

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

Study of the neuroprotective and antiinflammatory effects of noradrenaline and the therapeutic potential of reboxetine in Alzheimer's disease

Estudio de los efectos neuroprotectores y antiinflamatorios de la noradrenalina y del potencial terapéutico de la reboxetina en la enfermedad de Alzheimer

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Irene López Gutiérrez

DIRECTOR

José Luis Muñoz Madrigal

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

STUDY OF THE NEUROPROTECTIVE AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF
NORADRENALINE AND THE THERAPEUTIC POTENTIAL OF REBOXETINE IN
ALZHEIMER'S DISEASE

ESTUDIO DE LOS EFECTOS NEUROPROTECTORES Y ANTIINFLAMATORIOS DE LA
NORADRENALINA Y DEL POTENCIAL TERAPÉUTICO DE LA REBOXETINA EN LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

IRENE LÓPEZ GUTIÉRREZ

DIRECTOR

JOSÉ LUIS MUÑOZ MADRIGAL

A todos los pacientes

“Para una criatura racional la memoria es la facultad más importante después de la sensibilidad; su importancia es tal, que sin ella pierden el sentido todas las demás facultades”

- Locke

ÍNDICE

1	ABREVIATURAS	3
2	RESUMEN / ABSTRACT	9
2.1	RESUMEN	9
2.2	ABSTRACT	10
3	INTRODUCCIÓN	15
3.1	ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	15
3.1.1	Definición	15
3.1.2	Historia	15
3.1.3	Epidemiología	16
3.1.4	Sintomatología	16
3.1.5	Factores de riesgo	18
3.1.6	Clasificación	19
3.1.7	Fisiopatología	20
3.1.8	Diagnóstico y tratamiento	37
3.2	NORADRENALINA.....	42
3.2.1	Historia	42
3.2.2	Sistema Noradrenérgico	42
3.2.3	Funciones de la noradrenalina.....	50
3.3	QUIMIOQUINAS	55
3.3.1	Clasificación y nomenclatura	55
3.3.2	Funciones de las quimioquinas.....	56
3.3.3	Quimioquina CCL2.....	57
3.4	NORADRENALINA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	61
3.4.1	Alteración del sistema noradrenérgico en la enfermedad de Alzheimer	61
3.4.2	Sintomatología de la EA asociada a la disfunción del sistema noradrenérgico.	72
3.4.3	Disfunción del sistema noradrenérgico en otras enfermedades neurológicas	74
3.4.4	Vulnerabilidad del Locus coeruleus a la neurodegeneración	75
3.4.5	Degeneración del sistema noradrenérgico en modelos preclínicos de la enfermedad de Alzheimer	77
3.4.6	Farmacología del sistema noradrenérgico: potenciales estrategias terapéuticas.....	80
3.5	QUIMIOQUINA CCL2 EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	86
4	ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	89

4.1	ANTECEDENTES INMEDIATOS	89
4.2	HIPÓTESIS	89
4.3	OBJETIVOS	90
4.3.1	Objetivos generales.....	90
4.3.2	Objetivos específicos	90
5	MATERIAL Y MÉTODOS	95
5.1	MODELOS ANIMALES	95
5.1.1	Modelos murinos	95
5.1.2	Ratas Wistar	98
5.2	GENOTIPADO	98
5.3	TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO	100
5.4	ESTUDIO COMPORTAMENTAL: LABERINTO EN Y	101
5.5	CULTIVOS CELULARES	102
5.5.1	Cultivos primarios de astrocitos	102
5.5.2	Cultivos de microglía derivada de iPSCs humanas	105
5.6	RECOGIDA Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS	111
5.6.1	Modelos murinos	111
5.6.2	Cultivos Celulares	112
5.7	TÉCNICAS BIOQUÍMICAS	113
5.7.1	Western Blot (WB).....	113
5.7.2	ELISA	114
5.7.3	Ensayo de Griess para la determinación de nitritos	115
5.7.4	RT-qPCR.....	115
5.7.5	Inmunohistoquímica (IHC).....	117
5.7.6	Citometría de flujo (FC).....	119
5.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	120
6	RESULTADOS	123
6.1	EFEECTO DEL TRATAMIENTO CON REBOXETINA Y DE LA SUPRESIÓN DE CCL2 EN EL MODELO MURINO 5XFAD DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	123
6.2	EFEECTO DE LA QUIMIOQUINA CCL2 EN LA RESOLUCIÓN DE LA INFLAMACIÓN 141	
6.3	EFEECTO DEL TRATAMIENTO CON REBOXETINA EN EL MODELO MURINO P301S DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	152

6.4	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON NORADRENALINA EN CÉLULAS DE MICROGLÍA DERIVADAS DE IPSCS HUMANAS.....	186
7	DISCUSIÓN.....	199
7.1	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON REBOXETINA Y DE LA SUPRESIÓN DE CCL2 EN EL MODELO MURINO 5XFAD DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	199
7.2	EFFECTO DE LA QUIMIOQUINA CCL2 EN LA RESOLUCIÓN DE LA INFLAMACIÓN	205
7.3	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON REBOXETINA EN EL MODELO MURINO P301S DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	208
7.4	EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON NORADRENALINA EN CÉLULAS DE MICROGLÍA DERIVADAS DE IPSCS HUMANAS.....	215
7.5	DISCUSIÓN GENERAL, LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS	217
7.5.1	Discusión general.....	217
7.5.2	Limitaciones	218
7.5.3	Perspectivas futuras	220
8	CONCLUSIONS.....	225
9	BIBLIOGRAFÍA.....	229
10	ANEXOS.....	269
10.1	CERTIFICADO DE MANEJO DE ANIMALES	269
10.2	PUBLICACIONES CIENTÍFICAS	271

ABREVIATURAS

1 ABREVIATURAS

15-LOX: araquidonato 15-lipoxigenasa	CEA: <i>Cover enviromental área</i> o área total ocupada
3R: isoformas tau de 3 repeticiones	ChemR32/CMKLR1: receptor tipo quimioquina 1
4R: isoformas tau de 4 repeticiones	CNS: <i>central nervous system</i>
5-LOX: araquidonato 5-lipoxigenasa	COMT: catecol-O-metiltransferasa
ABCA7: el miembro 7 de la subfamilia de cassettes de unión a ATP	COX2: ciclooxigenasa 2
AC: adenilato ciclasa	CPF: corteza prefrontal
Ach: acetilcolina	CREB: proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc
AD: Alzheimer's disease	CX3CR1: receptor de fractalquina
ADAD: enfermedad de Alzheimer autosómica dominante	DA: dopamina
AEP: asparagina endopeptidasa	DAG: diacilglicerol
AICD: dominio intracelular de la APP	DAM: microglía asociada a daño
AINEs: antiinflamatorios no esteroideos	DAMPS: patrón molecular asociado a daño
ALDH: aldehído deshidrogenasa	DBH: dopamina β -hidroxilasa
AMPc: monofosfato de adenosina cíclico	DC: dopamina descarboxilasa
AMS: estado mental alterado	DCL: deterioro cognitivo leve
ANOVA: análisis de la varianza	DEPC: dietil-pirocarbonado
Aph 1: <i>Anterior Pharynx Defective 1</i>	DFT: demencia frontotemporal
APOE: apolipoproteína E	DG: giro dentado
APOJ: apolipoproteína J	DHMA: ácido 3, 4-dihidroxi-mandélico
APP: proteína precursora amiloidea	DHPG: 3,4 dihidroxifenilglicol
ATP: trifosfoato de adenosina	DLFT: demencia Lobar Frontotemporal
Aβ: péptido β -amiloide	DMT2: diabetes tipo 2
BACE-1: β -secretasa	DNA: ácido desoxirribonucleico
BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro	dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato
BHE: barrera hematoencefálica	DOPEGAL: 3,4 dihidroxifenilglicolaldehído
BNST: núcleo del lecho de la estría terminal	DR: Núcleo dorsal del Rafe
C: control	DREADDs: receptores de diseño activados exclusivamente por una droga de diseño
C83: C-terminal de 83 aminoácidos de la APP	DS: síndrome de Down
C99: C-terminal de 99 aminoácidos	DSP4: N-(2-cloroetil)-N-etil-2-bromobencilamina
CaMKII: proteína quinasa II dependiente de la calmodulina	DYRK1a: cinasa-1-A regulada por fosforilación de tirosina de doble especificidad
CD36: clúster de diferenciación 36	EA: enfermedad de Alzheimer
CDK5: quinasa dependiente de ciclina-5	
cDNA: DNA complementario	

