzheimer's Disease Pathogenesis. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias*, 29(5), 415-425. <https://doi.org/10.1177/1533317513518651>

Azizi, S. A., & Krynska, B. (2013). Derivation of neuronal cells from fetal normal human astrocytes (NHA). *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1078, 89-96. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-640-5\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-640-5_8)

Babinet, C., Morello, D., & Renard, J. P. (1989). Transgenic mice. *Genome*, 31(2), 938-949. <https://doi.org/10.1139/g89-165>

- Baehrecke, E. H. (2002). How death shapes life during development. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 3(10), 779-787. <https://doi.org/10.1038/nrm931>
- Bailey, J. A., Maloney, B., Ge, Y.-W., & Lahiri, D. K. (2011). Functional activity of the novel Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide interacting domain (A $\beta$ ID) in the APP and BACE1 promoter sequences and implications in activating apoptotic genes and in amyloidogenesis. *Gene*, 488(1-2), 13-22. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.06.017>
- Bajetto, A., Bonavia, R., Barbero, S., Florio, T., & Schettini, G. (2001). Chemokines and their receptors in the central nervous system. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 22(3), 147-184. <https://doi.org/10.1006/frne.2001.0214>
- Balashov, K. E., Rottman, J. B., Weiner, H. L., & Hancock, W. W. (1999). CCR5+ and CXCR3+ T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1 $\alpha$  and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(12), 6873-6878. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.12.6873>
- Balcz, B., Kirchner, L., Cairns, N., Fountoulakis, M., & Lubec, G. (2001). Increased brain protein levels of carbonyl reductase and alcohol dehydrogenase in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, 61, 193-201. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6262-0\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6262-0_15)
- Ballabh, P., Braun, A., & Nedergaard, M. (2004). The blood-brain barrier: An overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of Disease*, 16(1), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.12.016>
- Banisadr, G., Quéraud-Lesaux, F., Boutterin, M. C., Pélaprat, D., Zalc, B., Rostène, W., Haour, F., & Parsadaniantz, S. M. (2002). Distribution, cellular localization and functional role of CCR2 chemokine receptors in adult rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 81(2), 257-269. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00809.x>

Baranzini, S. E., Elfstrom, C., Chang, S. Y., Butunoi, C., Murray, R., Higuchi, R., & Oksenberg, J. R. (2000). Transcriptional analysis of multiple sclerosis brain lesions reveals a complex pattern of cytokine expression. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *165*(11), 6576-6582. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.11.6576>

Barhanpurkar-Naik, A., Mhaske, S. T., Pote, S. T., Singh, K., & Wani, M. R. (2017). Interleukin-3 enhances the migration of human mesenchymal stem cells by regulating expression of CXCR4. *Stem Cell Research & Therapy*, *8*(1), 168. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0618-y>

Barnum, S. R. (2002). Complement in central nervous system inflammation. *Immunologic Research*, *26*(1), 7-13. <https://doi.org/10.1385/IR:26:1-3:007>

Barres, B. A., Hart, I. K., Coles, H. S., Burne, J. F., Voyvodic, J. T., Richardson, W. D., & Raff, M. C. (1992). Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell*, *70*(1), 31-46. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90531-g](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90531-g)

Baruch-Suchodolsky, R., & Fischer, B. (2009). Abeta40, either soluble or aggregated, is a remarkably potent antioxidant in cell-free oxidative systems. *Biochemistry*, *48*(20), 4354-4370. <https://doi.org/10.1021/bi802361k>

Becerra, A., Warke, R. V., Martin, K., Xhaja, K., de Bosch, N., Rothman, A. L., & Bosch, I. (2009). Gene expression profiling of dengue infected human primary cells identifies secreted mediators in vivo. *Journal of Medical Virology*, *81*(8), 1403-1411. <https://doi.org/10.1002/jmv.21538>

Bekker, P., Ebsworth, K., Walters, M. J., Berahovich, R. D., Ertl, L. S., Charvat, T. T., Punna, S., Powers, J. P., Campbell, J. J., Sullivan, T. J., Jaen, J. C., & Schall, T. J. (2015). CCR9 Antagonists in the Treatment of Ulcerative Colitis. *Mediators of Inflammation*, *2015*, 628340. <https://doi.org/10.1155/2015/628340>

Bernabeu-Zornoza, A., Coronel, R., Lachgar, M., Palmer, C., & Liste, I. (2018). Effects of Amyloid- $\beta$  Peptide on the Biology of Human



- Neural Stem Cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1779, 381-398. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7816-8\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7816-8_23)
- Bertrand, C. P., & Ponath, P. D. (2000). CCR3 blockade as a new therapy for asthma. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 9(1), 43-52. <https://doi.org/10.1517/13543784.9.1.43>
- Blair, M., Marczynski, C. A., Davis-Faroque, N., & Kertesz, A. (2007). A longitudinal study of language decline in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Journal of the International Neuropsychological Society: JINS*, 13(2), 237-245. <https://doi.org/10.1017/S1355617707070269>
- Blennow, K., de Leon, M. J., & Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)*, 368(9533), 387-403. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69113-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69113-7)
- Bogoyevitch, M. A., Boehm, I., Oakley, A., Ketterman, A. J., & Barr, R. K. (2004). Targeting the JNK MAPK cascade for inhibition: Basic science and therapeutic potential. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1697(1-2), 89-101. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.11.016>
- Borish, L. C., & Steinke, J. W. (2003). 2. Cytokines and chemokines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(2, Supplement 2), S460-S475. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.108>
- Boutajangout, A., & Wisniewski, T. (2014). Tau-based therapeutic approaches for Alzheimer's disease—A mini-review. *Gerontology*, 60(5), 381-385. <https://doi.org/10.1159/000358875>
- Brenner, M. (2014). Role of GFAP in CNS injuries. *Neuroscience letters*, 565, 7-13. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.01.055>
- Bridges, K. A., & Van Lancker Sidtis, D. (2013). Formulaic Language in Alzheimer's Disease. *Aphasiology*, 27(7), 10.1080/02687038.2012.757760. <https://doi.org/10.1080/02687038.2012.757760>
- Brunk, U. T., & Terman, A. (2002). Lipofuscin: Mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(5), 611-619. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00959-0](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00959-0)

Cacabelos, R. (1999). *Tratado de neurogeriatría: Enfermedad de Alzheimer y otras demencias*.  
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=805302>

Camacho Ugarte, V., Bastida Codina, A., & Zarate, S. G. (2020). ESTUDIO ANATÓMICO DEL HIPOCAMPO COMO UNA DE LAS REGIONES DE NEUROGÉNESIS MÁS RELEVANTE. *Revista Científica Ciencia Médica*, 23(2), 221-230.

Camins, A., Pallas, M., & Silvestre, J. S. (2008). Apoptotic mechanisms involved in neurodegenerative diseases: Experimental and therapeutic approaches. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 30(1), 43-65.  
<https://doi.org/10.1358/mf.2008.30.1.1090962>

Carney, J. M., Smith, C. D., Carney, A. M., & Butterfield, D. A. (1994). Aging- and oxygen-induced modifications in brain biochemistry and behavior. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 738, 44-53.  
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb21788.x>

Carrasco, A., & Lomber, S. G. (2013). Influence of inter-field communication on neuronal response synchrony across auditory cortex. *Hearing Research*, 304, 57-69.  
<https://doi.org/10.1016/j.heares.2013.05.012>

Cartier, L., Hartley, O., Dubois-Dauphin, M., & Krause, K.-H. (2005). Chemokine receptors in the central nervous system: Role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 48(1), 16-42.  
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.07.021>

Cayre, M., Malaterre, J., Scotto-Lomassese, S., Strambi, C., & Strambi, A. (2002). The common properties of neurogenesis in the adult brain: From invertebrates to vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 132(1), 1-15. [https://doi.org/10.1016/s1096-4959\(01\)00525-5](https://doi.org/10.1016/s1096-4959(01)00525-5)

Cédile, O., Wlodarczyk, A., & Owens, T. (2017). CCL2 recruits T cells into the brain in a CCR2-independent manner. *APMIS: Acta*

*Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 125(11), 945-956. <https://doi.org/10.1111/apm.12740>

Chang, T.-T., Yang, H.-Y., Chen, C., & Chen, J.-W. (2020). CCL4 Inhibition in Atherosclerosis: Effects on Plaque Stability, Endothelial Cell Adhesiveness, and Macrophages Activation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6567. <https://doi.org/10.3390/ijms21186567>

Charo, I. F., Myers, S. J., Herman, A., Franci, C., Connolly, A. J., & Coughlin, S. R. (1994). Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(7), 2752-2756. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.7.2752>

Chen, Y., & Swanson, R. A. (2003). Astrocytes and brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 23(2), 137-149. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000044631.80210.3C>

Cheng, W., Zhao, Q., Xi, Y., Li, C., Xu, Y., Wang, L., Niu, X., Wang, Z., & Chen, G. (2015). IFN- $\beta$  inhibits T cells accumulation in the central nervous system by reducing the expression and activity of chemokines in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Molecular Immunology*, 64(1), 152-162. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.11.012>

Chitnis, T., & Weiner, H. L. (2017). CNS inflammation and neurodegeneration. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(10), 3577-3587. <https://doi.org/10.1172/JCI90609>

Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P. D., Wu, L., Mackay, C. R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C., & Sodroski, J. (1996). The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell*, 85(7), 1135-1148. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81313-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81313-6)

Choi, D.-Y., Lee, M. K., & Hong, J. T. (2013). Lack of CCR5 modifies glial phenotypes and population of the nigral dopaminergic neurons,

but not MPTP-induced dopaminergic neurodegeneration. *Neurobiology of Disease*, 49, 159-168. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.08.001>

Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., & Selkoe, D. J. (1992). Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature*, 360(6405), 672-674. <https://doi.org/10.1038/360672a0>

Combs, C. K., Karlo, J. C., Kao, S. C., & Landreth, G. E. (2001). Beta-Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNFalpha-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(4), 1179-1188. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-04-01179.2001>

Compston, A., & Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet (London, England)*, 372(9648), 1502-1517. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61620-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61620-7)

Coots, R. A., Liu, X.-M., Mao, Y., Dong, L., Zhou, J., Wan, J., Zhang, X., & Qian, S.-B. (2017). M6A Facilitates eIF4F-Independent mRNA Translation. *Molecular Cell*, 68(3), 504-514.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.002>

Corbeau, P., & Reynes, J. (2009). CCR5 antagonism in HIV infection: Ways, effects, and side effects. *AIDS (London, England)*, 23(15), 1931-1943. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32832e71cd>

Costacou, T., Evans, R. W., Schafer, G. L., & Orchard, T. J. (2013). Oxidative stress and response in relation to coronary artery disease in type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 36(11), 3503-3509. <https://doi.org/10.2337/dc12-2378>

Cribbs, D. H., Poon, W. W., Rissman, R. A., & Blurton-Jones, M. (2004). Caspase-Mediated Degeneration in Alzheimer's Disease. *The American Journal of Pathology*, 165(2), 353-355.

Cuenca-López, M. D., Brea, D., Segura, T., Galindo, M. F., Antón-Martínez, D., Agulla, J., Castillo, J., & Jordán, J. (2010). [Inflammation as a therapeutic agent in cerebral infarction: Cellular inflammatory

response and inflammatory mediators]. *Revista De Neurologia*, 50(6), 349-359.

Cummins, T. R., Sheets, P. L., & Waxman, S. G. (2007). The roles of sodium channels in nociception: Implications for mechanisms of pain. *Pain*, 131(3), 243-257. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.07.026>

Dairaghi, D. J., Oldham, E. R., Bacon, K. B., & Schall, T. J. (1997). Chemokine receptor CCR3 function is highly dependent on local pH and ionic strength. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(45), 28206-28209. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.45.28206>

Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: Critical control points. *Cell*, 116(2), 205-219. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00046-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00046-7)

Das, G. D., & Altman, J. (1970). Postnatal neurogenesis in the caudate nucleus and nucleus accumbens septi in the rat. *Brain Research*, 21(1), 122-127. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(70\)90026-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(70)90026-0)

Davoust, N., Vuailat, C., Androdias, G., & Nataf, S. (2008). From bone marrow to microglia: Barriers and avenues. *Trends in Immunology*, 29(5), 227-234. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.01.010>

De Felice, F. G., Vieira, M. N. N., Saraiva, L. M., Figueroa-Villar, J. D., Garcia-Abreu, J., Liu, R., Chang, L., Klein, W. L., & Ferreira, S. T. (2004). Targeting the neurotoxic species in Alzheimer's disease: Inhibitors of Abeta oligomerization. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(12), 1366-1372. <https://doi.org/10.1096/fj.04-1764com>

de Haas, A. H., Boddeke, H. W. G. M., & Biber, K. (2008). Region-specific expression of immunoregulatory proteins on microglia in the healthy CNS. *Glia*, 56(8), 888-894. <https://doi.org/10.1002/glia.20663>

De Laere, M., Sousa, C., Meena, M., Buckinx, R., Timmermans, J.-P., Berneman, Z., & Cools, N. (2017). Increased Transendothelial Transport of CCL3 Is Insufficient to Drive Immune Cell Transmigration through the Blood–Brain Barrier under Inflammatory Conditions In Vitro. *Mediators of Inflammation*, 2017, 6752756. <https://doi.org/10.1155/2017/6752756>

de Sant'Anna, M., & Morat, B. (2013). [Non-drug-based management of Alzheimer's disease]. *Soins. Gerontologie*, 102, 15-18.

Degterev, A., & Yuan, J. (2008). Expansion and evolution of cell death programmes. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(5), 378-390. <https://doi.org/10.1038/nrm2393>

del Moral, A., Arnaudas, J. I., Gehring, P. M., Salamon, M. B., Ritter, C., Joven, E., & Cullen, J. (1993). Magnetic first-order phase transition and crossover associated with random anisotropy in crystalline  $\text{Dy}_{1-x}\text{Al}_x\text{Y}_{1-x}\text{Al}_x$ . *Physical Review B*, 47(13), 7892-7896. <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.47.7892>

Del Rio Hortega, P. (1957). [Are the glia having small radiations (oligodendroglia) possibly homologous to Schwann cells]. *Archivos De Histologia Normal Y Patologica*, 7(1), 1-4.