EBs: cuerpos embrionarios	IDP: proteína intrínsecamente desordenada
ELA: esclerosis lateral amiotrófica	IFNγ: interferón- γ
ELISA: ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas	IGF: factor de crecimiento insulínico tipo 1
EM: esclerosis múltiple	IHC: Inmunohistoquímica
EMBO: Organización Europea de Biología Molecular	IL: interleuquina
EMRR: esclerosis múltiple remitente recidivante	IMAO: inhibidores de la monoamino oxidasa
EOAD: <i>Early-onset Alzheimer's Disease</i>	IP3: inositol 1,4,5-trisfosfato
EP: enfermedad de Parkinson	iPSCs: células madre pluripotenciales inducidas
ERK: cinasa regulada por señales extracelulares	JNK: c-Jun-N-terminal-quinasa
FAD: enfermedad de Alzheimer familiar	LAT: transportador de aminoácidos neutros
FBS: suero fetal bovino	LC: locus coeruleus
FC: Citometría de flujo	LCR: líquido cefalorraquídeo
FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos	LDL: lipoproteínas de baja densidad
FDG-PET: Tomografía por emisión de positrones con 18F-fluorodeoxiglucosa	L-DOPA: ácido L-dihidroxifenilacético
FDR: tasa de descubrimiento falso	L-DOPS: L-treo-3,4-dihidroxifenilserina
FINGER: estudio finlandés de intervención geriátrica para prevenir el deterioro cognitivo y la discapacidad	LOAD: <i>Late-onset Alzheimer's Disease</i>
FPR2/ALX: receptor 2 del péptido N-formilo	LOX: lipooxigenasas
GABA: receptor del ácido gamma-aminobutírico	LPS: lipopolisacárido
gDNA: DNA genómico	LTP: potenciación a largo plazo
GFAP: proteína ácida fibrilar glial	LXA4: lipoxina A4
Gi: Núcleo gigantocelular	MAO: monoamino oxidasas
GPCRs: receptores acoplados a proteínas G	MAP: proteína que se asocia a los microtúbulos
GPR18/ARV2: receptor 18 acoplado a proteína G	MAPK: proteína cinasa activada por mitógenos
GPR32: receptor 32 acoplado a proteína G	MARCO: receptor de macrófagos con estructura colágena
GSK3β: glucógeno-sintasa-quinasa-3- β	MARK: microtúbulo-afinidad-quinasa-reguladora
GWAS: análisis de asociación de todo el genoma	MCP-1: proteína 1 quimioatrayente de monocitos
HCC: hipoperfusión cerebral crónica	MHPG: metoxihidroxifenilglicol
HP: hipocampo	MHPG: metoxihidroxifenilglicol
HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia	MOPEGAL: 3-metoxi-4-hidroxifenilglicolaldehído
ICAM-1: molécula de adhesión intercelular-1	mPGES1: prostaglandina sintasa-1 microsomal
IDE: enzima degradadora de insulina	MPs: progenitores microgliales
	MRI: imagen por resonancia magnética
	mRNA: ácido ribonucleico mensajero
	NA: noradrenalina
	NBM: medio neurobasal

NbM: núcleo basal de Meynert	Prnp: proteína priónica de ratón
NDRI: inhibidor de la recaptación de noradrenalina-dopamina	PrP: proteína priónica celular
NE: norepinefrina	PS: presenilina
NET: transportador de NA	PS1: presenilina 1
NFTs: ovillos neurofibrilares	PS2: presenilina 2
NFκB: factor nuclear κB	PSD95: proteína 95 de densidad postsináptica
NGF: factor de crecimiento neuronal	qPCR: PCR en tiempo real o PCR semicuantitativa
NINCDS-ADRDA: National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association	RAGE: receptor de productos finales de glicación avanzada
NM: neuromelanina	Rbx: reboxetina
NMDAR: receptores N-metil-D-aspartato	RM: resonancia magnética
NO: óxido nítrico	RMf: resonancia magnética funcional
NOS2: óxido nítrico sintasa 2	RMI: imagen por resonancia magnética
NOX2: enzima NADPH oxidasa 2	ROS: especies reactivas de oxígeno
NPD1: neuroprotectina D1	RT: transcripción reversa
NST: Núcleo del tracto solitario	RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de transcripción inversa
OD: otras demencias	RVD1: resolvina D1
OMS: Organización Mundial de la Salud	SAMP8: ratón acelerado por la senescencia 8
OPC: células progenitoras de oligodendrocitos	SCARA-1: receptor scavenger A-1
p75NTR: receptor de neurotrofina p75	SCARB-1: receptor scavenger B-1
PAG: Sustancia gris periacueductal	SCD: deterioro cognitivo subjetivo,
PAMPS: patrón molecular asociado a patógenos	SDS-PAGE: gel de electroforesis de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
PBS: buffer fosfato salino	SEM: error estándar de la media
PCR: reacción en cadena de la polimerasa	SGZ: zona subgranular
Pen-2: presenilina 2	SN: sustancia nigra
PET: tomografía por emisión de positrones	SNA: sistema nervioso autónomo
PGE2: prostaglandina E2	SNC: sistema nervioso central
PGi: Núcleo paragigantocelular	SNS: sistema nervioso simpático
PICALM: proteína de ensamblaje de clatrina de unión a fosfatidilinositol	SORL1: receptor relacionado con la sortilina 1
PIP2: fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato	SPMs: mediadores especializados en la resolución
PKA: proteína quinasa A	SVZ: zona subventricular
PKA: proteína quinasa A	TBS: tris buffer salino
PKC: proteína quinasa C	TDH: Trastorno de déficit de atención e hiperactividad
PLC: fosfolipasa C	TDP-43: proteína de unión al DNA de respuesta transactiva de 43 kDa
PPARγ: receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas	TGFβ: factor de crecimiento transformante β

TH: tirosina hidroxilasa

TI: índice de transformación

TNF γ : factor de necrosis tumoral γ

TREM: receptor desencadenante expresado en células mieloides

TREM2: receptor desencadenante expresado por las células mieloides 2

TrK β : receptor tirosina quinasa β

VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular-1

Veh: vehículo

VHS-1: virus del herpes simple tipo 1

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad

VMA: ácido vanililmandélico

VMAT2: transportador vesicular de monoaminas 2

VN: núcleo vestibular

WB: Western Blot

α 1-RA: receptores α 1 adrenérgicos

α 2-RA: receptores α 2 adrenérgicos

α APPs: α APP soluble

α -syn: alpha-sinucleína

β APPs: β APP soluble

RESUMEN/ABSTRACT

2 RESUMEN / ABSTRACT

2.1 RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) constituye la forma más común de demencia en todo el mundo y se prevé que su prevalencia aumente exponencialmente en los próximos años, mientras que aún no existen tratamientos eficaces que modifiquen el curso de esta enfermedad.

La EA se caracteriza por la presencia de placas de amiloides, formadas por el péptido β -amiloide ($A\beta$), y de ovillos neurofibrilares (NFTs), formados por la proteína tau fosforilada, que llevan a la degeneración de las células nerviosas y atrofia cerebral. En los últimos años se ha demostrado el papel central de la neuroinflamación y la respuesta celular aberrante, particularmente de las células gliales, en la fisiopatología de la EA. Además, diversos estudios han demostrado la existencia de una pérdida temprana de neuronas noradrenérgicas en el *locus coeruleus* (LC), principal fuente de noradrenalina (NA) en el sistema nervioso central (SNC), y de la innervación noradrenérgica en las diferentes regiones cerebrales en la EA, lo que conlleva una compleja desregulación del sistema noradrenérgico en esta enfermedad neurodegenerativa.

Por otro lado, diferentes estudios han señalado el potencial neuroprotector de la NA a través de la inhibición de la producción de moléculas proinflamatorias y la inducción de la expresión de factores neurotróficos a través del control de las células gliales. En base a esto, se ha planteado la hipótesis de que la alteración del sistema noradrenérgico y de los niveles cerebrales de NA que tiene lugar en la EA podría contribuir a la neuroinflamación crónica y la activación glial aberrante que contribuyen a la patogénesis y progresión de la EA. Por lo tanto, el restablecimiento de una adecuada señalización noradrenérgica podría representar una potencial estrategia terapéutica para reducir la progresión de esta enfermedad.

En base a estos antecedentes, en la presente tesis doctoral decidimos profundizar en los mecanismos antiinflamatorios y neuroprotectores de la NA, así como estudiar el potencial terapéutico de la reboxetina, inhibidor de la recaptación de la NA, en la EA.

Nuestros datos han demostrado el potencial terapéutico de la reboxetina para reducir la neuroinflamación y neurodegeneración en modelos murinos de la EA tales como el modelo de amiloidosis 5xFAD y el modelo de taupatía P301S, así como la implicación de la quimioquina CCL2 en la neuroinflamación presente en estos modelos animales. Estos datos, junto con los realizados por otros grupos de investigación apoyan el potencial de los fármacos que actúan sobre el sistema noradrenérgico como moduladores de la EA, pudiendo actuar sobre la neuroinflamación y la reactividad glial, así como los propios depósitos de $A\beta$ y tau que juegan un papel central en la fisiopatología de la EA. En este sentido, la disponibilidad de fármacos clínicamente aprobados que reestablecen la función noradrenérgica central brinda una oportunidad única para reorientar su uso con el fin de determinar su potencial como nueva estrategia terapéutica modificadora de la EA.

Sin embargo, los modelos animales tan solo reproducen algunos de los aspectos de la patología de la EA lo que presenta una limitación de nuestro estudio. Además, en los últimos

años se ha demostrado que las células gliales humanas presentan grandes diferencias en su respuesta a la EA en comparación con las células gliales murinas. En este sentido, el último bloque de apartados comprende el uso de cultivos de células de microglía derivadas de células madre pluripotenciales inducidas (iPSCs) humanas donde se evaluaron los efectos de la NA como primer paso para la validación de sus efectos antiinflamatorios previamente observados en roedores. Los resultados obtenidos indican que la NA presenta un papel dual en el control de la inflamación en las células de microglía humanas, pudiendo inhibir o disminuir la respuesta inflamatoria en función del contexto. Estos datos ponen de manifiesto la complejidad del sistema noradrenérgico en el control de las células gliales y los procesos neuroinflamatorios.

Por lo tanto, a pesar del potencial terapéutico de la reboxetina en la EA, la complejidad de la señalización de la NA y la multiplicidad de efectos de los subtipos de receptores adrenérgicos, junto con las limitaciones de los estudios en animales e *in vitro*, subrayan la existencia de diferentes retos a los que debemos enfrentarnos con el fin de esclarecer el potencial terapéutico de los fármacos moduladores del sistema noradrenérgico para la EA.

2.2 ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia worldwide and its prevalence is expected to increase exponentially in the coming years, while there are still no effective treatments to modify the course of this disease.

AD is characterized by the presence of amyloid plaques, formed by amyloid β peptide ($A\beta$), and neurofibrillary tangles (NFTs), formed by phosphorylated tau protein, leading to nerve cell degeneration and brain atrophy. In recent years, the central role of neuroinflammation and aberrant cellular response, particularly of glial cells, in the pathophysiology of AD has been described. In addition, several studies demonstrate the existence of an early loss of noradrenergic neurons in the *locus coeruleus* (LC), the main source of noradrenaline (NA) in the central nervous system (CNS), and of noradrenergic innervation in the different brain regions in AD, leading to a complex dysregulation of the LC-NA system in this neurodegenerative disease.

On the other hand, different studies showed the neuroprotective potential of NA due to the reduction of proinflammatory molecules and the induction of neurotrophic factors through the control of glial cells. Based on this, it has been hypothesized that the disruption of the LC-NA system that occurs in AD could contribute to the chronic neuroinflammation and glial overactivation that lead to the pathogenesis and progression of AD. Therefore, restoration of noradrenergic signaling could represent a potential therapeutic strategy to reduce the progression of this disease.

Based on this, in the present doctoral thesis we decided to delve into the anti-inflammatory and neuroprotective mechanisms of NA, as well as to study the therapeutic potential of reboxetine, an NA reuptake inhibitor, in AD.

Our data demonstrate the therapeutic potential of reboxetine to reduce AD progression in animal models of AD such as 5xFAD (amyloidosis model) and P301S (tauopathy model), as well as the involvement of the chemokine CCL2 in the neuroinflammation present in these animal models. These data, together with those generated by other research groups, support the potential of NA-related drugs as modulators of AD, due to its ability to reduce

neuroinflammation and glial reactivity, as well as the A β and tau deposits. In this regard, the availability of clinically approved drugs that restore central noradrenergic function provides a unique opportunity to repurpose them and to determine their potential as a new AD-modifying therapeutic agents.

However, animal models only recapitulate some of the aspects of AD pathology which presents a limitation in our study. In addition, it was recently shown that human glial cells differ in their response to AD from murine glial cells. In this sense, the last block of results comprises the use of microglial cell cultures derived from human induced pluripotent stem cells (iPSCs) where the effects of NA were evaluated as a first step for the validation of its anti-inflammatory effects previously observed in rodents. The results obtained indicate that NA has a dual role in the control of inflammation in human microglial cells, being able to inhibit or reduce the inflammatory response depending on the context. These data highlight the complexity of the noradrenergic control of glial cells and neuroinflammatory processes.

Therefore, despite the therapeutic potential of reboxetine in AD, the complexity of NA signaling and the variety of effects of adrenergic receptor subtypes, together with the limitations of animal and *in vitro* studies, underline the existence of different future challenges that we must face to clarify the therapeutic potential of NA-related drugs as modifiers of AD.

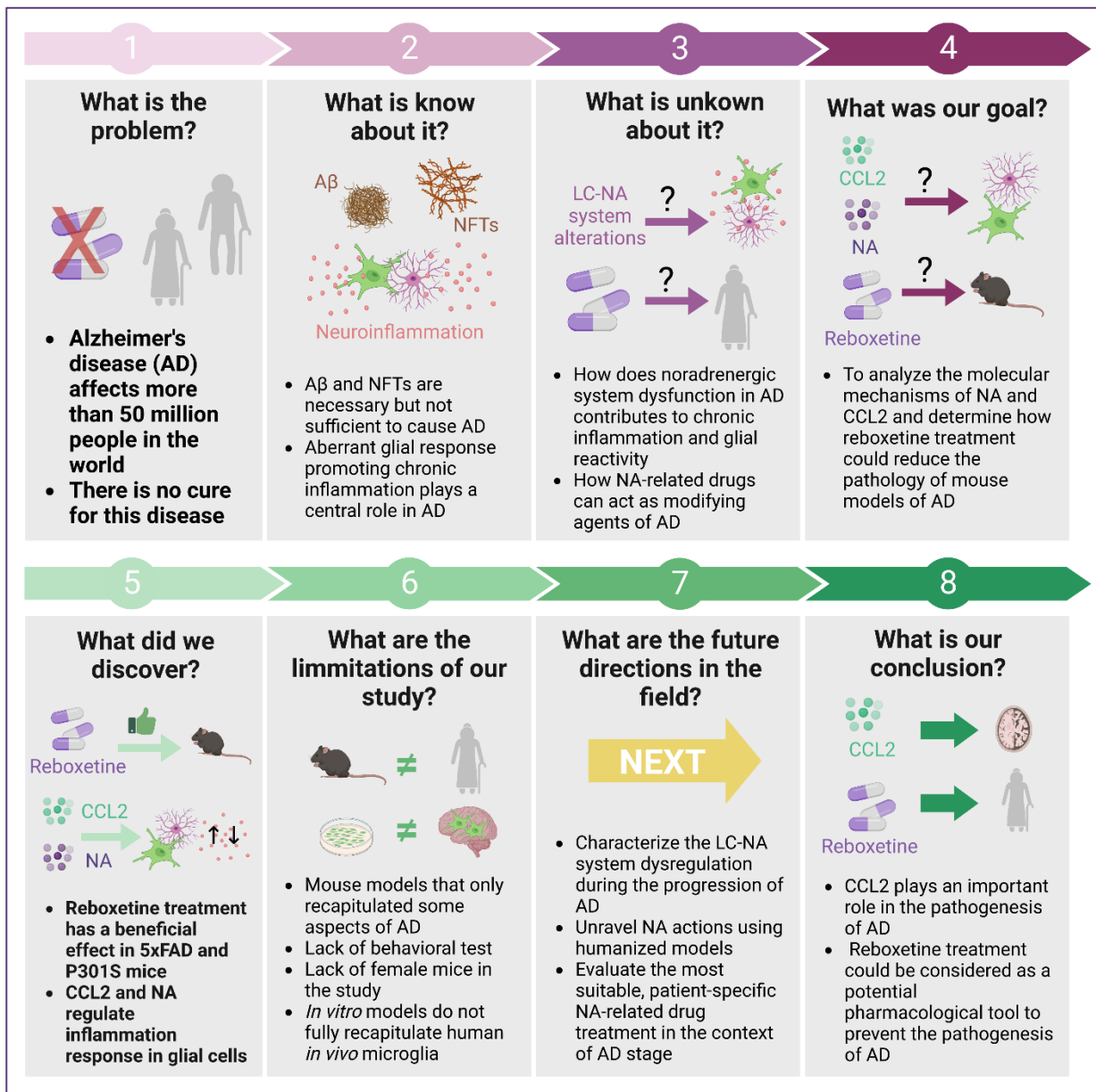


Figura 1. Graphical abstract.

INTRODUCCIÓN

3 INTRODUCCIÓN

3.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

3.1.1 Definición

La demencia es un término general que designa un grupo concreto de síntomas, a saber, dificultades en la memoria, el lenguaje, la resolución de problemas y otras habilidades de pensamiento. La aparición de estos síntomas puede deberse a diferentes causas y éstas reflejan cambios específicos en el sistema nervioso central (SNC) (Alzheimer's disease facts and figures, "2022 Alzheimer's disease facts and figures," 2022a).

La enfermedad de Alzheimer (EA), una enfermedad neurodegenerativa, es una de las causas de demencia caracterizada por la acumulación extracelular en el SNC de placas amiloides formadas por agregados del péptido β amiloide ($A\beta$) y acúmulos intraneuronales de la proteína tau fosforilada, conocidos como ovillos neurofibrilares (NFTs), así como la degeneración de las células nerviosas (Alzheimer's disease facts and figures, "2022 Alzheimer's disease facts and figures," 2022a).

Entre el 60% y el 80% de los casos de demencia se deben a la EA, por lo que esta enfermedad constituye la causa más común de demencia en todo el mundo y presenta enormes implicaciones para los pacientes y la sociedad (Scheltens et al., 2021). Se espera que su prevalencia aumente exponencialmente en los próximos años y aún no existen tratamientos eficaces que detengan su progresión (Yu et al., 2021), lo que la convierte en una de las enfermedades de las más caras y letales de este siglo. Por ello, la EA está reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una prioridad de salud pública mundial.