Del Rio-Hortega, P. (2012). Are the glia with very few processes homologous with Schwann cells? By Pío del Río-Hortega. 1922. *Clinical Neuropathology*, 31(6), 460-462.

Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhardt, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R. E., Hill, C. M., Davis, C. B., Peiper, S. C., Schall, T. J., Littman, D. R., & Landau, N. R. (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*, 381(6584), 661-666. <https://doi.org/10.1038/381661a0>

Deng, S., Jin, P., Sherchan, P., Liu, S., Cui, Y., Huang, L., Zhang, J. H., Gong, Y., & Tang, J. (2021). Recombinant CCL17-dependent CCR4 activation alleviates neuroinflammation and neuronal apoptosis through the PI3K/AKT/Foxo1 signaling pathway after ICH in mice. *Journal of Neuroinflammation*, 18(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02112-3>

Deng, Y., Wang, Z., Wang, R., Zhang, X., Zhang, S., Wu, Y., Staufenbiel, M., Cai, F., & Song, W. (2013). Amyloid- $\beta$  protein (A $\beta$ ) Glu11 is the major  $\beta$ -secretase site of  $\beta$ -site amyloid- $\beta$  precursor protein-cleaving enzyme 1 (BACE1), and shifting the cleavage site to A $\beta$  Asp1 contributes to Alzheimer pathogenesis. *The European*

*Journal of Neuroscience*, 37(12), 1962-1969.  
<https://doi.org/10.1111/ejn.12235>

Denis, C., Deiteren, K., Mortier, A., Tounsi, A., Fransen, E., Proost, P., Renauld, J.-C., & Lambeir, A.-M. (2012). C-Terminal Clipping of Chemokine CCL1/I-309 Enhances CCR8-Mediated Intracellular Calcium Release and Anti-Apoptotic Activity. *PLOS ONE*, 7(3), e34199. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034199>

Dhillon, S. (2021). Aducanumab: First Approval. *Drugs*, 81(12), 1437-1443. <https://doi.org/10.1007/s40265-021-01569-z>

Di Carlo, A., Baldereschi, M., Amaducci, L., Lepore, V., Bracco, L., Maggi, S., Bonaiuto, S., Perissinotto, E., Scarlato, G., Farchi, G., Inzitari, D., & ILSA Working Group. (2002). Incidence of dementia, Alzheimer's disease, and vascular dementia in Italy. The ILSA Study. *Journal of the American Geriatrics Society*, 50(1), 41-48. <https://doi.org/10.1046/j.1532-5415.2002.50006.x>

Dodla, M., Mumaw, J., & Stice, S. (2010). Role of Astrocytes, Soluble Factors, Cells Adhesion Molecules and Neurotrophins in Functional Synapse Formation: Implications for Human Embryonic Stem Cell Derived Neurons. *Current stem cell research & therapy*, 5, 251-260. <https://doi.org/10.2174/157488810791824520>

Dong, J., & Xiong, H. (2006). Human immunodeficiency virus type 1 gp120 inhibits long-term potentiation via chemokine receptor CXCR4 in rat hippocampal slices. *Journal of Neuroscience Research*, 83(3), 489-496. <https://doi.org/10.1002/jnr.20745>

Dzenko, K. A., Weltzien, R. B., & Pachter, J. S. (1997). Suppression of A beta-induced monocyte neurotoxicity by antiinflammatory compounds. *Journal of Neuroimmunology*, 80(1-2), 6-12. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(97\)00128-8](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(97)00128-8)

Eddleston, M., & Mucke, L. (1993). Molecular profile of reactive astrocytes—Implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience*, 54(1), 15-36. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90380-x](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90380-x)

Eikelenboom, P., & van Gool, W. A. (2004). Neuroinflammatory perspectives on the two faces of Alzheimer's disease. *Journal of*

*Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 111(3), 281-294.  
<https://doi.org/10.1007/s00702-003-0055-1>

Eisman, R., Surrey, S., Ramachandran, B., Schwartz, E., & Poncz, M. (1990). Structural and functional comparison of the genes for human platelet factor 4 and PF4alt. *Blood*, 76(2), 336-344.

El Khoury, J., Toft, M., Hickman, S. E., Means, T. K., Terada, K., Geula, C., & Luster, A. D. (2007). Ccr2 deficiency impairs microglial accumulation and accelerates progression of Alzheimer-like disease. *Nature Medicine*, 13(4), 432-438. <https://doi.org/10.1038/nm1555>

Ertekin-Taner, N., Allen, M., Fadale, D., Scanlin, L., Younkin, L., Petersen, R. C., Graff-Radford, N., & Younkin, S. G. (2004). Genetic variants in a haplotype block spanning IDE are significantly associated with plasma A $\beta$ 42 levels and risk for Alzheimer disease. *Human Mutation*, 23(4), 334-342. <https://doi.org/10.1002/humu.20016>

Essalmani, R., Macq, A. F., Mercken, L., & Octave, J. N. (1996). Missense mutations associated with familial Alzheimer's disease in Sweden lead to the production of the amyloid peptide without internalization of its precursor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 218(1), 89-96. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0017>

Estevao, C., Bowers, C. E., Luo, D., Sarker, M., Hoeh, A. E., Frudd, K., Turowski, P., & Greenwood, J. (2021). CCL4 induces inflammatory signalling and barrier disruption in the neurovascular endothelium. *Brain, Behavior, & Immunity - Health*, 18, 100370. <https://doi.org/10.1016/j.bbih.2021.100370>

Farzan, M., Schnitzler, C. E., Vasilieva, N., Leung, D., & Choe, H. (2000). BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(17), 9712-9717. <https://doi.org/10.1073/pnas.160115697>

Fernandes, M. R., & Pedroso, A. R. (2017). Animal experimentation: A look into ethics, welfare and alternative methods. *Revista Da*



*Associacao Medica Brasileira* (1992), 63(11), 923-928.  
<https://doi.org/10.1590/1806-9282.63.11.923>

Fernandez-Egea, E., Scoriels, L., Theegala, S., Giro, M., Ozanne, S. E., Burling, K., & Jones, P. B. (2013). Cannabis use is associated with increased CCL11 plasma levels in young healthy volunteers. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 46, 25-28. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.06.011>

Fernández-Ruiz, J., Berrendero, F., Hernández, M. L., & Ramos, J. A. (2000). The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends in Neurosciences*, 23(1), 14-20. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(99\)01491-5](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(99)01491-5)

Ferri, C. P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., Jorm, A., Mathers, C., Menezes, P. R., Rimmer, E., Sczufca, M., & Alzheimer's Disease International. (2005). Global prevalence of dementia: A Delphi consensus study. *Lancet (London, England)*, 366(9503), 2112-2117. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67889-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67889-0)

Fields, R. D., & Stevens-Graham, B. (2002). New insights into neuron-glia communication. *Science (New York, N.Y.)*, 298(5593), 556-562. <https://doi.org/10.1126/science.298.5593.556>

Fox, J. M., Kausar, F., Day, A., Osborne, M., Hussain, K., Mueller, A., Lin, J., Tsuchiya, T., Kanegasaki, S., & Pease, J. E. (2018). CXCL4/Platelet Factor 4 is an agonist of CCR1 and drives human monocyte migration. *Scientific Reports*, 8(1), Art. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27710-9>

Fraser, D. D., Mudrick-Donnon, L. A., & MacVicar, B. A. (1994). Astrocytic GABA receptors. *Glia*, 11(2), 83-93. <https://doi.org/10.1002/glia.440110203>

Fu, Y., Pan, S., Liu, Q., & Gong, S. (2010). [Cryopreservation and resuscitation of neural stem cells from fetal rat]. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi = Journal of Clinical Otorhinolaryngology, Head, and Neck Surgery*, 24(7), 311-314.

- Fülle, L., Offermann, N., Hansen, J. N., Breithausen, B., Erazo, A. B., Schanz, O., Radau, L., Gondorf, F., Knöpper, K., Alferink, J., Abdullah, Z., Neumann, H., Weighardt, H., Henneberger, C., Halle, A., & Förster, I. (2018). CCL17 exerts a neuroimmune modulatory function and is expressed in hippocampal neurons. *Glia*, 66(10), 2246-2261. <https://doi.org/10.1002/glia.23507>
- Fuller, S., Steele, M., & Münch, G. (2010). Activated astroglia during chronic inflammation in Alzheimer's disease—Do they neglect their neurosupportive roles? *Mutation Research*, 690(1-2), 40-49. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.08.016>
- Furman, J. L., Sama, D. M., Gant, J. C., Beckett, T. L., Murphy, M. P., Bachstetter, A. D., Van Eldik, L. J., & Norris, C. M. (2012). Targeting astrocytes ameliorates neurologic changes in a mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(46), 16129-16140. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2323-12.2012>
- Furukawa, T., Matsui, N., Fujita, K., Nodera, H., Shimizu, F., Miyamoto, K., Takahashi, Y., Kanda, T., Kusunoki, S., Izumi, Y., & Kaji, R. (2015). CSF cytokine profile distinguishes multifocal motor neuropathy from progressive muscular atrophy. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*, 2(5). <https://doi.org/10.1212/NXI.000000000000138>
- Gabbita, S. P., Lovell, M. A., & Markesbery, W. R. (1998). Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 71(5), 2034-2040. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.71052034.x>
- Gage, F. H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science (New York, N. Y.)*, 287(5457), 1433-1438. <https://doi.org/10.1126/science.287.5457.1433>
- Gandy, S. (2005). The role of cerebral amyloid beta accumulation in common forms of Alzheimer disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(5), 1121-1129. <https://doi.org/10.1172/JCI25100>
- García Jordá, E. (2010). Mus musculus. *Clinical & Translational Oncology: Official Publication of the Federation of Spanish Oncology*

*Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 12(9), 585-586. <https://doi.org/10.1007/s12094-010-0561-1>

Gard, A. L., Burrell, M. R., Pfeiffer, S. E., Rudge, J. S., & Williams, W. C. (1995). Astroglial control of oligodendrocyte survival mediated by PDGF and leukemia inhibitory factor-like protein. *Development (Cambridge, England)*, 121(7), 2187-2197. <https://doi.org/10.1242/dev.121.7.2187>

Garlisi, C. G., Xiao, H., Tian, F., Hedrick, J. A., Billah, M. M., Egan, R. W., & Umland, S. P. (1999). The assignment of chemokine-chemokine receptor pairs: TARC and MIP-1 beta are not ligands for human CC-chemokine receptor 8. *European Journal of Immunology*, 29(10), 3210-3215. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199910\)29:10<3210::AID-IMMU3210>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199910)29:10<3210::AID-IMMU3210>3.0.CO;2-W)

Garre-Olmo, J. (2018). [Epidemiology of Alzheimer's disease and other dementias]. *Revista De Neurologia*, 66(11), 377-386.

Gasic-Milenkovic, J., Loske, C., & Münch, G. (2003). Advanced glycation endproducts cause lipid peroxidation in the human neuronal cell line SH-SY5Y. *Journal of Alzheimer's Disease*, 5(1), 25-30. <https://doi.org/10.3233/JAD-2003-5104>

Gasque, P., Dean, Y. D., McGreal, E. P., VanBeek, J., & Morgan, B. P. (2000). Complement components of the innate immune system in health and disease in the CNS. *Immunopharmacology*, 49(1-2), 171-186. [https://doi.org/10.1016/s0162-3109\(00\)80302-1](https://doi.org/10.1016/s0162-3109(00)80302-1)

Gehrmann, J., Matsumoto, Y., & Kreutzberg, G. W. (1995). Microglia: Intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 20(3), 269-287. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(94\)00015-h](https://doi.org/10.1016/0165-0173(94)00015-h)

Gengler, S., Gault, V. A., Harriott, P., & Hölscher, C. (2007). Impairments of hippocampal synaptic plasticity induced by aggregated beta-amyloid (25-35) are dependent on stimulation-protocol and genetic background. *Experimental Brain Research*, 179(4), 621-630. <https://doi.org/10.1007/s00221-006-0819-6>

Ghavami, S., Shojaei, S., Yeganeh, B., Ande, S. R., Jangamreddy, J. R., Mehrpour, M., Christofferson, J., Chaabane, W., Moghadam, A.

- R., Kashani, H. H., Hashemi, M., Owji, A. A., & Łos, M. J. (2014). Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Progress in Neurobiology*, 112, 24-49. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.10.004>
- Ghosh, D., LeVault, K. R., Barnett, A. J., & Brewer, G. J. (2012). A Reversible Early Oxidized Redox State That Precedes Macromolecular ROS Damage in Aging Nontransgenic and 3xTg-AD Mouse Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 32(17), 5821-5832. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6192-11.2012>
- Giaume, C., Sáez, J. C., Song, W., Leybaert, L., & Naus, C. C. (2019). Connexins and pannexins in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 695, 100-105. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.09.006>
- Gil i Saladié, D., Jarne Esparcia, A., & Peña i Casanova, J. (1989). [Language analysis in Alzheimer's disease]. *Neurologia (Barcelona, Spain)*, 4(6), 200-205.
- Giulian, D. (1999). Microglia and the immune pathology of Alzheimer disease. *American Journal of Human Genetics*, 65(1), 13-18.
- Glass, W. G., Liu, M. T., Kuziel, W. A., & Lane, T. E. (2001). Reduced macrophage infiltration and demyelination in mice lacking the chemokine receptor CCR5 following infection with a neurotropic coronavirus. *Virology*, 288(1), 8-17. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1050>
- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., & James, L. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 349(6311), 704-706. <https://doi.org/10.1038/349704a0>
- Goldeck, D., Larbi, A., Pellicanó, M., Alam, I., Zerr, I., Schmidt, C., Fulop, T., & Pawelec, G. (2013). Enhanced Chemokine Receptor Expression on Leukocytes of Patients with Alzheimer's Disease. *PLOS ONE*, 8(6), e66664. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066664>

González Montalvo, J. I., del ser Quijano, T., & Bermejo Pareja, F. (1990). [Dementia. Language and previous intelligence. Review]. *Archivos De Neurobiología*, 53(5), 162-170.