3.1.2 Historia

En 1901, la paciente Auguste Deter (1850-1906) de 51 años fue examinada por el Dr. Alois Alzheimer (1864-1915), un psiquiatra y neuropatólogo alemán, en una institución mental de la ciudad de Frankfurt (Alemania). A pesar de su joven edad, Auguste presentaba un grave deterioro cognitivo: pérdida de la memoria a corto plazo, afasia, apraxia, delirios e incompetencia psicosocial. Estos síntomas se habían observado en pacientes de más de setenta años, pero no en alguien tan joven como Auguste. El análisis post mortem reveló al Dr. Alois Alzheimer y a su equipo la presencia de atrofia cerebral, pérdida neuronal, placas de $A\beta$, NFTs y aterosclerosis. El Dr. Alois Alzheimer también describió la presencia de astrocitos y microglía reactivos en las proximidades de las placas de $A\beta$ (Alzheimer et al., 1995; Strassnig & Ganguli, 2005). En 1906, publicó este caso de "demencia presenil" (Alzheimer et al., 1995). Pero no fue hasta 1910, cuando Emil Kraepelin (1856-1926) la presentaría como una nueva enfermedad con el nombre de su colega: enfermedad de Alzheimer (EA).

3.1.3 Epidemiología

Prevalencia e incidencia

En el año 2022, la *Alzheimer's Disease International* estimó una prevalencia de la demencia de unos 55 millones de personas en todo el mundo. Esta cifra se prevé que se duplique cada 20 años, alcanzando los 78 millones en 2030 y los 139 millones en 2050 ("2022 Alzheimer's disease facts and figures," 2022b; Scheltens et al., 2021). Respecto a la incidencia, la *Alzheimer's Disease International* estima que cada año surgen 10 millones de casos de demencia en todo el mundo, lo que supone un nuevo caso cada 3,2 segundos ("2022 Alzheimer's disease facts and figures," 2022b; Scheltens et al., 2021; *World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia*, 2019).

Mortalidad

La supervivencia tras un diagnóstico de EA varía considerablemente y depende de numerosos factores (Brodaty et al., 2012). Sin embargo, la supervivencia tras el diagnóstico disminuye con la edad y diferentes estudios estiman que las personas de 65 años o más sobreviven una media de cuatro a ocho años tras ser diagnosticadas con EA (Ganguli et al., 2005; Tom et al., 2015; Waring et al., 2005).

Impacto económico

La EA representa un coste económico muy elevado para la sociedad. Según una estimación de la *Alzheimer's Disease International* en 2019, el coste global de la enfermedad en 2015 ascendía a 818.000 millones de dólares. En 2021, el coste global ascendió a los 1.3 trillones de dólares, y se estima que ascienda hasta los 2.8 trillones de dólares en 2030 (*Alzheimer's Disease International, World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia*, 2019).

3.1.4 Sintomatología

Actualmente, se estima que las primeras alteraciones cerebrales que tienen lugar en la EA se inician hasta 20 años antes de que los primeros síntomas clínicos aparezcan. Por tanto, la EA constituye una enfermedad progresiva comenzando con una fase preclínica (asintomática) y terminando con una demencia de Alzheimer grave ([Figura 2](#)). La duración de cada una de las etapas es variable y se ve influida por distintos factores de riesgo (véase apartado 3.1.5).

De forma general, los síntomas tempranos incluyen dificultades para recordar conversaciones, nombres o acontecimientos, mientras que la apatía y la depresión también suelen estar presentes en muchos de los pacientes como síntomas tempranos. Los síntomas tardíos incluyen problemas de comunicación, desorientación, confusión, falta de juicio y cambios de comportamiento. En casos más avanzados de pacientes con demencia severa debido a la EA se observan además dificultad para hablar, tragar y caminar (*Alzheimer's disease facts and figures*, "2022 Alzheimer's disease facts and figures," 2022a).

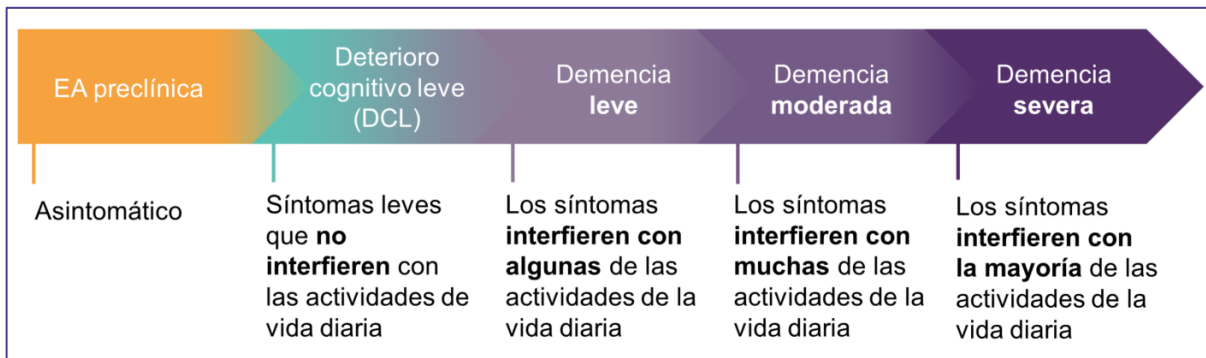


Figura 2. Progresión de la sintomatología en la EA. Figura adaptada de (Alzheimer's disease facts and figures, "2022 Alzheimer's disease facts and figures," 2022a).

EA preclínica

Esta fase se caracteriza por la presencia de alteraciones cerebrales relacionadas con la EA, pero sin síntomas evidentes debido a las compensaciones del SNC que permiten a las personas desenvolverse con normalidad. Cabe destacar que no todas las personas con estas alteraciones cerebrales acaban desarrollando EA (Bennett et al., 2006; Knopman et al., 2003).

Deterioro cognitivo leve (DCL)

El DCL se caracteriza por la presencia de alteraciones leves de memoria, lenguaje y pensamiento que no interfieren con las actividades de la vida diaria. La aparición de estas alteraciones parece deberse a la incapacidad del cerebro de compensar el daño y la muerte neuronal. Es importante destacar que, entre las personas con DCL, aproximadamente el 15% desarrolla demencia al cabo de dos años (Petersen et al., 2018), dentro de las cuales un tercio desarrolla demencia debida a la EA al cabo de cinco años (Ward et al., 2013).

Demencia debida a la EA

La demencia debida a la EA se caracteriza por síntomas perceptibles en la memoria, el lenguaje, el pensamiento y/o el comportamiento, interfiriendo en las actividades de la vida diaria del individuo (Alzheimer's disease facts and figures, "2022 Alzheimer's disease facts and figures," 2022a).

En la demencia leve, los individuos presentan problemas de memoria y otras capacidades cognitivas dando lugar a problemas tales como: desorientación, problemas para manejar dinero y pagar facturas, repetición constante de las mismas preguntas y cambios de personalidad y comportamiento. La demencia moderada suele ser la etapa más larga en la que el individuo presenta cada vez mayores problemas de memoria y lenguaje, lo que se asocia a una mayor dificultad para reconocer a sus seres queridos y realizar tareas múltiples, como bañarse o vestirse. En esta etapa, los pacientes sufren mayores cambios de personalidad y comportamiento, tales como: susceptibilidad, agitación e impulsividad. Además, pueden tener alucinaciones, delirios y paranoia. Finalmente, los individuos con demencia severa presentan grandes dificultades para comunicarse verbalmente. Además, presentan disfagia (problemas para comer y tragar) y problemas para caminar, por lo que en muchas ocasiones las personas quedan encamadas.

3.1.5 Factores de riesgo

Los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de la EA son: la edad, la genética y el sexo biológico (Figura 3) (Scheltens et al., 2021). Sin embargo, existen otros factores de riesgo modificables tales como la actividad física, el tabaquismo, la educación, la actividad social y mental, la presión arterial y la dieta, cuyo abordaje podría evitar o retrasar hasta un 40% de los casos de demencia debido a la EA (Livingston et al., 2020).

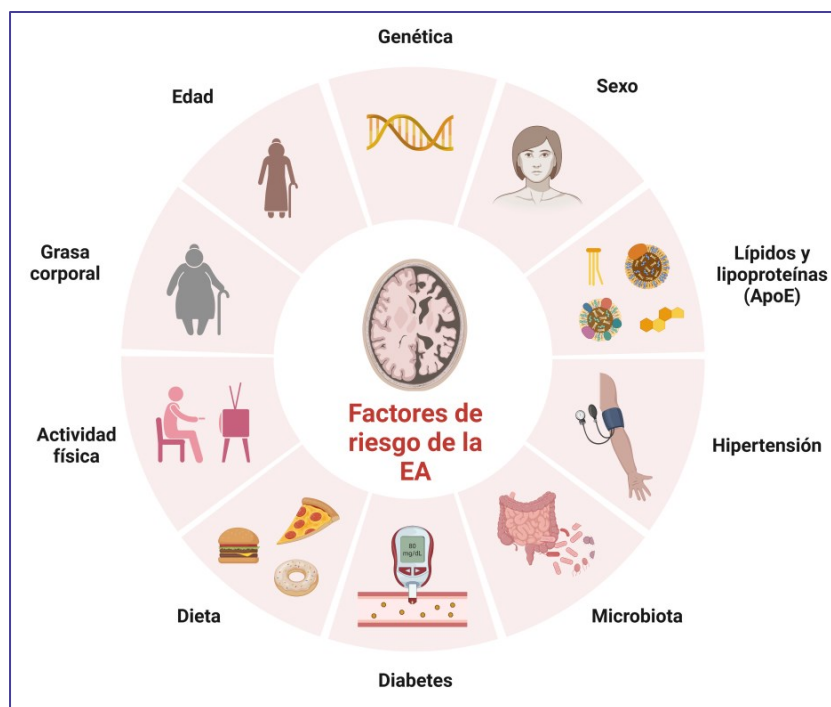


Figura 3. Principales factores de riesgo de la EA.