Gorelick, P. B. (2010). Role of inflammation in cognitive impairment: Results of observational epidemiological studies and clinical trials. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1207, 155-162. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05726.x>

Götz, M. E., Wacker, M., Luckhaus, C., Wanek, P., Tatschner, T., Jellinger, K., Leblhuber, F., Ransmayr, G., Riederer, P., & Eder, E. (2002). Unaltered brain levels of 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts of trans-4-hydroxy-2-nonenal in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 324(1), 49-52. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(02\)00163-5](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)00163-5)

Gould, D. A., Haslanger, K. D., & Vladeck, B. C. (1992). Coming of age: Home care in the 1990s. *Pride Institute Journal of Long Term Home Health Care*, 11(1), 19-28.

Green, R. C., Schneider, L. S., Amato, D. A., Beelen, A. P., Wilcock, G., Swabb, E. A., Zavitz, K. H., & Tarenflur bil Phase 3 Study Group. (2009). Effect of tarenflur bil on cognitive decline and activities of daily living in patients with mild Alzheimer disease: A randomized controlled trial. *JAMA*, 302(23), 2557-2564. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1866>

Griffin, W. S. T., & Mrak, R. E. (2002). Interleukin-1 in the genesis and progression of and risk for development of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Journal of Leukocyte Biology*, 72(2), 233-238.

Gubandru, M., Margina, D., Tsitsimpikou, C., Goutzourelas, N., Tsarouhas, K., Ilie, M., Tsatsakis, A. M., & Kouretas, D. (2013). Alzheimer's disease treated patients showed different patterns for oxidative stress and inflammation markers. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 61, 209-214. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.013>

Guétin, S., Portet, F., Picot, M. C., Pommié, C., Messaoudi, M., Djabelkir, L., Olsen, A. L., Cano, M. M., Lecourt, E., & Touchon, J.

(2009). Effect of music therapy on anxiety and depression in patients with Alzheimer's type dementia: Randomised, controlled study. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 28(1), 36-46. <https://doi.org/10.1159/000229024>

Guillamón-Vivancos, T., Gómez-Pinedo, U., & Matías-Guiu, J. (2015). Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): Function and molecular description. *Neurologia (Barcelona, Spain)*, 30(2), 119-129. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2012.12.007>

Guo, W., Zhu, P., & Brodowsky, H. (1997). The study for optimization of chromatographic condition by means of artificial neural networks. *Talanta*, 44(11), 1995-2001. [https://doi.org/10.1016/s0039-9140\(96\)02171-6](https://doi.org/10.1016/s0039-9140(96)02171-6)

Gutteridge, J. M. C., & Halliwell, B. (2010). Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(4), 561-564. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.071>

Gutteridge, J. M., & Halliwell, B. (1992). Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. *Free Radical Biology & Medicine*, 12(1), 93-95. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(92\)90062-I](https://doi.org/10.1016/0891-5849(92)90062-I)

Haass, C. (2004). Take five—BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *The EMBO Journal*, 23(3), 483-488. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600061>

Haass, C., & Baumeister, R. (1999). The biological and pathological function of presenilin proteins—Simple cell systems and a worm in Alzheimer's disease research. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 249 Suppl 3, 23-27. <https://doi.org/10.1007/pl00014169>

Haass, C., Hung, A. Y., Schlossmacher, M. G., Teplow, D. B., & Selkoe, D. J. (1993). Beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(5), 3021-3024.

- Haines, J. D., Fulton, D. L., Richard, S., & Almazan, G. (2015). P38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway Regulates Genes during Proliferation and Differentiation in Oligodendrocytes. *PLOS ONE*, *10*(12), e0145843. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145843>
- Halaris, A. (2013). Inflammation, heart disease, and depression. *Current Psychiatry Reports*, *15*(10), 400. <https://doi.org/10.1007/s11920-013-0400-5>
- Halks-Miller, M., Schroeder, M. L., Haroutunian, V., Moenning, U., Rossi, M., Achim, C., Purohit, D., Mahmoudi, M., & Horuk, R. (2003). CCR1 is an early and specific marker of Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, *54*(5), 638-646. <https://doi.org/10.1002/ana.10733>
- Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry*, *59*(5), 1609-1623. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb10990.x>
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M., & Cross, C. E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *119*(6), 598-620.
- Hanaki, M., Murakami, K., Katayama, S., Akagi, K.-I., & Irie, K. (2018). Mechanistic analyses of the suppression of amyloid  $\beta$ 42 aggregation by apomorphine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *26*(8), 1538-1546. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.01.028>
- Harada, J., & Sugimoto, M. (1999). Activation of caspase-3 in beta-amyloid-induced apoptosis of cultured rat cortical neurons. *Brain Research*, *842*(2), 311-323. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)01808-9](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)01808-9)
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science (New York, N.Y.)*, *256*(5054), 184-185. <https://doi.org/10.1126/science.1566067>
- Henderson, V. W. (2014). Alzheimer's disease: Review of hormone therapy trials and implications for treatment and prevention after menopause. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *142*, 99-106. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.05.010>

Hensley, K., Hall, N., Subramaniam, R., Cole, P., Harris, M., Aksenov, M., Aksenova, M., Gabbita, S. P., Wu, J. F., & Carney, J. M. (1995). Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *Journal of Neurochemistry*, 65(5), 2146-2156. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65052146.x>

Heredia Antúnez, A. P., Vanda Cantón, B., Santillán-Doherty, P., Heredia Antúnez, A. P., Vanda Cantón, B., & Santillán-Doherty, P. (2021). Retos de los Comités de Ética en Investigación en Animales. Experiencia de México. *Revista de Bioética y Derecho*, 51, 99-121.

Hermon, M., Cairns, N., Egly, J. M., Fery, A., Labudova, O., & Lubec, G. (1998). Expression of DNA excision-repair-cross-complementing proteins p80 and p89 in brain of patients with Down Syndrome and Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 251(1), 45-48. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(98\)00488-1](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(98)00488-1)

Hickman-Davis, J. M., & Davis, I. C. (2006). Transgenic mice. *Paediatric Respiratory Reviews*, 7(1), 49-53. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2005.09.005>

Hoenicka, J. (2006). [Genes in Alzheimer's disease]. *Revista De Neurologia*, 42(5), 302-305.

Horner, P. J., Power, A. E., Kempermann, G., Kuhn, H. G., Palmer, T. D., Winkler, J., Thal, L. J., & Gage, F. H. (2000). Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(6), 2218-2228. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-06-02218.2000>

Horuk, R. (2007). Chemokines. *The Scientific World JOURNAL*, 7, 224-232. <https://doi.org/10.1100/tsw.2007.6>

Huang, J., Yang, G., Xiong, X., Wang, M., Yuan, J., Zhang, Q., Gong, C., Qiu, Z., Meng, Z., Xu, R., Chen, Q., Chen, R., Xie, L., Xie, Q., Zi, W., Jiang, G., Zhou, Y., & Yang, Q. (2020). Age-related CCL12 Aggravates Intracerebral Hemorrhage-induced Brain Injury via Recruitment of Macrophages and T Lymphocytes. *Aging and Disease*, 11(5), 1103-1115. <https://doi.org/10.14336/AD.2019.1229>



- Huber, G., Martin, J. R., Löffler, J., & Moreau, J. L. (1993). Involvement of amyloid precursor protein in memory formation in the rat: An indirect antibody approach. *Brain Research*, *603*(2), 348-352. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)91261-p](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)91261-p)
- Hughes, C. E., & Nibbs, R. J. B. (2018). A guide to chemokines and their receptors. *The FEBS Journal*, *285*(16), 2944-2971. <https://doi.org/10.1111/febs.14466>
- Hüll, M., Fiebich, B. L., Schumann, G., Lieb, K., & Bauer, J. (1999). Anti-inflammatory substances – a new therapeutic option in Alzheimer's disease. *Drug Discovery Today*, *4*(6), 275-282. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(99\)01339-2](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(99)01339-2)
- Hwang, C. J., Park, M. H., Hwang, J. Y., Kim, J. H., Yun, N. Y., Oh, S. Y., Song, J. K., Seo, H. O., Kim, Y.-B., Hwang, D. Y., Oh, K.-W., Han, S.-B., & Hong, J. T. (2016). CCR5 deficiency accelerates lipopolysaccharide-induced astrogliosis, amyloid-beta deposit and impaired memory function. *Oncotarget*, *7*(11), 11984-11999. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7453>
- Igbavboa, U., Sun, G. Y., Weisman, G. A., He, Y., & Wood, W. G. (2009). Amyloid beta-protein stimulates trafficking of cholesterol and caveolin-1 from the plasma membrane to the Golgi complex in mouse primary astrocytes. *Neuroscience*, *162*(2), 328-338. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.04.049>
- Iida, T., Furuta, A., Nishioka, K., Nakabeppu, Y., & Iwaki, T. (2002). Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase is reduced and associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathologica*, *103*(1), 20-25. <https://doi.org/10.1007/s004010100418>
- Ito, S., Sawada, M., Haneda, M., Ishida, Y., & Isobe, K. (2006). Amyloid-beta peptides induce several chemokine mRNA expressions in the primary microglia and Ra2 cell line via the PI3K/Akt and/or ERK pathway. *Neuroscience Research*, *56*(3), 294-299. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2006.07.009>
- Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., & Ihara, Y. (1994). Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile

plaques with end-specific A beta monoclonals: Evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron*, 13(1), 45-53. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90458-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90458-8)

Jaerve, A., & Müller, H. W. (2012). Chemokines in CNS injury and repair. *Cell and Tissue Research*, 349(1), 229-248. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1427-3>

Jayasena, T., Poljak, A., Smythe, G., Braid, N., Münch, G., & Sachdev, P. (2013). The role of polyphenols in the modulation of sirtuins and other pathways involved in Alzheimer's disease. *Ageing Research Reviews*, 12(4), 867-883. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2013.06.003>

Jiménez de la Peña, M. M., Gómez Vicente, L., García Cobos, R., & Martínez de Vega, V. (2018). Neuroradiologic correlation with aphasias. Cortico-subcortical map of language. *Radiologia*, 60(3), 250-261. <https://doi.org/10.1016/j.rx.2017.12.008>

Jiménez-Jiménez, F. J., Alonso-Navarro, H., Ayuso-Peralta, L., & Jabbour-Wadiah, T. (2006). [Oxidative stress and Alzheimer's disease]. *Revista De Neurologia*, 42(7), 419-427.

Johnson, W. M., Wilson-Delfosse, A. L., & Mielke, John. J. (2012). Dysregulation of Glutathione Homeostasis in Neurodegenerative Diseases. *Nutrients*, 4(10), 1399-1440. <https://doi.org/10.3390/nu4101399>

Jones, P. M., O'Mara, M. L., & George, A. M. (2009). ABC transporters: A riddle wrapped in a mystery inside an enigma. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(10), 520-531. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.06.004>

Jorda, A., Campos-Campos, J., Iradi, A., Aldasoro, M., Aldasoro, C., Vila, J. M., & Valles, S. L. (2020). The Role of Chemokines in Alzheimer's Disease. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets*, 20(9), 1383-1390. <https://doi.org/10.2174/1871530320666200131110744>

Jorda, A., Cauli, O., Santonja, J. M., Aldasoro, M., Aldasoro, C., Obrador, E., Vila, J. M. <sup>a</sup>, Mauricio, M. <sup>a</sup> D., Iradi, A., Guerra-Ojeda, S., Marchio, P., & Valles, S. L. (2019). Changes in Chemokines and

Chemokine Receptors Expression in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *International Journal of Biological Sciences*, 15(2), 453-463. <https://doi.org/10.7150/ijbs.26703>

Jung, G. Y., Lee, J. Y., Rhim, H., Oh, T. H., & Yune, T. Y. (2013). An increase in voltage-gated sodium channel current elicits microglial activation followed inflammatory responses in vitro and in vivo after spinal cord injury. *Glia*, 61(11), 1807-1821. <https://doi.org/10.1002/glia.22559>

Kabelitz, D., & Wesch, D. (2003). Features and functions of gamma delta T lymphocytes: Focus on chemokines and their receptors. *Critical Reviews in Immunology*, 23(5-6), 339-370. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v23.i56.10>

Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., Multhaup, G., Beyreuther, K., & Müller-Hill, B. (1987). The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 325(6106), 733-736. <https://doi.org/10.1038/325733a0>

Kang, J.-E., Lim, M. M., Bateman, R. J., Lee, J. J., Smyth, L. P., Cirrito, J. R., Fujiki, N., Nishino, S., & Holtzman, D. M. (2009). Amyloid-beta dynamics are regulated by orexin and the sleep-wake cycle. *Science (New York, N.Y.)*, 326(5955), 1005-1007. <https://doi.org/10.1126/science.1180962>

Karelson, E., Bogdanovic, N., Garlind, A., Winblad, B., Zilmer, K., Kullisaar, T., Vihalemm, T., Kairane, C., & Zilmer, M. (2001). The Cerebrocortical Areas in Normal Brain Aging and in Alzheimer's Disease: Noticeable Differences in the Lipid Peroxidation Level and in Antioxidant Defense. *Neurochemical Research*, 26(4), 353-361. <https://doi.org/10.1023/A:1010942929678>

Karve, I. P., Taylor, J. M., & Crack, P. J. (2016). The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *British Journal of Pharmacology*, 173(4), 692-702. <https://doi.org/10.1111/bph.13125>

Kaul, M., Ma, Q., Medders, K. E., Desai, M. K., & Lipton, S. A. (2007). HIV-1 coreceptors CCR5 and CXCR4 both mediate neuronal cell death but CCR5 paradoxically can also contribute to protection. *Cell*

*Death and Differentiation*, 14(2), 296-305.  
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402006>

Kehl, L. J., Fairbanks, C. A., Laughlin, T. M., & Wilcox, G. L. (1997). Neurogenesis in postnatal rat spinal cord: A study in primary culture. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5312), 586-589.  
<https://doi.org/10.1126/science.276.5312.586>

Keshav, S., Vaňásek, T., Niv, Y., Petryka, R., Howaldt, S., Bafutto, M., Rácz, I., Hetzel, D., Nielsen, O. H., Vermeire, S., Reinisch, W., Karlén, P., Schreiber, S., Schall, T. J., Bekker, P., & Prospective Randomized Oral-Therapy Evaluation in Crohn's Disease Trial-1 PROTECT-1 Study Group. (2013). A randomized controlled trial of the efficacy and safety of CCX282-B, an orally-administered blocker of chemokine receptor CCR9, for patients with Crohn's disease. *PLoS One*, 8(3), e60094. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060094>

Khaibullin, T., Ivanova, V., Martynova, E., Cherepnev, G., Khabirov, F., Granatov, E., Rizvanov, A., & Khaiboullina, S. (2017). Elevated Levels of Proinflammatory Cytokines in Cerebrospinal Fluid of Multiple Sclerosis Patients. *Frontiers in Immunology*, 8.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00531>

Khan, S., Barve, K. H., & Kumar, M. S. (2020). Recent Advancements in Pathogenesis, Diagnostics and Treatment of Alzheimer's Disease. *Current Neuropharmacology*, 18(11), 1106-1125.  
<https://doi.org/10.2174/1570159X18666200528142429>

Kim, H. Y., Kim, H. V., Lee, D. K., Yang, S.-H., & Kim, Y. (2016). Rapid and sustained cognitive recovery in APP/PS1 transgenic mice by co-administration of EPPS and donepezil. *Scientific Reports*, 6, 34165. <https://doi.org/10.1038/srep34165>

Kim, J. Y., Kim, J., Huang, M., Kosonen, R., & Lee, J. E. (2022). CCR4 and CCR5 Involvement in Monocyte-Derived Macrophage Migration in Neuroinflammation. *Frontiers in Immunology*, 13, 876033. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.876033>

Kimberly, W. T., LaVoie, M. J., Ostaszewski, B. L., Ye, W., Wolfe, M. S., & Selkoe, D. J. (2003). Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2.