Edad

La edad es el factor de riesgo más importante en el desarrollo de la EA. El porcentaje de personas con EA aumenta drásticamente con la edad: el 5,0% de las personas de 65 a 74 años, el 13,1% de las personas de 75 a 84 años y el 33,2% de las personas de 85 años o más sufren la EA (Alzheimer's disease figures and facts, "2022 Alzheimer's disease facts and figures," 2022a). Sin embargo, es importante señalar que la EA no es una parte normal del envejecimiento, y por tanto la edad avanzada por sí sola no es suficiente para causar esta enfermedad (Nelson et al., 2011).

Genética

Uno de los factores genéticos que más aumentan el riesgo de padecer la EA es ser portador de al menos un alelo del gen de la apolipoproteína E (APOE) $\epsilon 4$ (van der Lee et al., 2018), aumentando las probabilidades de desarrollar la EA entre 3-4 veces. APOE $\epsilon 4$ es una de las tres isoformas de APOE: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ o $\epsilon 4$. La APOE es el principal componente de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), que son partículas complejas que permiten que los lípidos circulen por el torrente sanguíneo. APOE

$\epsilon 4$ se asocia a alteraciones en la homeostasis y el transporte del colesterol en oligodendrocitos, dando lugar a disfunciones en la mielinización neuronal (Blanchard et al., 2022). Alternativamente, heredar la isoforma APOE $\epsilon 2$ parece disminuir hasta 2 veces el riesgo de desarrollar la EA (Genin et al., 2011). Por otro lado, diferentes estudios de asociación de genoma completo han identificado otros alelos de riesgo para el desarrollo de la EA, siendo lo más relevantes las variantes en los genes: el receptor desencadenante expresado por las células mieloides 2 (TREM2), el miembro 7 de la subfamilia de *cassettes* de unión a ATP (ABCA7) y el receptor relacionado con la sortilina 1 (SORL1) (Jansen et al., 2019; Scheltens et al., 2021).

Sexo biológico

En cuanto al sexo, las mujeres son más propensas a desarrollar la EA que los hombres, especialmente después de los 80 años. Las mujeres también son más propensas a tener una mayor carga de tau, a pesar de tener una carga similar de A β (Niu et al., 2017; Scheltens et al., 2021).

3.1.6 Clasificación

La EA se divide en función de su heredabilidad en: EA familiar y EA esporádica. Por otro lado, según el momento en que se desencadena la enfermedad, la EA puede dividirse en: EA de inicio temprano y EA de inicio tardío (Tellechea et al., 2018).

Enfermedad de Alzheimer familiar

La EA familiar, también conocida como FAD por sus siglas en inglés (*Familiar Alzheimer Disease*), suele aparecer antes de los 65 años y parece ser responsable de alrededor del 10% de los casos de EA (Harman, 2006). La EA familiar se asocia a una de las tres mutaciones autosómicas dominantes conocidas en la proteína precursora amiloidea (APP) en el cromosoma 21, la presenilina 1 (PS1) en el cromosoma 14 y la presenilina 2 (PS2) en el cromosoma 1 (Bird, 2005; Kowalska, 2004).

Enfermedad de Alzheimer esporádica

La EA esporádica es la forma más común de la EA y normalmente aparece a partir de los 65 años, por lo que el envejecimiento parece ser el principal factor de riesgo. Su causa es desconocida, pero se relaciona con la combinación de genes, ambiente y estilo de vida (Hebert et al., 1995).

Enfermedad de Alzheimer de inicio temprano

La EA de inicio temprano, conocida como EOAD por sus siglas en inglés (*Early-onset Alzheimer's Disease*), afecta a personas menores de 65 años. Los primeros síntomas aparecen entre finales de los 40 y principios de los 50 años, aunque en algunos casos pueden llegar a comenzar a finales de los 20 años. El inicio temprano de la enfermedad es poco frecuente y corresponde tan solo al 5% del total los casos de EA (Mendez, 2019). La mayoría de los pacientes con EA de inicio temprano suelen presentar de la EA familiar. Los pacientes que padecen EA de inicio temprano presentan una mayor densidad de placas de A β y una mayor atrofia cerebral (Tellechea et al., 2018).

Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío

La EA de inicio tardía, conocida como LOAD por sus siglas en inglés (*Late-onset Alzheimer's Disease*), es el tipo más frecuente, afectando a personas mayores de 65 años. En comparación con la EA de inicio temprano, los pacientes con EA de inicio tardío presentan una pérdida de memoria más importante y tienen una mayor frecuencia del alelo APOE $\epsilon 4$ (Tellechea et al., 2018).

3.1.7 Fisiopatología

La EA es trastorno multifactorial relacionado con diferentes factores de riesgo. El nivel de complejidad tanto del cerebro humano como de la propia enfermedad hacen que la fisiopatología detallada de la EA siga siendo todavía desconocida. Actualmente, la EA se caracteriza por la acumulación de $A\beta$ y NFTs. Estos cambios van acompañados de neuroinflamación, daño oxidativo, alteraciones vasculares y, en fases avanzadas, muerte neuronal (neurodegeneración) y atrofia cerebral (Hanseeuw et al., 2019).

Agregados de $A\beta$

La principal característica de la EA es la alteración en las vías de procesamiento de APP, seguida de la agregación y el depósito de $A\beta$ en las conocidas como placas amiloides o placas seniles. Tanto las placas como el propio péptido, así como sus oligómeros presentan un efecto neurotóxico contribuyendo a la reactividad glial y muerte neuronal (Reiss et al., 2018).

La APP es una proteína de membrana que se expresa en diferentes tejidos, pero en especial en las sinapsis neuronales, presentando importantes funciones fisiológicas durante el desarrollo cerebral y en la plasticidad neuronal, y por tanto en aprendizaje y la memoria (Müller et al., 2017). La APP se procesa enzimáticamente a través de las secretasas mediante dos vías diferentes: la vía no amiloidogénica y vía amiloidogénica (Figura 4).

1. *Vía no amiloidogénica:* la APP es procesada por la α -secretasa liberando el fragmento α APP soluble (α APPs) a la matriz extracelular y dejando el fragmento α Carboxiterminal, que constituye un fragmento C-terminal de 83 aminoácidos de la APP (C83), anclado a la membrana. El α APPs activa las vías de supervivencia celular e inhibe la apoptosis neuronal, presentando un efecto neuroprotector y desempeña un papel crucial en la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria (Müller et al., 2017). A continuación, la γ -secretasa procesa el C83 dando lugar al fragmento p3 (3 kDa), que se libera en el espacio extracelular, y al dominio intracelular de la APP (AICD). El AICD puede translocarse al núcleo para regular la expresión genética de genes apoptóticos (Chen et al., 2017).

2. *Vía amiloidogénica:* APP es dividido por la β -secretasa, también conocida como BACE-1, en dos segmentos: un fragmento C-terminal de 99 aminoácidos (C99) y β APP soluble (β APPs) liberado de la superficie celular. El C99 es escindido por la γ -secretasa para producir péptidos $A\beta$ de diferente longitud, de 37 a 49 aminoácidos. Las formas más comunes son $A\beta 40$ y $A\beta 42$. Ambos péptidos son tóxicos, aunque el $A\beta 42$ es insoluble y presenta una mayor probabilidad de formar agregados (Chen et al., 2017). Las mutaciones en la APP, implicadas en el desarrollo de la EA familiar, favorecen la acción enzimática de la BACE-1 aumentando el procesamiento enzimático de la APP a través de la vía amiloidogénica. En los seres humanos, la γ -secretasa es un complejo de proteasas intramembrana ensamblado por la presenilina (PS), la nicastrina, el potenciador de presenilina 2 (Pen-2) y la *Anterior Pharynx*

Defective 1 (Aph 1) (De Strooper, 2003). La PS es la subunidad catalítica de la γ -secretasa. Más de 200 mutaciones en el gen de la PS se han relacionado con la EA familiar (De Strooper et al., 2012). En los seres humanos, dos genes codifican dos formas homólogas de la PS (PS1 y PS2), encontrándose la mayoría de las mutaciones asociadas al desarrollo de la EA familiar en el gen de la PS1.

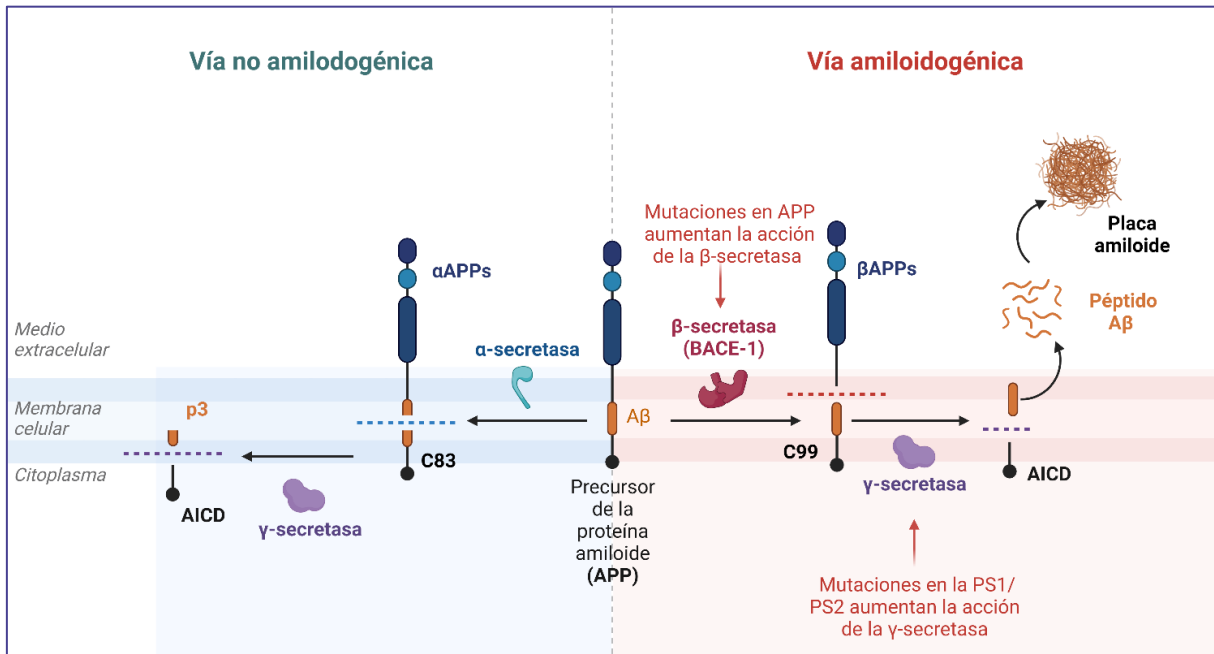


Figura 4. Vías proteolíticas del precursor de la proteína precursora amiloide (APP). AICD: dominio intracelular de la APP, C83: C-terminal de 83 aminoácidos de la APP, α APPs: fragmento α APP soluble, APP: precursor de la proteína amiloide, C99: C-terminal de 99 aminoácidos de la APP, β APPs: β APP soluble, PS: presenilina.

Los péptidos de A β formados a partir de la vía amilodogénica pueden agregarse en oligómeros y continuar ensamblándose en fibrillas maduras que posteriormente darán lugar a placas amiloides, también conocidas como placas seniles, que se encuentran en el cerebro de los pacientes con EA. Todas las formas de A β desde los monómeros hasta las placas amiloides pasando por las fibras parecen presentar cierta toxicidad (Reiss et al., 2018). Sin embargo, parece que la investigación ha formado un consenso cada vez más aceptado sobre la mayor toxicidad de los oligómeros de A β (Cleary et al., 2005; Sakono & Zako, 2010), especialmente los oligómeros de bajo peso molecular (Glabe, 2008). Mientras que se postula que las formas fibrilares y las placas amiloides pueden actuar como reservorios de los oligómeros bioactivos o como mecanismo de secuestro que los hace inertes (Caughey & Lansbury, 2003; Shahnawaz & Soto, 2012).

Según la evidencia científica disponible, los oligómeros A β pueden: 1) *Provocar la formación de poros en la membrana celular:* dando lugar a la fuga de iones, la alteración del equilibrio del calcio celular y la pérdida del potencial de membrana. El aumento de calcio podría causar disfunción mitocondrial, induciendo a su vez una cascada de especies reactivas de oxígeno

(ROS), que conduce a la apoptosis neuronal (Reiss et al., 2018; Sakono & Zako, 2010). 2) *Inducir la apoptosis y muerte neuronal*: a través de la unión al receptor del factor de crecimiento neuronal (NGF) de baja afinidad [conocido como receptor de neurotrofina p75 (p75NTR)] (Coulson, 2006). 3) *Provocar deterioro y la pérdida sináptica*: al actuar como ligandos de receptores postsinápticos (Lacor et al., 2007), tales como los receptores de glutamato (principalmente receptores N-metil-D-aspartato, NMDAR), receptores $\alpha 7$ nicotínicos, receptores de acetilcolina, la proteína priónica celular (PrP) y el receptor Wnt frizzled (Barry et al., 2011; Magdesian et al., 2008; Oz et al., 2013; Renner et al., 2010). Además, los oligómeros A β también reducen la densidad de las espinas dendríticas (Gomes et al., 2014). De esta manera, los oligómeros de A β alteran la plasticidad sináptica e inhiben la potenciación a largo plazo (LTP) del hipocampo alterando la memoria (Reiss et al., 2018). 4) *Provocar toxicidad mitocondrial y estrés oxidativo*: los oligómeros de A β pueden alterar los procesos bioenergéticos a través de la interferencia en la cadena de transporte de electrones al penetrar en la membrana mitocondrial induciendo la producción de ROS y estrés oxidativo (Tillement et al., 2011). Además, se ha observado que el A β induce directamente la disfunción mitocondrial al interferir con los procesos de fusión y fisión mitocondrial (X. Wang et al., 2009; Wang et al., 2008).

En la **Figura 5** se resumen los principales mecanismos de toxicidad de los oligómeros de A β .

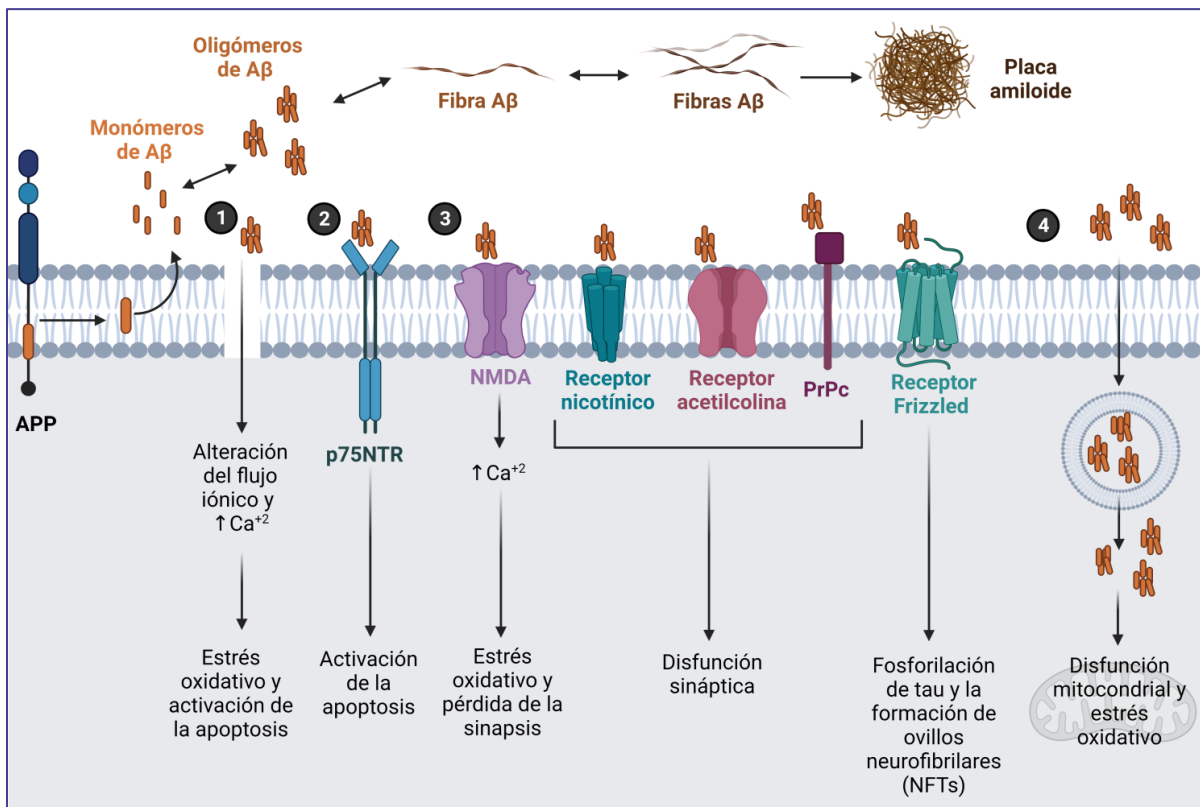


Figura 5. Mecanismos de toxicidad de los oligómeros de A β . Figura adaptada (Sakono & Zako, 2010).

Sin embargo, cabe destacar que muchos científicos ponen en duda la validez de estos mecanismos de acción de los oligómeros de A β , pues muchos de los estudios utilizaron concentraciones fisiológicamente altas de A β o ratones transgénicos que sobreexpresan la APP de forma significativa. De modo que los efectos tóxicos derivados de la presencia de oligómeros de A β pueden deberse a efectos secundarios debidos a la alteración de sus funciones fisiológicas (De Strooper & Karran, 2016; Nilsson et al., 2014).

Hipótesis de la cascada amiloide

Hace más de 20 años, en el año 1992, se propuso por primera vez la hipótesis de la cascada amiloide (Figura 6), según la cual la acumulación del péptido A β en el SNC es la principal causa de la patogénesis de la EA (Hardy & Selkoe, 2002; Hardy & Higgins, 1992). Los depósitos de amiloide se deben a un desequilibrio entre la producción y eliminación de A β . Estos depósitos serían los responsables del proceso de la enfermedad, incluida la formación de NFTs y la neurodegeneración presente en los pacientes con la EA. De este modo, esta hipótesis asume implícitamente un modelo determinista de causa-efecto (es decir, una cadena de acontecimientos que producirán invariablemente el mismo resultado a partir de una condición o estado inicial determinado). Esta hipótesis ha sido el modelo dominante de la patogénesis de la EA durante más de 30 años y ha condicionado la búsqueda de nuevos fármacos para esta patología (Barage & Sonawane, 2015).