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(11), 6382-6387.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1037392100>

King, J. R., Gillevet, T. C., & Kabbani, N. (2017). A G protein-coupled  $\alpha 7$  nicotinic receptor regulates signaling and TNF- $\alpha$  release in microglia. *FEBS Open Bio*, 7(9), 1350-1361.  
<https://doi.org/10.1002/2211-5463.12270>

Kjærgaard, K., Mikkelsen, Acd., Wernberg, C., Grønkjær, L., Eriksen, P., Damholdt, M., Mookerjee, R., Vilstrup, H., Lauridsen, M., & Thomsen, K. (2021). Cognitive Dysfunction in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease-Current Knowledge, Mechanisms and Perspectives. *Journal of Clinical Medicine*, 10(4).  
<https://doi.org/10.3390/jcm10040673>

Knopman, D., Donohue, J. A., & Guterman, E. M. (2000). Patterns of Care in the Early Stages of Alzheimer's Disease: Impediments to Timely Diagnosis. *Journal of the American Geriatrics Society*, 48(3), 300-304. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2000.tb02650.x>

Knopman, D. S., Haeberlein, S. B., Carrillo, M. C., Hendrix, J. A., Kerchner, G., Margolin, R., Maruff, P., Miller, D. S., Tong, G., Tome, M. B., Murray, M. E., Nelson, P. T., Sano, M., Mattsson, N., Sultzer, D. L., Montine, T. J., Jack Jr., C. R., Kolb, H., Petersen, R. C., ... Siemers, E. (2018). The National Institute on Aging and the Alzheimer's Association Research Framework for Alzheimer's disease: Perspectives from the Research Roundtable. *Alzheimer's & Dementia*, 14(4), 563-575. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.03.002>

Kondo, T., & Raff, M. (2000). Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 289(5485), 1754-1757.  
<https://doi.org/10.1126/science.289.5485.1754>

Könner, A. C., & Brüning, J. C. (2011). Toll-like receptors: Linking inflammation to metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 22(1), 16-23.  
<https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.08.007>

Korbecki, J., Grochans, S., Gutowska, I., Barczak, K., & Baranowska-Bosiacka, I. (2020). *CC Chemokines in a Tumor: A Review of Pro-Cancer and Anti-Cancer Properties of Receptors CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, and CCR10 Ligands—PMC*.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7590012/>

Krammer, S., Yang, Z., Zimmermann, T., Xepapadaki, P., Geppert, C. I., Papadopoulos, N. G., & Finotto, S. (2022). An Immunoregulatory Role of Interleukin-3 in Allergic Asthma. *Frontiers in Immunology*, 13.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.821658>

Kumar, R., Chaterjee, P., Sharma, P. K., Singh, A. K., Gupta, A., Gill, K., Tripathi, M., Dey, A. B., & Dey, S. (2013). Sirtuin1: A promising serum protein marker for early detection of Alzheimer's disease. *PLoS One*, 8(4), e61560. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061560>

Kusumoto, M., Xu, B., Shi, M., Matsuyama, T., Aoyama, K., & Takeuchi, T. (2007). Expression of chemokine receptor CCR4 and its ligands (CCL17 and CCL22) in murine contact hypersensitivity. *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 27(11), 901-910. <https://doi.org/10.1089/jir.2006.0064>

LaFerla, F. M., Green, K. N., & Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, 8(7), 499-509. <https://doi.org/10.1038/nrn2168>

LaFerla, F. M., & Oddo, S. (2005). Alzheimer's disease: Aβ, tau and synaptic dysfunction. *Trends in Molecular Medicine*, 11(4), 170-176. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2005.02.009>

Lahiri, D. K., Chen, D.-M., Lahiri, P., Bondy, S., & Greig, N. H. (2005). Amyloid, cholinesterase, melatonin, and metals and their roles in aging and neurodegenerative diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1056, 430-449. <https://doi.org/10.1196/annals.1352.008>

Lashuel, H. A., Hartley, D. M., Balakhaneh, D., Aggarwal, A., Teichberg, S., & Callaway, D. J. E. (2002). New class of inhibitors of amyloid-beta fibril formation. Implications for the mechanism of

pathogenesis in Alzheimer's disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(45), 42881-42890.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M206593200>

Lassmann, H., Bancher, C., Breitschopf, H., Wegiel, J., Bobinski, M., Jellinger, K., & Wisniewski, H. M. (1995). Cell death in Alzheimer's disease evaluated by DNA fragmentation in situ. *Acta Neuropathologica*, 89(1), 35-41. <https://doi.org/10.1007/BF00294257>

Laurent, C., Dorothée, G., Hunot, S., Martin, E., Monnet, Y., Duchamp, M., Dong, Y., Légeron, F.-P., Leboucher, A., Burnouf, S., Faivre, E., Carvalho, K., Caillierez, R., Zommer, N., Demeyer, D., Jouy, N., Sazdovitch, V., Schraen-Maschke, S., Delarasse, C., ... Blum, D. (2017). Hippocampal T cell infiltration promotes neuroinflammation and cognitive decline in a mouse model of tauopathy. *Brain: A Journal of Neurology*, 140(1), 184-200. <https://doi.org/10.1093/brain/aww270>

Le, Y., Zhou, ye, Iribarren, P., & Wang, J. (2004). Chemokines and chemokine receptors: Their manifold roles in homeostasis and disease [J]. *Cellular & molecular immunology*, 1, 95-104.

Lee, M., Schwab, C., & McGeer, P. L. (2011). Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity. *Glia*, 59(1), 152-165. <https://doi.org/10.1002/glia.21087>

Lee, M.-C., Ting, K. K., Adams, S., Brew, B. J., Chung, R., & Guillemain, G. J. (2010). Characterisation of the expression of NMDA receptors in human astrocytes. *PloS One*, 5(11), e14123. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014123>

Lee, Y. K., Kwak, D. H., Oh, K. W., Nam, S.-Y., Lee, B. J., Yun, Y. W., Kim, Y.-B., Han, S. B., & Hong, J. T. (2009). CCR5 deficiency induces astrocyte activation, Abeta deposit and impaired memory function. *Neurobiology of Learning and Memory*, 92(3), 356-363. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2009.04.003>

Lesnefsky, E., Moghaddas, S., Tandler, B., Kerner, J., & Hoppel, C. (2001). Mitochondrial Dysfunction in Cardiac Disease: Ischemia-Reperfusion, Aging, and Heart Failure. *Journal of Molecular and*

*Cellular Cardiology*, 33, 1065-1089.  
<https://doi.org/10.1006/jmcc.2001.1378>

Lesourd, M., Le Gall, D., Baumard, J., Croisile, B., Jarry, C., & Osiurak, F. (2013). Apraxia and Alzheimer's disease: Review and perspectives. *Neuropsychology Review*, 23(3), 234-256.  
<https://doi.org/10.1007/s11065-013-9235-4>

Levey, A. I. (1996). Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits: Implications for treatment of Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24), 13541-13546.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13541>

Levi-Montalcini, R., & Hamburger, V. (1951). Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo. *The Journal of Experimental Zoology*, 116(2), 321-361. <https://doi.org/10.1002/jez.1401160206>

Levy-Lahad, E., Wasco, W., Poorkaj, P., Romano, D. M., Oshima, J., Pettingell, W. H., Yu, C. E., Jondro, P. D., Schmidt, S. D., & Wang, K. (1995). Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5226), 973-977.  
<https://doi.org/10.1126/science.7638622>

Lewis, J., Dickson, D. W., Lin, W. L., Chisholm, L., Corral, A., Jones, G., Yen, S. H., Sahara, N., Skipper, L., Yager, D., Eckman, C., Hardy, J., Hutton, M., & McGowan, E. (2001). Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5534), 1487-1491.  
<https://doi.org/10.1126/science.1058189>

Li, B.-H., Garstka, M. A., & Li, Z.-F. (2020). Chemokines and their receptors promoting the recruitment of myeloid-derived suppressor cells into the tumor. *Molecular Immunology*, 117, 201-215.  
<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.11.014>

Li, H.-L., Wang, L.-H., Hu, Y.-L., Feng, Y., Li, X.-H., Liu, Y.-F., Li, P., Mao, Q.-S., & Xue, W.-J. (2020). Clinical and prognostic significance of CC chemokine receptor type 8 protein expression in



gastrointestinal stromal tumors. *World Journal of Gastroenterology*, 26(31), 4656-4668. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i31.4656>

Li, L., Dong, H., Song, E., Xu, X., Liu, L., & Song, Y. (2014). Nrf2/ARE pathway activation, HO-1 and NQO1 induction by polychlorinated biphenyl quinone is associated with reactive oxygen species and PI3K/AKT signaling. *Chemico-Biological Interactions*, 209, 56-67. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.12.005>

Li, M., & Ransohoff, R. M. (2008). Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: A migration from immunology to neurobiology. *Progress in neurobiology*, 84(2), 116-131. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.11.003>

Lim, S. Y., Yuzhalin, A. E., Gordon-Weeks, A. N., & Muschel, R. J. (2016). Targeting the CCL2-CCR2 signaling axis in cancer metastasis. *Oncotarget*, 7(19), 28697-28710. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7376>

Limoli, P. G., Vingolo, E. M., Limoli, C., Scalinci, S. Z., & Nebbioso, M. (2018). Regenerative Therapy by Suprachoroidal Cell Autograft in Dry Age-related Macular Degeneration: Preliminary In Vivo Report. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 132. <https://doi.org/10.3791/56469>

Lindsay, J., Laurin, D., Verreault, R., Hébert, R., Helliwell, B., Hill, G. B., & McDowell, I. (2002). Risk factors for Alzheimer's disease: A prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging. *American Journal of Epidemiology*, 156(5), 445-453. <https://doi.org/10.1093/aje/kwf074>

Liu, B., & Hong, J.-S. (2003). Role of Microglia in Inflammation-Mediated Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Strategies for Therapeutic Intervention. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 304(1), 1-7. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.035048>

Lockshin, R. A., & Zakeri, Z. (2004). Apoptosis, autophagy, and more. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(12), 2405-2419. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.04.011>

- Lök, N., Bademli, K., & Selçuk-Tosun, A. (2019). The effect of reminiscence therapy on cognitive functions, depression, and quality of life in Alzheimer patients: Randomized controlled trial. *International Journal of Geriatric Psychiatry*, 34(1), 47-53. <https://doi.org/10.1002/gps.4980>
- Lööv, C., Hillered, L., Ebendal, T., & Erlandsson, A. (2012). *Engulfing Astrocytes Protect Neurons from Contact-Induced Apoptosis following Injury*. *PLoS One*. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0033090>
- Lorigados-Pedre, L., & Bergado-Rosado, J. (2004). [Nerve growth factor in neurodegeneration and neurorestorative therapy]. *Revista De Neurologia*, 38(10), 957-971.
- Losy, J. (2013). Is MS an inflammatory or primary degenerative disease? *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 120(10), 1459-1462. <https://doi.org/10.1007/s00702-013-1079-9>
- Love, S., Barber, R., & Wilcock, G. K. (1999). Increased poly(ADP-ribose)ylation of nuclear proteins in Alzheimer's disease. *Brain: A Journal of Neurology*, 122 ( Pt 2), 247-253. <https://doi.org/10.1093/brain/122.2.247>
- Lovell, M. A., Ehmann, W. D., Butler, S. M., & Markesbery, W. R. (1995). Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology*, 45(8), 1594-1601. <https://doi.org/10.1212/wnl.45.8.1594>
- Lovinger, D. M. (2008). Communication Networks in the Brain. *Alcohol Research & Health*, 31(3), 196-214.
- Lue, L. F., Rydel, R., Brigham, E. F., Yang, L. B., Hampel, H., Murphy, G. M., Brachova, L., Yan, S. D., Walker, D. G., Shen, Y., & Rogers, J. (2001). Inflammatory repertoire of Alzheimer's disease and nondemented elderly microglia in vitro. *Glia*, 35(1), 72-79. <https://doi.org/10.1002/glia.1072>
- Lujan, B., Kushmerick, C., Das Banerjee, T., Dagda, R. K., & Renden, R. (2016). Glycolysis selectively shapes the presynaptic action potential waveform. *Journal of Neurophysiology*, 116(6), 2523-2540.