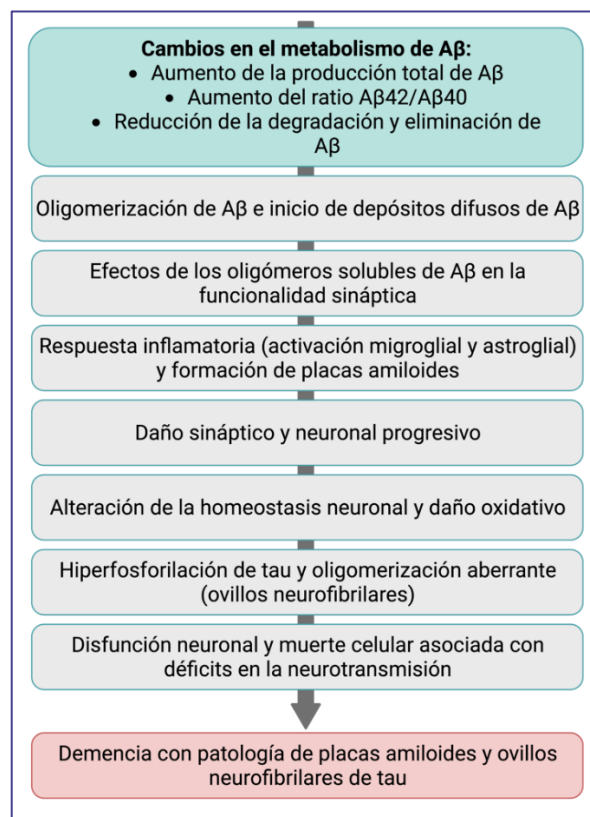


Figura 6. Hipótesis de la cascada amiloide en la enfermedad de Alzheimer. Figura adaptada (Barage & Sonawane, 2015).

Sin embargo, aunque este modelo se ajusta a la EA familiar, es menos aplicable a la EA esporádica. Además, la causalidad directa que propone la “hipótesis amiloide” es incompatible con las observaciones clínicas. Parece entonces que la acumulación de A β es necesaria pero insuficiente para causar la EA. Esto sumado a los retos que plantea el desarrollo de fármacos dirigidos contra el péptido amiloide, está haciendo que la comunidad científica este reconsiderando esta hipótesis (De Strooper & Karran, 2016; Kametani & Hasegawa, 2018).

Agregados de tau

Tau es una proteína que se asocia a los microtúbulos (MAP), estabilizándolos y promoviendo su ensamblaje y polimerización (Samsonov et al., 2004; Weissmann et al., 2009). Por lo tanto, está implicada en el mantenimiento de la estructura del citoesqueleto celular, junto con el resto de MAPs.

En humanos, el gen de tau se localiza en el cromosoma 17, y como resultado del empalme alternativo del ácido ribonucleico mensajero (mRNA) se expresan seis isoformas, con o sin los exones 2, 3 y 10 (Goedert et al., 1989). El exón 10 contiene la región de unión a microtúbulos. La inserción del exón 10 produce isoformas tau de 4 repeticiones (4R), mientras que las isoformas tau de 3 repeticiones (3R) se producen sin el exón 10. El cerebro humano adulto expresa las isoformas tau 3R y 4R, que se localizan principalmente en los axones de las neuronas adultas en condiciones fisiológicas normales. Desempeñando así un papel crucial en el mantenimiento estructural de los axones de las neuronas maduras.

Sin embargo, en condiciones patológicas, las isoformas de tau 3R y 4R pierden su funcionalidad al sufrir diversas modificaciones tales como fosforilaciones, glucosilaciones, metilaciones, acetilaciones, ubiquitinaciones y oxidaciones (Gong et al., 2005), lo que da lugar a las llamadas tauopatías. En la EA, tau se hiperfosforila debido a la acción de diferentes quinasas y fosfatasa, tales como: glucógeno-sintasa-quinasa-3- β (GSK3 β), microtúbulo-afinidad-quinasa-reguladora (MARK), proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), c-Jun-N-terminal-quinasa (JNK), la cinasa regulada por señales extracelulares (ERK), proteína quinasa A (PKA), cinasa-1-A regulada por fosforilación de tirosina de doble especificidad (DYRK1a), caseína-cinasa-I y quinasa dependiente de ciclina-5 (CDK5) (Gong & Iqbal, 2008). Las alteraciones de la actividad de estas enzimas pueden dar lugar a un aumento de la patología de tau. Además, la O-glicosilación puede regular negativamente la fosforilación de tau (Liu et al., 2004).

La fosforilación de tau conduce a su disociación de los microtúbulos neuronales, desestabilizándolos y provocando el deterioro axonal (Goedert, 1993; Goedert et al., 1996). La proteína tau disociada de los microtúbulos forma agregados y se acumula en el compartimento somatodendrítico de las neuronas en forma de agregados insolubles conocidos como ovillos neurofibrilares (NFTs) (Figura 7). La combinación de microtúbulos dañados y de los acúmulos de NFTs perjudica la plasticidad sináptica y la neurotransmisión, conduciendo a la neurodegeneración (Frandemiche et al., 2014; Zempel & Mandelkow, 2014). Los NFTs actúan como agentes tóxicos promoviendo la disfunción sináptica a través de la alteración de diferentes procesos, a saber: la disminución de los niveles de los receptores glutamatérgicos y de la movilidad y la liberación de vesículas sinápticas, la alteración de la maduración de las espinas dendríticas y del transporte y la función mitocondrial a nivel sináptico y el incremento de la fagocitosis de las sinapsis por parte de la microglía (revisado en Wu et al., 2021).

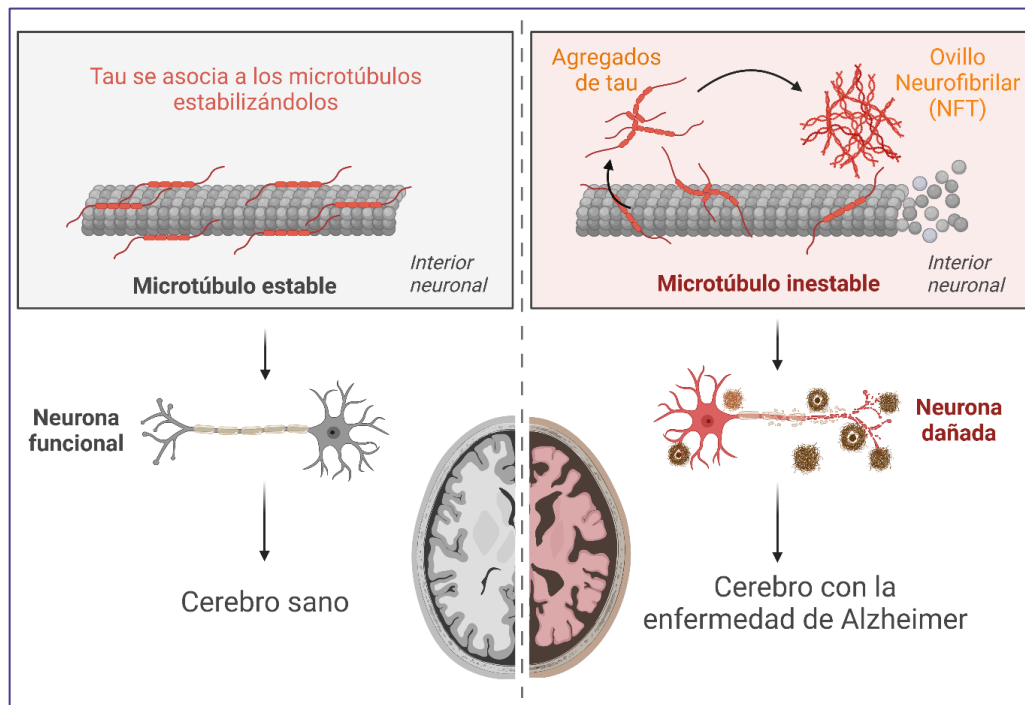


Figura 7. Agregados de tau en la enfermedad de Alzheimer (EA).

Los NFTs se inician en lugares determinados del cerebro y progresan durante años de acuerdo con una secuencia predecible, hasta que cruzan un umbral de disfunción clínicamente reconocible (Alafuzoff et al., 2008; Braak et al., 2006; Braak & Braak, 1991b, 1997; Thal et al., 2002; Thal et al., 2000). Atendiendo a esta progresión, la EA puede clasificarse según los **estadios de Braak** (Figura 8). La clasificación de Braak divide la progresión de la EA en seis estadios, siendo cada estadio más grave que el anterior (Braak & Braak, 1991a; Braak et al., 2011):

- **Estadios I-II de Braak:** Los NFTs aparecen en la región transentorrinal del cerebro. Mientras que los depósitos de A β comienzan a aparecer en la isocorteza (lóbulo frontal, temporal y occipital).
- **Estadios III-IV de Braak:** Los NFTs invaden completamente las regiones límbicas como el hipocampo y los depósitos de A β aumentan alrededor de la isocorteza, excepto en la corteza sensorial y motora.
- **Estadios V-VI de Braak:** Los NFTs y los depósitos de A β se encuentran ampliamente en la isocorteza. Todas las áreas isocorticales están invadidas con un patrón de distribución constante de placas A β de alta densidad. Incluso algunas estructuras subcorticales, como el hipocampo, el tálamo y el hipotálamo muestran placas dispersas.