Luo, X., Li, M., Huang, L., Nho, K., Deng, M., Chen, Q., Weinberger, D. R., Vasquez, A. A., Rijpkema, M., Mattay, V. S., Saykin, A. J., Shen, L., Fernández, G., Franke, B., Chen, J., Chen, X., Wang, J.-K., Xiao, X., Qi, X., ... Su, B. (2012). The interleukin 3 gene (IL3) contributes to human brain volume variation by regulating proliferation and survival of neural progenitors. *PloS One*, *7*(11), e50375. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050375>

Luterman, J. D., Haroutunian, V., Yemul, S., Ho, L., Purohit, D., Aisen, P. S., Mohs, R., & Pasinetti, G. M. (2000). Cytokine gene expression as a function of the clinical progression of Alzheimer disease dementia. *Archives of Neurology*, *57*(8), 1153-1160. <https://doi.org/10.1001/archneur.57.8.1153>

Lyras, L., Cairns, N. J., Jenner, A., Jenner, P., & Halliwell, B. (1997). An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, *68*(5), 2061-2069. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.68052061.x>

Mackay, C. R. (2001). Chemokines: Immunology's high impact factors. *Nature Immunology*, *2*(2), 95-101. <https://doi.org/10.1038/84298>

Magavi, S. S., Leavitt, B. R., & Macklis, J. D. (2000). Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature*, *405*(6789), 951-955. <https://doi.org/10.1038/35016083>

Majzoub, J. A., & Muglia, L. J. (1996). Knockout mice. *The New England Journal of Medicine*, *334*(14), 904-907. <https://doi.org/10.1056/NEJM199604043341407>

Maloney, B., & Lahiri, D. K. (2011). The Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide (A $\beta$ ) binds a specific DNA A $\beta$ -interacting domain (A $\beta$ ID) in the APP, BACE1, and APOE promoters in a sequence-specific manner: Characterizing a new regulatory motif. *Gene*, *488*(1-2). <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.06.004>

Man, S.-M., Ma, Y.-R., Shang, D.-S., Zhao, W.-D., Li, B., Guo, D.-W., Fang, W.-G., Zhu, L., & Chen, Y.-H. (2007). Peripheral T cells overexpress MIP-1alpha to enhance its transendothelial migration in

Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 28(4), 485-496.  
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.02.013>

Manzano Fernández, S., González Requejo, J., Marcos Navarro, A., Payno, M., Villanueva Álvarez Santullano, C., & Matías-Guiu, J. (2009). Modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer. *Neurología*, 24(4), 255-262.

Marchand, F., Perretti, M., & McMahon, S. B. (2005). Role of the immune system in chronic pain. *Nature Reviews. Neuroscience*, 6(7), 521-532. <https://doi.org/10.1038/nrn1700>

Marcus, D. L., Thomas, C., Rodriguez, C., Simberkoff, K., Tsai, J. S., Strafaci, J. A., & Freedman, M. L. (1998). Increased peroxidation and reduced antioxidant enzyme activity in Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*, 150(1), 40-44.  
<https://doi.org/10.1006/exnr.1997.6750>

Markesbery, W. R., & Lovell, M. A. (1998). Four-hydroxynonenal, a product of lipid peroxidation, is increased in the brain in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 19(1), 33-36.  
[https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(98\)00009-8](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(98)00009-8)

Marques, R. E., Guabiraba, R., Russo, R. C., & Teixeira, M. M. (2013). Targeting CCL5 in inflammation. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 17(12), 1439-1460.  
<https://doi.org/10.1517/14728222.2013.837886>

Martin, E., & Delarasse, C. (2018). Complex role of chemokine mediators in animal models of Alzheimer's Disease. *Biomedical Journal*, 41(1), 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.01.002>

Matute, C. (2007). Interaction between glutamate signalling and immune attack in damaging oligodendrocytes. *Neuron Glia Biology*, 3(4), 281-285. <https://doi.org/10.1017/S1740925X08000033>

McCully, M. L., Collins, P. J., Hughes, T. R., Thomas, C. P., Billen, J., O'Donnell, V. B., & Moser, B. (2015). Skin Metabolites Define a New Paradigm in the Localization of Skin Tropic Memory T Cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 195(1), 96-104.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402961>

McDonald, W. I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H. P., Lublin, F. D., McFarland, H. F., Paty, D. W., Polman, C. H., Reingold, S. C., Sandberg-Wollheim, M., Sibley, W., Thompson, A., van den Noort, S., Weinshenker, B. Y., & Wolinsky, J. S. (2001). Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: Guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, *50*(1), 121-127. <https://doi.org/10.1002/ana.1032>

McGeer, P. L., Schulzer, M., & McGeer, E. G. (1996). Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: A review of 17 epidemiologic studies. *Neurology*, *47*(2), 425-432. <https://doi.org/10.1212/wnl.47.2.425>

Mecocci, P., MacGarvey, U., & Beal, M. F. (1994). Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, *36*(5), 747-751. <https://doi.org/10.1002/ana.410360510>

Mesulam, M.-M., Rogalski, E. J., Wieneke, C., Hurley, R. S., Geula, C., Bigio, E. H., Thompson, C. K., & Weintraub, S. (2014). Primary progressive aphasia and the evolving neurology of the language network. *Nature Reviews. Neurology*, *10*(10), 554-569. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2014.159>

Mesulam, M.-M., Weintraub, S., Rogalski, E. J., Wieneke, C., Geula, C., & Bigio, E. H. (2014). Asymmetry and heterogeneity of Alzheimer's and frontotemporal pathology in primary progressive aphasia. *Brain: A Journal of Neurology*, *137*(Pt 4), 1176-1192. <https://doi.org/10.1093/brain/awu024>

Metsaars, W. P., Haw, J.-J., van Welsem, M. E., & Duyckaerts, C. (2003). A grading system of Alzheimer disease lesions in neocortical areas. *Neurobiology of Aging*, *24*(4), 563-572. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(02\)00134-3](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(02)00134-3)

Meziane, H., Dodart, J. C., Mathis, C., Little, S., Clemens, J., Paul, S. M., & Ungerer, A. (1998). Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(21), 12683-12688. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12683>

Mietelska-Porowska, A., & Wojda, U. (2017). T Lymphocytes and Inflammatory Mediators in the Interplay between Brain and Blood in Alzheimer's Disease: Potential Pools of New Biomarkers. *Journal of Immunology Research*, 2017, e4626540. <https://doi.org/10.1155/2017/4626540>

Mildner, A., Schlevogt, B., Kierdorf, K., Böttcher, C., Erny, D., Kummer, M. P., Quinn, M., Brück, W., Bechmann, I., Heneka, M. T., Priller, J., & Prinz, M. (2011). Distinct and non-redundant roles of microglia and myeloid subsets in mouse models of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(31), 11159-11171. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6209-10.2011>

Moir, R., & Tanzi, R. (2018). The antimicrobial protection hypothesis of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 14(12). <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.06.3040>

Montine, T. J., Huang, D. Y., Valentine, W. M., Amarnath, V., Saunders, A., Weisgraber, K. H., Graham, D. G., & Strittmatter, W. J. (1996). Crosslinking of apolipoprotein E by products of lipid peroxidation. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 55(2), 202-210. <https://doi.org/10.1097/00005072-199602000-00009>

Morimoto, T., Ohsawa, I., Takamura, C., Ishiguro, M., & Kohsaka, S. (1998). Involvement of amyloid precursor protein in functional synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 51(2), 185-195. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19980115\)51:2<185::AID-JNR7>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19980115)51:2<185::AID-JNR7>3.0.CO;2-9)

Moser, B. (2022). Chemokine Receptor-Targeted Therapies: Special Case for CCR8. *Cancers*, 14(3), 511. <https://doi.org/10.3390/cancers14030511>

Moser, B., Wolf, M., Walz, A., & Loetscher, P. (2004). Chemokines: Multiple levels of leukocyte migration control. *Trends in Immunology*, 25(2), 75-84. <https://doi.org/10.1016/j.it.2003.12.005>

- Mrak, R. E., & Griffin, W. S. T. (2005). Potential inflammatory biomarkers in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 8(4), 369-375. <https://doi.org/10.3233/jad-2005-8406>
- Mullan, M., Crawford, F., Axelman, K., Houlden, H., Lilius, L., Winblad, B., & Lannfelt, L. (1992). A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nature Genetics*, 1(5), 345-347. <https://doi.org/10.1038/ng0892-345>
- Munoz, D. G., & Feldman, H. (2000). Causes of Alzheimer's disease. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal = Journal de l'Association Medicale Canadienne*, 162(1), 65-72.
- Murray, M. M., Krone, M. G., Bernstein, S. L., Baumketner, A., Condron, M. M., Lazo, N. D., Teplow, D. B., Wyttenbach, T., Shea, J.-E., & Bowers, M. T. (2009). Amyloid beta-protein: Experiment and theory on the 21-30 fragment. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 113(17), 6041-6046. <https://doi.org/10.1021/jp808384x>
- Naert, G., & Rivest, S. (2011). CC chemokine receptor 2 deficiency aggravates cognitive impairments and amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(16), 6208-6220. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0299-11.2011>
- Naert, G., & Rivest, S. (2013). A deficiency in CCR2+ monocytes: The hidden side of Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Cell Biology*, 5(5), 284-293. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjt028>
- Napoli, I., & Neumann, H. (2009). Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience*, 158(3), 1030-1038. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.06.046>
- Navabpour, S., Kwapis, J. L., & Jarome, T. J. (2020). A neuroscientist's guide to transgenic mice and other genetic tools. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 108, 732-748. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.12.013>

- Ndubaku, U., & de Bellard, M. E. (2008). Glial cells: Old cells with new twists. *Acta Histochemica*, 110(3), 182-195. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2007.10.003>
- Nedergaard, M., Takano, T., & Hansen, A. J. (2002). Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nature Reviews. Neuroscience*, 3(9), 748-755. <https://doi.org/10.1038/nrn916>
- Neitzert, K., Albayram, Ö., Göhrs, R., Müller, C., Karaca, I., Kumar, S., Cron, M., Walter, J., Förster, I., Bilkei-Gorzo, A., Maier, W., Zimmer, A., & Alferink, J. (2013). CCL17 deficiency is associated with beneficial CNS immune responses and prevents cognitive decline in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain, Behavior, and Immunity*, 29, S21. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.01.065>
- Nesmelova, I. V., Sham, Y., Gao, J., & Mayo, K. H. (2008). CXC and CC Chemokines Form Mixed Heterodimers: ASSOCIATION FREE ENERGIES FROM MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS AND EXPERIMENTAL CORRELATIONS\*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(35), 24155-24166. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803308200>
- Neumann, H., & Wekerle, H. (1998). Neuronal control of the immune response in the central nervous system: Linking brain immunity to neurodegeneration. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 57(1), 1-9. <https://doi.org/10.1097/00005072-199801000-00001>
- Newman, E. A. (2003). New roles for astrocytes: Regulation of synaptic transmission. *Trends in Neurosciences*, 26(10), 536-542. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00237-6](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00237-6)
- Nguyen, P., & Gerlai, R. (2002). Behavioural and physiological characterization of inbred mouse strains: Prospects for elucidating the molecular mechanisms of mammalian learning and memory. *Genes, brain, and behavior*, 1, 72-81. <https://doi.org/10.1034/j.1601-183X.2002.10202.x>
- Nichols, M. R., St-Pierre, M.-K., Wendeln, A.-C., Makoni, N. J., Gouwens, L. K., Garrad, E. C., Sohrabi, M., Neher, J. J., Tremblay, M.-E., & Combs, C. K. (2019). Inflammatory mechanisms in



neurodegeneration. *Journal of Neurochemistry*, 149(5), 562-581. <https://doi.org/10.1111/jnc.14674>

Novak, P., Cente, M., Kosikova, N., Augustin, T., Kvetnansky, R., Novak, M., & Filipcik, P. (2018). Stress-Induced Alterations of Immune Profile in Animals Suffering by Tau Protein-Driven Neurodegeneration. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 38(1), 243-259. <https://doi.org/10.1007/s10571-017-0491-3>

Novo, R., Azevedo, P. S., Minicucci, M. F., Zornoff, L. A. M., & Paiva, S. A. R. (2013). Effect of Beta-Carotene on Oxidative Stress and Expression of Cardiac Connexin 43. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 101(3), 233-239. <https://doi.org/10.5935/abc.20130160>

Nunomura, A., Perry, G., Aliev, G., Hirai, K., Takeda, A., Balraj, E. K., Jones, P. K., Ghanbari, H., Wataya, T., Shimohama, S., Chiba, S., Atwood, C. S., Petersen, R. B., & Smith, M. A. (2001). Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 60(8), 759-767. <https://doi.org/10.1093/jnen/60.8.759>

Nussbaum, R. L., & Ellis, C. E. (2003). Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *The New England Journal of Medicine*, 348(14), 1356-1364. <https://doi.org/10.1056/NEJM2003ra020003>

Ochipa, C., Rothi, L. J., & Heilman, K. M. (1992). Conceptual apraxia in Alzheimer's disease. *Brain: A Journal of Neurology*, 115 ( Pt 4), 1061-1071. <https://doi.org/10.1093/brain/115.4.1061>

Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y., & LaFerla, F. M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: Intracellular Abeta 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)

Okamura, T., Katayama, T., Obinata, C., Iso, Y., Chiba, Y., Kobayashi, H., Yamada, Y., Harashima, H., & Minami, M. (2012). Neuronal injury induces microglial production of macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  in rat corticostriatal slice cultures. *Journal of Neuroscience Research*, 90(11), 2127-2133. <https://doi.org/10.1002/jnr.23105>

Olazarán, J., Muñiz, R., Reisberg, B., Peña-Casanova, J., del Ser, T., Cruz-Jentoft, A. J., Serrano, P., Navarro, E., García de la Rocha, M. L., Frank, A., Galiano, M., Fernández-Bullido, Y., Serra, J. A., González-Salvador, M. T., & Sevilla, C. (2004). Benefits of cognitive-motor intervention in MCI and mild to moderate Alzheimer disease. *Neurology*, 63(12), 2348-2353. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000147478.03911.28>

Ortega-Camarillo, C., Díaz-Flores, M., Avalos-Rodríguez, A., Vergara-Onofre, M., & Rosales-Torres, A. M. (2001). La apoptosis y su importancia biomédica. *Gaceta Médica de México*, 137(6), 563-577.

Oshima, J., & Schellenberg, G. D. (1996). [STM-2, a candidate gene for the familial Alzheimer's disease on chromosome 1]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso. Protein, Nucleic Acid, Enzyme*, 41(10), 1448-1452.

Oshio, T., Kawashima, R., Kawamura, Y. I., Hagiwara, T., Mizutani, N., Okada, T., Otsubo, T., Inagaki-Ohara, K., Matsukawa, A., Haga, T., Kakuta, S., Iwakura, Y., Hosokawa, S., & Dohi, T. (2014). Chemokine receptor CCR8 is required for lipopolysaccharide-triggered cytokine production in mouse peritoneal macrophages. *PLoS One*, 9(4), e94445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094445>

Palmer, A. M., & Burns, M. A. (1994). Selective increase in lipid peroxidation in the inferior temporal cortex in Alzheimer's disease. *Brain Research*, 645(1-2), 338-342. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91670-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91670-5)

Palmer, T. D., Takahashi, J., & Gage, F. H. (1997). The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 8(6), 389-404. <https://doi.org/10.1006/mcne.1996.0595>

Pappolla, M. A., Chyan, Y. J., Omar, R. A., Hsiao, K., Perry, G., Smith, M. A., & Bozner, P. (1998). Evidence of oxidative stress and in vivo neurotoxicity of beta-amyloid in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: A chronic oxidative paradigm for testing

antioxidant therapies in vivo. *The American Journal of Pathology*, 152(4), 871-877.

Parekh, N., Mitis, F., & Sethi, D. (2015). Progress in preventing injuries: A content analysis of national policies in Europe. *International Journal of Injury Control and Safety Promotion*, 22(3), 232-242. <https://doi.org/10.1080/17457300.2014.909498>

Parpura, V., Heneka, M. T., Montana, V., Oliet, S. H. R., Schousboe, A., Haydon, P. G., Stout, R. F., Spray, D. C., Reichenbach, A., Pannicke, T., Pekny, M., Pekna, M., Zorec, R., & Verkhratsky, A. (2012). Glial cells in (patho)physiology. *Journal of Neurochemistry*, 121(1), 4-27. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07664.x>

Pelisch, N., Rosas Almanza, J., Stehlik, K. E., Aperi, B. V., & Kroner, A. (2020). CCL3 contributes to secondary damage after spinal cord injury. *Journal of Neuroinflammation*, 17(1), 362. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-02037-3>

Perea, G., & Araque, A. (2007). Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5841), 1083-1086. <https://doi.org/10.1126/science.1144640>

Perry, V. H., Cunningham, C., & Holmes, C. (2007). Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration. *Nature Reviews. Immunology*, 7(2), 161-167. <https://doi.org/10.1038/nri2015>

Philipson, O., Lord, A., Gumucio, A., O'Callaghan, P., Lannfelt, L., & Nilsson, L. N. G. (2010). Animal models of amyloid-beta-related pathologies in Alzheimer's disease. *The FEBS Journal*, 277(6), 1389-1409. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07564.x>

Phillips, N. R., Simpkins, J. W., & Roby, R. K. (2014). Mitochondrial DNA deletions in Alzheimer's brains: A review. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 10(3), 393-400. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2013.04.508>

Popiolek-Barczyk, K., Ciechanowska, A., Ciapała, K., Pawlik, K., Oggioni, M., Mercurio, D., De Simoni, M.-G., & Mika, J. (2020). The CCL2/CCL7/CCL12/CCR2 pathway is substantially and persistently upregulated in mice after traumatic brain injury, and CCL2 modulates

the complement system in microglia. *Molecular and Cellular Probes*, 54, 101671. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101671>

Pratico, D., Lee, V. M.-Y., Trojanowski, J. Q., Rokach, J., & Fitzgerald, G. A. (1998). Increased F2-isoprostanes in Alzheimer's disease: Evidence for enhanced lipid peroxidation in vivo. *The FASEB Journal*, 12(15), 1777-1783. <https://doi.org/10.1096/fasebj.12.15.1777>

Praticò, D., Uryu, K., Leight, S., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M.-Y. (2001). Increased Lipid Peroxidation Precedes Amyloid Plaque Formation in an Animal Model of Alzheimer Amyloidosis. *The Journal of Neuroscience*, 21(12), 4183-4187. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-12-04183.2001>

Qiu, L., Huang, D., Chen, C. Y., Wang, R., Shen, L., Shen, Y., Hunt, R., Estep, J., Haynes, B. F., Jacobs, W. R., Letvin, N., Du, G., & Chen, Z. W. (2008). Severe tuberculosis induces unbalanced up-regulation of gene networks and overexpression of IL-22, MIP-1alpha, CCL27, IP-10, CCR4, CCR5, CXCR3, PD1, PDL2, IL-3, IFN-beta, TIM1, and TLR2 but low antigen-specific cellular responses. *The Journal of Infectious Diseases*, 198(10), 1514-1519. <https://doi.org/10.1086/592448>

Quintanilla, R. A., Orellana, J. A., & von Bernhardi, R. (2012). Understanding risk factors for Alzheimer's disease: Interplay of neuroinflammation, connexin-based communication and oxidative stress. *Archives of Medical Research*, 43(8), 632-644. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2012.10.016>

Raghu, H., Lepus, C. M., Wang, Q., Wong, H. H., Lingampalli, N., Oliviero, F., Punzi, L., Giori, N. J., Goodman, S. B., Chu, C. R., Sokolove, J. B., & Robinson, W. H. (2017). CCL2/CCR2, but not CCL5/CCR5, mediates monocyte recruitment, inflammation and cartilage destruction in osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 76(5), 914-922. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2016-210426>

Rakic, P. (2002). Adult neurogenesis in mammals: An identity crisis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for*

*Neuroscience*, 22(3), 614-618.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-03-00614.2002>

Ramesh, G., MacLean, A. G., & Philipp, M. T. (2013). Cytokines and chemokines at the crossroads of neuroinflammation, neurodegeneration, and neuropathic pain. *Mediators of Inflammation*, 2013, 480739. <https://doi.org/10.1155/2013/480739>

Ramesh, S., Govindarajulu, M., Suppiramaniam, V., Moore, T., & Dhanasekaran, M. (2018). Autotaxin<sup>-</sup>Lysophosphatidic Acid Signaling in Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), 1827. <https://doi.org/10.3390/ijms19071827>

Ramón y Cajal, S. (1913). *Contribución al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano*.

Ransohoff, R. M. (2009). Chemokines and Chemokine Receptors: Standing at the Crossroads of Immunobiology and Neurobiology. *Immunity*, 31(5), 711-721.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.010>

Rao, V. L., Dogan, A., Todd, K. G., Bowen, K. K., Kim, B. T., Rothstein, J. D., & Dempsey, R. J. (2001). Antisense knockdown of the glial glutamate transporter GLT-1, but not the neuronal glutamate transporter EAAC1, exacerbates transient focal cerebral ischemia-induced neuronal damage in rat brain. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(6), 1876-1883. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-06-01876.2001>

Réaux-Le Goazigo, A., Van Steenwinckel, J., Rostène, W., & Mélik Parsadaniantz, S. (2013). Current status of chemokines in the adult CNS. *Progress in Neurobiology*, 104, 67-92.  
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.02.001>

Reddy, P. H., & Beal, M. F. (2008). Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: Implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine*, 14(2), 45-53. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.12.002>

Reiter, R. J. (1995). Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain. *FASEB Journal: Official Publication*

of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 9(7), 526-533.

Rekas, A., Jankova, L., Thorn, D. C., Cappai, R., & Carver, J. A. (2007). Monitoring the prevention of amyloid fibril formation by alpha-crystallin. Temperature dependence and the nature of the aggregating species. *The FEBS Journal*, 274(24), 6290-6304. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06144.x>

Rentoumi, V., Raoufian, L., Ahmed, S., de Jager, C. A., & Garrard, P. (2014). Features and machine learning classification of connected speech samples from patients with autopsy proven Alzheimer's disease with and without additional vascular pathology. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 42 Suppl 3, S3-17. <https://doi.org/10.3233/JAD-140555>

Resende, E. de P. F., Nolan, A. L., Petersen, C., Ehrenberg, A. J., Spina, S., Allen, I. E., Rosen, H. J., Kramer, J., Miller, B. L., Seeley, W. W., Gorno-Tempini, M. L., Miller, Z., & Grinberg, L. T. (2020). Language and spatial dysfunction in Alzheimer disease with white matter thorn-shaped astrocytes. *Neurology*, 94(13), e1353-e1364. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000008937>

Richard, M., Drouin, R., & Beaulieu, A. D. (1998). ABC50, a novel human ATP-binding cassette protein found in tumor necrosis factor-alpha-stimulated synoviocytes. *Genomics*, 53(2), 137-145. <https://doi.org/10.1006/geno.1998.5480>

Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T., & Horwitz, A. R. (2003). Cell migration: Integrating signals from front to back. *Science (New York, N.Y.)*, 302(5651), 1704-1709. <https://doi.org/10.1126/science.1092053>

Riva, A. (2019). *Efectividad de los ejercicios aeróbicos para personas adultas con alzheimer*. *Revisión bibliográfica*. [Bachelor thesis, Salut-UVic]. <http://repositori.umanresa.cat/handle/1/669>

Roch, J. M., Masliah, E., Roch-Levecq, A. C., Sundsmo, M. P., Otero, D. A., Veinbergs, I., & Saitoh, T. (1994). Increase of synaptic density and memory retention by a peptide representing the trophic domain of the amyloid beta/A4 protein precursor. *Proceedings of the National*

*Academy of Sciences of the United States of America*, 91(16), 7450-7454. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.16.7450>

Rock, R. B., Gekker, G., Hu, S., Sheng, W. S., Cheeran, M., Lokensgard, J. R., & Peterson, P. K. (2004). Role of Microglia in Central Nervous System Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 942-964. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.942-964.2004>

Rogers, J., Kirby, L. C., Hempelman, S. R., Berry, D. L., McGeer, P. L., Kaszniak, A. W., Zaluski, J., Cofield, M., Mansukhani, L., & Willson, P. (1993). Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease. *Neurology*, 43(8), 1609-1611. <https://doi.org/10.1212/wnl.43.8.1609>

Röhrle, N., Knott, M. M. L., & Anz, D. (2020). CCL22 Signaling in the Tumor Environment. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1231, 79-96. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-36667-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-36667-4_8)

Rolyan, H., Feike, A., Upadhaya, A., Waha, A., Van Dooren, T., Haass, C., Birkenmeier, G., Pietrzik, C., Van Leuven, F., & Thal, D. (2011). Amyloid- $\beta$  protein modulates the perivascular clearance of neuronal apolipoprotein E in mouse models of Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 118(5). <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0572-7>

Rönnemaa, E., Zethelius, B., Sundelöf, J., Sundström, J., Degerman-Gunnarsson, M., Berne, C., Lannfelt, L., & Kilander, L. (2008). Impaired insulin secretion increases the risk of Alzheimer disease. *Neurology*, 71(14), 1065-1071. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000310646.32212.3a>

Roos, P., von Essen, M. R., Nielsen, T. T., Johannsen, P., Stokholm, J., Bie, A. S., Waldemar, G., Simonsen, A. H., Heslegrave, A., Zetterberg, H., FReJA consortium, Sellebjerg, F., & Nielsen, J. E. (2018). Inflammatory markers of CHMP2B-mediated frontotemporal dementia. *Journal of Neuroimmunology*, 324, 136-142. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.08.009>

Rossi, D. J., Oshima, T., & Attwell, D. (2000). Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature*, 403(6767), 316-321. <https://doi.org/10.1038/35002090>

- Rossner, S., Lange-Dohna, C., Zeitschel, U., & Perez-Polo, J. R. (2005). Alzheimer's disease beta-secretase BACE1 is not a neuron-specific enzyme. *Journal of Neurochemistry*, *92*(2), 226-234. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02857.x>
- Rostène, W., Dansereau, M.-A., Godefroy, D., Van Steenwinkel, J., Goazigo, A. R.-L., Mélik-Parsadaniantz, S., Apartis, E., Hunot, S., Beaudet, N., & Sarret, P. (2011). Neurochemokines: A menage a trois providing new insights on the functions of chemokines in the central nervous system. *Journal of Neurochemistry*, *118*(5), 680-694. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07371.x>
- Rostène, W., Kitabgi, P., & Parsadaniantz, S. M. (2007). Chemokines: A new class of neuromodulator? *Nature Reviews. Neuroscience*, *8*(11), 895-903. <https://doi.org/10.1038/nrn2255>
- Rot, A., & von Andrian, U. H. (2004). Chemokines in innate and adaptive host defense: Basic chemokines grammar for immune cells. *Annual Review of Immunology*, *22*, 891-928. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104543>
- Roth, M., Spillane, J. D., & Shapiro, M. B. (1952). Discussion on the differential diagnosis of early dementia. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, *45*(6), 369-376.
- Rothstein, J. D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C. A., Bristol, L. A., Jin, L., Kuncl, R. W., Kanai, Y., Hediger, M. A., Wang, Y., Schielke, J. P., & Welty, D. F. (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*, *16*(3), 675-686. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80086-0](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80086-0)
- Rudobeck, E., Bellone, J. A., Szücs, A., Bonnicksen, K., Mehrotra-Carter, S., Badaut, J., Nelson, G. A., Hartman, R. E., & Vlkolinský, R. (2017). Low-dose proton radiation effects in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease—Implications for space travel. *PLoS One*, *12*(11), e0186168. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186168>
- Sala, G., Galimberti, G., Canevari, C., Raggi, M. E., Isella, V., Facheris, M., Appollonio, I., & Ferrarese, C. (2003). Peripheral cytokine release in Alzheimer patients: Correlation with disease



severity. *Neurobiology of Aging*, 24(7), 909-914.  
[https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(03\)00010-1](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(03)00010-1)

Sanai, N., Tramontin, A. D., Quiñones-Hinojosa, A., Barbaro, N. M., Gupta, N., Kunwar, S., Lawton, M. T., McDermott, M. W., Parsa, A. T., Manuel-García Verdugo, J., Berger, M. S., & Alvarez-Buylla, A. (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature*, 427(6976), 740-744.  
<https://doi.org/10.1038/nature02301>

Sarafi, M. N., Garcia-Zepeda, E. A., MacLean, J. A., Charo, I. F., & Luster, A. D. (1997). Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: A novel CC chemokine that is a structural and functional homologue of human MCP-1. *The Journal of Experimental Medicine*, 185(1), 99-109. <https://doi.org/10.1084/jem.185.1.99>

Sayre, L. M., Zelasko, D. A., Harris, P. L., Perry, G., Salomon, R. G., & Smith, M. A. (1997). 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 68(5), 2092-2097.  
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.68052092.x>

Scheu, S., Ali, S., Ruland, C., Arolt, V., & Alferink, J. (2017). The C-C Chemokines CCL17 and CCL22 and Their Receptor CCR4 in CNS Autoimmunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11), E2306. <https://doi.org/10.3390/ijms18112306>

Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T. D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., ... Younkin, S. (1996). Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 2(8), 864-870. <https://doi.org/10.1038/nm0896-864>

Selkoe, D. J. (1991). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*, 6(4), 487-498. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(91\)90052-2](https://doi.org/10.1016/0896-6273(91)90052-2)

Selkoe, D. J. (1997). Alzheimer's disease: Genotypes, phenotypes, and treatments. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5300), 630-631. <https://doi.org/10.1126/science.275.5300.630>

Serrano, M. (2015, junio 1). *Mecanismos bioquímicos de la Enfermedad de Alzheimer: Aproximaciones terapéuticas*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Mecanismos-bioqu%C3%ADmicos-de-la-Enfermedad-de-Serrano/f5212597880de438bfdc0e6ff45dedc41361eb85>

Sgourakis, N., Yan, Y., McCallum, S., Wang, C., & Garcia, A. (2007). The Alzheimer's peptides Abeta40 and 42 adopt distinct conformations in water: A combined MD / NMR study. *Journal of Molecular Biology*, 368(5). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.02.093>

Shafit-Zagardo, B., & Kalcheva, N. (1998). Making sense of the multiple MAP-2 transcripts and their role in the neuron. *Molecular Neurobiology*, 16(2), 149-162. <https://doi.org/10.1007/BF02740642>

Shang, Y., Widman, L., & Hagström, H. (2022). Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Risk of Dementia: A Population-Based Cohort Study. *Neurology*, 99(6), e574-e582. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000200853>

Shao, Z., Shen, Q., Yao, B., Mao, C., Chen, L.-N., Zhang, H., Shen, D.-D., Zhang, C., Li, W., Du, X., Li, F., Ma, H., Chen, Z.-H., Xu, H. E., Ying, S., Zhang, Y., & Shen, H. (2022). Identification and mechanism of G protein-biased ligands for chemokine receptor CCR1. *Nature Chemical Biology*, 18(3), 264-271. <https://doi.org/10.1038/s41589-021-00918-z>

Sherrington, R., Rogaev, E. I., Liang, Y., Rogaeva, E. A., Levesque, G., Ikeda, M., Chi, H., Lin, C., Li, G., Holman, K., Tsuda, T., Mar, L., Foncin, J. F., Bruni, A. C., Montesi, M. P., Sorbi, S., Rainero, I., Pinessi, L., Nee, L., ... St George-Hyslop, P. H. (1995). Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, 375(6534), 754-760. <https://doi.org/10.1038/375754a0>

Shihabuddin, L. S., Horner, P. J., Ray, J., & Gage, F. H. (2000). Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the

adult dentate gyrus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(23), 8727-8735. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-23-08727.2000>

Shihabuddin, L. S., Ray, J., & Gage, F. H. (1997). FGF-2 is sufficient to isolate progenitors found in the adult mammalian spinal cord. *Experimental Neurology*, 148(2), 577-586. <https://doi.org/10.1006/exnr.1997.6697>

Shuvaev, V. V., Laffont, I., Serot, J. M., Fujii, J., Taniguchi, N., & Siest, G. (2001). Increased protein glycation in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 22(3), 397-402. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(00\)00253-0](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(00)00253-0)

Song, H., Stevens, C. F., & Gage, F. H. (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature*, 417(6884), 39-44. <https://doi.org/10.1038/417039a>

Song, M., Jin, J., Lim, J.-E., Kou, J., Pattanayak, A., Rehman, J. A., Kim, H.-D., Tahara, K., Lalonde, R., & Fukuchi, K. (2011). TLR4 mutation reduces microglial activation, increases A $\beta$  deposits and exacerbates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 8, 92. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-92>

Sorce, S., Myburgh, R., & Krause, K.-H. (2011). The chemokine receptor CCR5 in the central nervous system. *Progress in Neurobiology*, 93(2), 297-311. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.12.003>

Soscia, S., Kirby, J., Washicosky, K., Tucker, S., Ingelsson, M., Hyman, B., Burton, M., Goldstein, L., Duong, S., Tanzi, R., & Moir, R. (2010). The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PloS One*, 5(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009505>

Soto-Rodriguez, G., Gonzalez-Barrios, J.-A., Martinez-Fong, D., Blanco-Alvarez, V.-M., Eguibar, J. R., Ugarte, A., Martinez-Perez, F., Brambila, E., Millán-Perez Peña, L., Pazos-Salazar, N.-G., Torres-Soto, M., Garcia-Robles, G., Tomas-Sanchez, C., & Leon-Chavez, B. A. (2015). Analysis of Chemokines and Receptors Expression Profile

in the Myelin Mutant Taiep Rat. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015, 397310. <https://doi.org/10.1155/2015/397310>

Squire, L. R. (2006). Lost forever or temporarily misplaced? The long debate about the nature of memory impairment. *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 13(5), 522-529. <https://doi.org/10.1101/lm.310306>

Squire, L. R. (2009). Memory and Brain Systems: 1969–2009. *The Journal of Neuroscience*, 29(41), 12711-12716. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3575-09.2009>

Squire, L. R., & Zola-Morgan, J. T. (1991). The Cognitive Neuroscience of Human Memory Since H.M. *Annual review of neuroscience*, 34, 259-288. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113720>

Strohmeier, R., & Rogers, J. (2001). Molecular and cellular mediators of Alzheimer's disease inflammation. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 3(1), 131-157. <https://doi.org/10.3233/jad-2001-3118>

Stuart, M. J., Singhal, G., & Baune, B. T. (2015). Systematic Review of the Neurobiological Relevance of Chemokines to Psychiatric Disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 357. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00357>

Su, J. H., Anderson, A. J., Cummings, B. J., & Cotman, C. W. (1994). Immunohistochemical evidence for apoptosis in Alzheimer's disease. *Neuroreport*, 5(18), 2529-2533. <https://doi.org/10.1097/00001756-199412000-00031>

Suhonen, J. O., Peterson, D. A., Ray, J., & Gage, F. H. (1996). Differentiation of adult hippocampus-derived progenitors into olfactory neurons in vivo. *Nature*, 383(6601), Art. 6601. <https://doi.org/10.1038/383624a0>

Sutherland, G. T., Chami, B., Youssef, P., & Witting, P. K. (2013). Oxidative stress in Alzheimer's disease: Primary villain or physiological by-product? *Redox Report*, 18(4), 134-141. <https://doi.org/10.1179/1351000213Y.0000000052>

Suzuki, Y., Yamaguchi, M., Mori, M., Sugimoto, N., Suzukawa, M., Iikura, M., Nagase, H., & Ohta, K. (2021). Eotaxin (CCL11) enhances

mediator release from human basophils. *Allergy*, 76(11), 3549-3552. <https://doi.org/10.1111/all.14975>

Tabaton, M., Zhu, X., Perry, G., Smith, M. A., & Giliberto, L. (2010). Signaling Effect of Amyloid- $\beta$ 42 on the Processing of A $\beta$ PP. *Experimental Neurology*, 221(1), 18. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.09.002>

Takata, K., Amamiya, T., Mizoguchi, H., Kawanishi, S., Kuroda, E., Kitamura, R., Ito, A., Saito, Y., Tawa, M., Nagasawa, T., Okamoto, H., Sugino, Y., Takegami, S., Kitade, T., Toda, Y., Kem, W. R., Kitamura, Y., Shimohama, S., & Ashihara, E. (2018). Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor-specific agonist DMXBA (GTS-21) attenuates A $\beta$  accumulation through suppression of neuronal  $\gamma$ -secretase activity and promotion of microglial amyloid- $\beta$  phagocytosis and ameliorates cognitive impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 62, 197-209. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.10.021>

Tan, J. H. Y., Ludeman, J. P., Wedderburn, J., Canals, M., Hall, P., Butler, S. J., Taleski, D., Christopoulos, A., Hickey, M. J., Payne, R. J., & Stone, M. J. (2013). Tyrosine sulfation of chemokine receptor CCR2 enhances interactions with both monomeric and dimeric forms of the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *The Journal of Biological Chemistry*, 288(14), 10024-10034. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.447359>

Temple, S. (2001). The development of neural stem cells. *Nature*, 414(6859), 112-117. <https://doi.org/10.1038/35102174>

Temple, S., & Alvarez-Buylla, A. (1999). Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Current Opinion in Neurobiology*, 9(1), 135-141. [https://doi.org/10.1016/s0959-4388\(99\)80017-8](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(99)80017-8)

Tolkovsky, A. M., Xue, L., Fletcher, G. C., & Borutaite, V. (2002). Mitochondrial disappearance from cells: A clue to the role of autophagy in programmed cell death and disease? *Biochimie*, 84(2-3), 233-240. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(02\)01371-8](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(02)01371-8)

- Tomlinson, B. E., Blessed, G., & Roth, M. (1970). Observations on the brains of demented old people. *Journal of the Neurological Sciences*, 11(3), 205-242. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(70\)90063-8](https://doi.org/10.1016/0022-510x(70)90063-8)
- Townsend, M. (2011). When will Alzheimer's disease be cured? A pharmaceutical perspective. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 24 Suppl 2, 43-52. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-110020>
- Tran, P. B., Banisadr, G., Ren, D., Chenn, A., & Miller, R. J. (2007). Chemokine Receptor Expression by Neural Progenitor Cells in Neurogenic Regions of Mouse Brain. *The Journal of comparative neurology*, 500(6), 1007-1033. <https://doi.org/10.1002/cne.21229>
- Trebst, C., Staugaitis, S. M., Kivisäkk, P., Mahad, D., Cathcart, M. K., Tucky, B., Wei, T., Rani, M. R. S., Horuk, R., Aldape, K. D., Pardo, C. A., Lucchinetti, C. F., Lassmann, H., & Ransohoff, R. M. (2003). CC chemokine receptor 8 in the central nervous system is associated with phagocytic macrophages. *The American Journal of Pathology*, 162(2), 427-438. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63837-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63837-0)
- Trifilo, M. J., Bergmann, C. C., Kuziel, W. A., & Lane, T. E. (2003). CC chemokine ligand 3 (CCL3) regulates CD8(+)-T-cell effector function and migration following viral infection. *Journal of Virology*, 77(7), 4004-4014. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.7.4004-4014.2003>
- Trushina, E., & McMurray, C. T. (2007). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Neuroscience*, 145(4), 1233-1248. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.10.056>
- Tsacopoulos, M., & Magistretti, P. J. (1996). Metabolic coupling between glia and neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(3), 877-885. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-03-00877.1996>
- Tuppo, E. E., & Arias, H. R. (2005). The role of inflammation in Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(2), 289-305. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.07.009>
- Vallés, S. L., Borrás, C., Gambini, J., Furriol, J., Ortega, A., Sastre, J., Pallardó, F. V., & Viña, J. (2008). Oestradiol or genistein rescues

neurons from amyloid beta-induced cell death by inhibiting activation of p38. *Aging Cell*, 7(1), 112-118. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00356.x>

Valles, S. L., Dolz-Gaiton, P., Gambini, J., Borrás, C., Lloret, A., Pallardo, F. V., & Viña, J. (2010). Estradiol or genistein prevent Alzheimer's disease-associated inflammation correlating with an increase PPAR gamma expression in cultured astrocytes. *Brain Research*, 1312, 138-144. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.11.044>

van der Zee, E. A., de Jong, G. I., Strosberg, A. D., & Luiten, P. G. M. (1993). Muscarinic acetylcholine receptor-expression in astrocytes in the cortex of young and aged rats. *Glia*, 8(1), 42-50. <https://doi.org/10.1002/glia.440080106>

van Dyck, C. H., Swanson, C. J., Aisen, P., Bateman, R. J., Chen, C., Gee, M., Kanekiyo, M., Li, D., Reyderman, L., Cohen, S., Froelich, L., Katayama, S., Sabbagh, M., Vellas, B., Watson, D., Dhadda, S., Irizarry, M., Kramer, L. D., & Iwatsubo, T. (2023). Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*, 388(1), 9-21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2212948>

van Veen, S., & Chang, P. C. (1997). Prostaglandins and nitric oxide mediate insulin-induced vasodilation in the human forearm. *Cardiovascular Research*, 34(1), 223-229. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(97\)00031-x](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(97)00031-x)

Vassar, R. (2001). The beta-secretase, BACE: A prime drug target for Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, 17(2), 157-170. <https://doi.org/10.1385/JMN:17:2:157>

Vassar, R. (2004). BACE1: The beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, 23(1-2), 105-114. <https://doi.org/10.1385/JMN:23:1-2:105>

Venuti, A., Pastori, C., & Lopalco, L. (2017). The Role of Natural Antibodies to CC Chemokine Receptor 5 in HIV Infection. *Frontiers in Immunology*, 8, 1358. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01358>

Verite, J., Janet, T., Julian, A., Chassaing, D., Page, G., & Paccalin, M. (2017). Peripheral Blood Mononuclear Cells of Alzheimer's

Disease Patients Control CCL4 and CXCL10 Levels in a Human Blood Brain Barrier Model. *Current Alzheimer Research*, 14(11), 1215-1228. <https://doi.org/10.2174/1567205014666170417110337>

Villeda, S. A., Luo, J., Mosher, K. I., Zou, B., Britschgi, M., Bieri, G., Stan, T. M., Fainberg, N., Ding, Z., Eggel, A., Lucin, K. M., Czirr, E., Park, J.-S., Couillard-Després, S., Aigner, L., Li, G., Peskind, E. R., Kaye, J. A., Quinn, J. F., ... Wyss-Coray, T. (2011). The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature*, 477(7362), 90-94. <https://doi.org/10.1038/nature10357>

Volterra, A., & Steinhäuser, C. (2004). Glial modulation of synaptic transmission in the hippocampus. *Glia*, 47(3), 249-257. <https://doi.org/10.1002/glia.20080>

von Hundelshausen, P., Koenen, R. R., Sack, M., Mause, S. F., Adriaens, W., Proudfoot, A. E. I., Hackeng, T. M., & Weber, C. (2005). Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. *Blood*, 105(3), 924-930. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2475>

Walker, D. G., Lue, L. F., & Beach, T. G. (2001). Gene expression profiling of amyloid beta peptide-stimulated human post-mortem brain microglia. *Neurobiology of Aging*, 22(6), 957-966. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(01\)00306-2](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(01)00306-2)

Walsh, D. M., & Selkoe, D. J. (2007). A beta oligomers—A decade of discovery. *Journal of Neurochemistry*, 101(5), 1172-1184. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04426.x>

Wan, H., Yuan, Y., Qian, A., Sun, Y., & Qiao, M. (2008). Pioglitazone, a PPARgamma ligand, suppresses NFkappaB activation through inhibition of IkappaB kinase activation in cerulein-treated AR42J cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 62(7), 466-472. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2007.10.012>

Wang, C., & Sun, H. (2019). [Progress in gene knockout mice]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao = Chinese Journal of Biotechnology*, 35(5), 784-794. <https://doi.org/10.13345/j.cjb.180417>



Wang, J., Li, J., Wang, Q., Kong, Y., Zhou, F., Li, Q., Li, W., Sun, Y., Wang, Y., Guan, Y., Wu, M., & Wen, T. (2018). Dcf1 Deficiency Attenuates the Role of Activated Microglia During Neuroinflammation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 256. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00256>

Wei, R., & Jonakait, G. M. (1999). Neurotrophins and the anti-inflammatory agents interleukin-4 (IL-4), IL-10, IL-11 and transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) down-regulate T cell costimulatory molecules B7 and CD40 on cultured rat microglia. *Journal of Neuroimmunology*, 95(1-2), 8-18. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(98\)00248-3](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(98)00248-3)

Wilcox, S. M., Arora, H., Munro, L., Xin, J., Fenninger, F., Johnson, L. A., Pfeifer, C. G., Choi, K. B., Hou, J., Hoodless, P. A., & Jefferies, W. A. (2017). The role of the innate immune response regulatory gene ABCF1 in mammalian embryogenesis and development. *PLOS ONE*, 12(5), e0175918. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175918>

Willette, A. A., Bendlin, B. B., Starks, E. J., Birdsill, A. C., Johnson, S. C., Christian, B. T., Okonkwo, O. C., La Rue, A., Hermann, B. P., Kosciak, R. L., Jonaitis, E. M., Sager, M. A., & Asthana, S. (2015). Association of Insulin Resistance With Cerebral Glucose Uptake in Late Middle-Aged Adults at Risk for Alzheimer Disease. *JAMA Neurology*, 72(9), 1013-1020. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.0613>

Williamson, J., Goldman, J., & Marder, K. S. (2009). Genetic Aspects of Alzheimer Disease. *The neurologist*, 15(2), 80-86. <https://doi.org/10.1097/NRL.0b013e318187e76b>

Withers, D. J., Gutierrez, J. S., Towery, H., Burks, D. J., Ren, J. M., Previs, S., Zhang, Y., Bernal, D., Pons, S., Shulman, G. I., Bonner-Weir, S., & White, M. F. (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*, 391(6670), 900-904. <https://doi.org/10.1038/36116>

Wu, D., Zhou, J., Bi, H., Li, L., Gao, W., Huang, M., Adcock, I. M., Barnes, P. J., & Yao, X. (2014). CCL11 as a potential diagnostic

marker for asthma? *Journal of Asthma*, 51(8), 847-854. <https://doi.org/10.3109/02770903.2014.917659>

Wu, X., Sun, M., Yang, Z., Lu, C., Wang, Q., Wang, H., Deng, C., Liu, Y., & Yang, Y. (2021). The Roles of CCR9/CCL25 in Inflammation and Inflammation-Associated Diseases. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.686548>

Wyss-Coray, T. (2006). Inflammation in Alzheimer disease: Driving force, bystander or beneficial response? *Nature Medicine*, 12(9), 1005-1015. <https://doi.org/10.1038/nm1484>

Wyss-Coray, T., & Mucke, L. (2002). Inflammation in neurodegenerative disease—A double-edged sword. *Neuron*, 35(3), 419-432. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00794-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00794-8)

Wyss-Coray, T., Yan, F., Lin, A. H.-T., Lambris, J. D., Alexander, J. J., Quigg, R. J., & Masliah, E. (2002). Prominent neurodegeneration and increased plaque formation in complement-inhibited Alzheimer's mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), 10837-10842. <https://doi.org/10.1073/pnas.162350199>

Xing, W., Yan, W., Fu, F., Jin, Y., Ji, L., Liu, W., Wang, L., Lv, A., Duan, Y., Zhang, J., Zhang, H., & Gao, F. (2009). Insulin inhibits myocardial ischemia-induced apoptosis and alleviates chronic adverse changes in post-ischemic cardiac structure and function. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 14(9), 1050-1060. <https://doi.org/10.1007/s10495-009-0378-y>

Xu, B., Deng, C., Wu, X., Ji, T., Zhao, L., Han, Y., Yang, W., Qi, Y., Wang, Z., Yang, Z., & Yang, Y. (2020). CCR9 and CCL25: A review of their roles in tumor promotion. *Journal of Cellular Physiology*, 235(12), 9121-9132. <https://doi.org/10.1002/jcp.29782>

Xu, C., Loh, H. H., & Law, P.-Y. (2016). Effects of addictive drugs on adult neural stem/progenitor cells. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 73(2), 327-348. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2067-z>

- Xu, M., Wang, Y., Xia, R., Wei, Y., & Wei, X. (2021). Role of the CCL2-CCR2 signalling axis in cancer: Mechanisms and therapeutic targeting. *Cell Proliferation*, 54(10), e13115. <https://doi.org/10.1111/cpr.13115>
- Xue, J., Zhang, Y., Zhang, J., Zhu, Z., Lv, Q., & Su, J. (2021). Astrocyte-derived CCL7 promotes microglia-mediated inflammation following traumatic brain injury. *International Immunopharmacology*, 99, 107975. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107975>
- Yadav, A., Saini, V., & Arora, S. (2010). MCP-1: Chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 411(21-22), 1570-1579. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.07.006>
- Yamagami, S., Tamura, M., Hayashi, M., Endo, N., Tanabe, H., Katsuura, Y., & Komoriya, K. (1999). Differential production of MCP-1 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant in the ischemic brain after transient focal ischemia in rats. *Journal of Leukocyte Biology*, 65(6), 744-749. <https://doi.org/10.1002/jlb.65.6.744>
- Yamagami, S., Tokuda, Y., Ishii, K., Tanaka, H., & Endo, N. (1994). CDNA cloning and functional expression of a human monocyte chemoattractant protein 1 receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 202(2), 1156-1162. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2049>
- Yamaguchi, H., Sugihara, S., Ogawa, A., Saido, T. C., & Ihara, Y. (1998). Diffuse plaques associated with astroglial amyloid  $\beta$  protein, possibly showing a disappearing stage of senile plaques. *Acta Neuropathologica*, 95(3), 217-222. <https://doi.org/10.1007/s004010050790>
- Yamamoto, M., Horiba, M., Buescher, J. L., Huang, D., Gendelman, H. E., Ransohoff, R. M., & Ikezu, T. (2005). Overexpression of monocyte chemotactic protein-1/CCL2 in beta-amyloid precursor protein transgenic mice show accelerated diffuse beta-amyloid deposition. *The American Journal of Pathology*, 166(5), 1475-1485. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)62364-4](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)62364-4)

- Yamamoto, M., Kamatsuka, Y., Ohishi, A., Nishida, K., & Nagasawa, K. (2013). P2X7 receptors regulate engulfing activity of non-stimulated resting astrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 439(1), 90-95. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.08.022>
- Yamamoto, S., Wajima, T., Hara, Y., Nishida, M., & Mori, Y. (2007). Transient receptor potential channels in Alzheimer's disease. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1772(8), 958-967. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.03.006>
- Yan, M. H., Wang, X., & Zhu, X. (2013). Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radical Biology & Medicine*, 62, 90-101. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.014>
- Yang, M., & Teplow, D. (2008). Amyloid  $\beta$ -protein monomer folding: Free energy surfaces reveal alloform specific differences. *Journal of Molecular Biology*, 384(2), 450. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.09.039>
- Yang, P., Arnold, S. A., Habas, A., Hetman, M., & Hagg, T. (2008). Ciliary neurotrophic factor mediates dopamine D2 receptor-induced CNS neurogenesis in adult mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(9), 2231-2241. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3574-07.2008>
- Yao, Z.-X., & Papadopoulos, V. (2002). Function of beta-amyloid in cholesterol transport: A lead to neurotoxicity. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(12), 1677-1679. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0285fje>
- Yu, L., Edalji, R., Harlan, J., Holzman, T., Lopez, A., Labkovsky, B., Hillen, H., Barghorn, S., Ebert, U., Richardson, P., Miesbauer, L., Solomon, L., Bartley, D., Walter, K., Johnson, R., Hajduk, P., & Olejniczak, E. (2009). Structural characterization of a soluble amyloid beta-peptide oligomer. *Biochemistry*, 48(9). <https://doi.org/10.1021/bi802046n>
- Yu, W.-F., Nordberg, A., Ravid, R., & Guan, Z.-Z. (2003). Correlation of oxidative stress and the loss of the nicotinic receptor alpha 4

subunit in the temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 338(1), 13-16. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(02\)01361-7](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(02)01361-7)

Yuan, M., Konstantopoulos, N., Lee, J., Hansen, L., Li, Z. W., Karin, M., & Shoelson, S. E. (2001). Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5535), 1673-1677. <https://doi.org/10.1126/science.1061620>

Zarranz, J. J. (2013). [Precision in historical quotations]. *Neurologia (Barcelona, Spain)*, 28(8), 524. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2012.07.006>

Zhang, F., Zhong, R., Li, S., Fu, Z., Cheng, C., Cai, H., & Le, W. (2017). Acute Hypoxia Induced an Imbalanced M1/M2 Activation of Microglia through NF- $\kappa$ B Signaling in Alzheimer's Disease Mice and Wild-Type Littermates. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9, 282. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00282>

Zhang, S., Iwata, K., Lachenmann, M., Peng, J., Li, S., Stimson, E., Lu, Y., Felix, A., Maggio, J., & Lee, J. (2000). The Alzheimer's peptide a beta adopts a collapsed coil structure in water. *Journal of Structural Biology*, 130(2-3). <https://doi.org/10.1006/jsbi.2000.4288>

Zhang, Y., Han, J., Wu, M., Xu, L., Wang, Y., Yuan, W., Hua, F., Fan, H., Dong, F., Qu, X., & Yao, R. (2019). Toll-Like Receptor 4 Promotes Th17 Lymphocyte Infiltration Via CCL25/CCR9 in Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 14(3), 493-502. <https://doi.org/10.1007/s11481-019-09854-1>

Zhang, Z.-Y., Daniels, R., & Schluesener, H. J. (2013). Oridonin ameliorates neuropathological changes and behavioural deficits in a mouse model of cerebral amyloidosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(12), 1566-1576. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12124>

Zhou, X., Han, D., Xu, R., Li, S., Wu, H., Qu, C., Wang, F., Wang, X., & Zhao, Y. (2014). A Model of Metabolic Syndrome and Related

Diseases with Intestinal Endotoxemia in Rats Fed a High Fat and High Sucrose Diet. *PLOS ONE*, 9(12), e115148. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115148>

Zhou, Y., Li, H. L., Zhao, R., Yang, L. T., Dong, Y., Yue, X., Ma, Y. Y., Wang, Z., Chen, J., Cui, C. L., & Yu, A. C.-H. (2010). Astrocytes express N-methyl-D-aspartate receptor subunits in development, ischemia and post-ischemia. *Neurochemical Research*, 35(12), 2124-2134. <https://doi.org/10.1007/s11064-010-0325-x>

Zhu, C., Xu, B., Sun, X., Zhu, Q., & Sui, Y. (2017). Targeting CCR3 to Reduce Amyloid- $\beta$  Production, Tau Hyperphosphorylation, and Synaptic Loss in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, 54(10), 7964-7978. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0269-5>

Zhu, M., Allard, J. S., Zhang, Y., Perez, E., Spangler, E. L., Becker, K. G., & Rapp, P. R. (2014). Age-related Brain Expression and Regulation of the Chemokine CCL4/MIP-1 $\beta$  in APP/PS1 Double Transgenic Mice. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 73(4), 362-374. <https://doi.org/10.1097/NEN.0000000000000060>

Zhu, X., Smith, M. A., Perry, G., & Aliev, G. (2004). Mitochondrial failures in Alzheimer's disease. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias*, 19(6), 345-352. <https://doi.org/10.1177/153331750401900611>

Zhu, X., Su, B., Wang, X., Smith, M. A., & Perry, G. (2007). Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 64(17), 2202-2210. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7218-4>

Zonta, M., Angulo, M. C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K.-A., Pozzan, T., & Carmignoto, G. (2003). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nature Neuroscience*, 6(1), 43-50. <https://doi.org/10.1038/nn980>

Zou, K., Gong, J.-S., Yanagisawa, K., & Michikawa, M. (2002). A novel function of monomeric amyloid beta-protein serving as an antioxidant molecule against metal-induced oxidative damage. *The*

*Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(12), 4833-4841.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-12-04833.2002>

Zychowska, M., Rojewska, E., Piotrowska, A., Kreiner, G., Nalepa, I., & Mika, J. (2017). Spinal CCL1/CCR8 signaling interplay as a potential therapeutic target—Evidence from a mouse diabetic neuropathy model. *International Immunopharmacology*, 52, 261-271.  
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.09.021>