Estudios realizados por Braak y su equipo en el año 2011 han determinado la presencia de NFTs en adultos jóvenes en las neuronas noradrenérgicas del *locus coeruleus* (LC). De este

modo, Braak y su equipo describieron los *estadios a-c de Braak*, los cuales constituirían un estadio previo al estadio I de Braak (Braak et al., 2011).

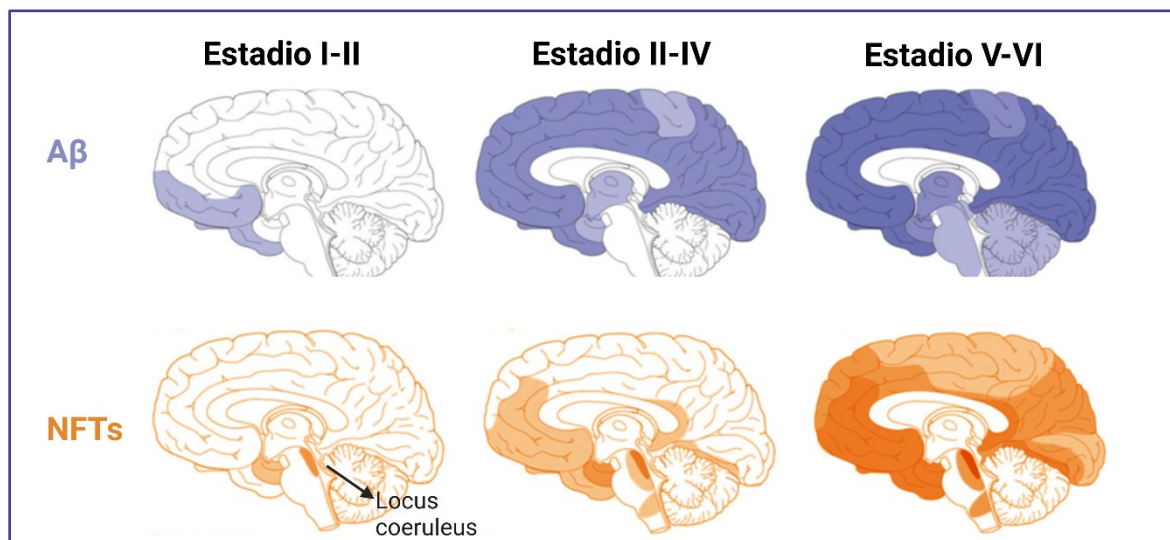


Figura 8. Estadio de Braak de la enfermedad de Alzheimer (EA). Figura adaptada (Goedert, 2015).

Hipótesis de tau

La hipótesis de tau postula que los NFTs constituyen la principal lesión neuropatológica en la EA. En 2009, se propuso esta hipótesis que explica cómo la proteína tau mal plegada podía propagarse por las células del mismo modo que los priones (Clavaguera et al., 2009; Frost et al., 2009). Aunque el mecanismo de transmisión de los agregados de tau de célula a célula aún no está claro, su distribución puede correlacionarse con los estadios clínicos de la EA (Braak & Braak, 1991b) y se considera que la patología tau se correlaciona mejor con las características clínicas de la EA que la patología de Aβ (Bejanin et al., 2017; Frontzkowski et al., 2022; Okamura & Yanai, 2017).

Otros agregados proteicos

La concomitancia de diferentes proteinopatías en las enfermedades neurodegenerativas es un evento frecuente en la mayoría de los pacientes y que ha sido poco estudiado por la comunidad científica. Aunque los agregados de Aβ y tau constituyen los rasgos neuropatológicos distintivos de la EA, un gran porcentaje de pacientes presentan además otros agregados proteicos (Robinson et al., 2018).

La proteína de unión al ácido desoxirribonucleico (DNA) de respuesta transactiva de 43 kDa (**TDP-43**) es una proteína intranuclear codificada por el gen TARDBP. El TDP-43 se sintetiza en el citoplasma y se traslada al núcleo, donde reside principalmente para realizar sus funciones fisiológicas. TDP-43 interviene en el empalme, el tráfico y la estabilización del RNA y, por tanto, en la regulación de la expresión génica. Las formas fosforiladas y truncadas de TDP-43 abandonan el núcleo celular y conforman cuerpos de inclusión citoplasmáticos

característicos en los pacientes con esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y con demencia Lobar Frontotemporal (DLFT). Sin embargo, la patología TDP-43 se detecta el 57% de los casos de EA (Meneses et al., 2021), donde se ha asociado con una mayor atrofia cerebral y una mayor pérdida de memoria (Josephs et al., 2014). Además, TDP-43 colocaliza con las placas amiloides y NFTs, lo que sugiere la existencia de una interacción directa entre TDP-43, A β y tau (revisado en Meneses et al., 2021).

La **alpha-sinucleína (α -syn)** es una proteína intrínsecamente desordenada (IDP), y se han descrito varios tipos de conformaciones estructurales, dependiendo de factores ambientales. La α -syn se considera el principal componente proteico fisiopatológico de los cuerpos de Lewy en las sinucleinopatías, y constituye el rasgo neuropatológico distintivo de la enfermedad de Parkinson (EP). Debido a las diferentes conformaciones que puede presentar, la α -syn puede desempeñar diferentes funciones e interactuar con varias proteínas, incluyendo A β y tau. Diferentes estudios mostraron que más del 50% de los pacientes con EA presentaban agregados de α -syn además de A β y tau (revisado en Shim et al., 2022). Al igual que TDP-43, la α -syn interacciona directamente con A β y tau promoviendo la agregación mutua y agravando el deterioro cognitivo e incrementando la tasa de mortalidad en los pacientes con EA. La α -syn se encuentra presente en el centro de las placas amiloides, sugiriendo su contribución a la formación de estas (Masliah et al., 1996). Además, los oligómeros de α -syn pueden inducir la formación de oligómeros de A β (Atsmon-Raz & Miller, 2016). Por otro lado, los cuerpos de Lewy colocalizan con los NFTs, sugiriendo la influencia de la agregación de tau en la formación de estos agregados de α -syn debido a las propiedades priónicas de ambas proteínas (Arai et al., 2001).

Neuroinflamación

A pesar de considerarse actualmente los agregados de A β y tau como los desencadenantes de la EA, una parte de los individuos con una alta carga de placas amiloides y NFTs en el cerebro no desarrollan esta enfermedad (Corrada et al., 2012; Riley et al., 2005; Schneider et al., 2009). Las razones de esta resiliencia cerebral siguen siendo desconocidas. Sin embargo, la falta de neuroinflamación podría ser una de las causas.

La neuroinflamación es la respuesta inflamatoria que tiene lugar en el SNC y puede estar causada por diversas agresiones patológicas, tales como infecciones, traumatismos, isquemia y toxinas. El proceso se caracteriza por la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF α), quimioquinas (CCL2, CCL3, CCL2, CXCL1), segundos mensajeros como prostaglandinas, óxido nítrico (NO) y ROS por parte de las células inmunitarias innatas del SNC (DiSabato et al., 2016). Las células inmunitarias innatas implicadas en este proceso son principalmente células gliales como las células de microglía y los astrocitos, pero las células endoteliales capilares y las células sanguíneas infiltradas también contribuyen a la neuroinflamación, especialmente cuando la barrera hematoencefálica (BHE) sufre daños bioquímicos o mecánicos (DiSabato et al., 2016; Heneka et al., 2014).

La respuesta inflamatoria es un mecanismo defensivo fundamental conservado a lo largo de la evolución para restablecer la homeostasis y recuperar el tejido dañado. Sin embargo, una resolución inadecuada y su acción prolongada en el tiempo y descontrolada presenta efectos citotóxicos contribuyendo a la progresión de múltiples patologías. Esta neuroinflamación con carácter patológico se asocia a la activación glial con una sobreproducción de citocinas y quimioquinas, infiltración de células inmunitarias periféricas, edema, aumento de la

permeabilidad y ruptura de la BHE (DiSabato et al., 2016). La sobreproducción de moléculas proinflamatorias y la reactividad glial parecen ser típicas sólo de los cerebros con EA, pero no de los cerebros resilientes (revisado en Gomez-Isla & Frosch, 2022; Heneka & O'Banion, 2007).

Diversos estudios han evaluado los niveles de diferentes **citoquinas**, tales como interleuquinas (IL1 β , IL2, IL6, IL8, IL10, IL12, IL18), interferón- γ (IFN γ), factor de necrosis tumoral γ (TNF γ) y factor de crecimiento transformante β (TGF β), en el plasma y el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con EA. Un análisis conjunto halló elevaciones globales en los niveles de IL1 β , IL6, IL12, IL18, TNF γ y TGF β en pacientes con EA en comparación con los controles sanos (Swardfager et al., 2010). Los niveles de las **quimioquinas** y de sus receptores también se encuentran elevados en el plasma, LCR y SNC de pacientes con la EA (revisado en Zuena et al., 2019). Los estudios realizados por Skolova y su equipo, indican que la quimioquina CCL2 desempeña un papel dominante en la propagación de la neuroinflamación en la EA (Sokolova et al., 2009), y sus niveles se correlacionan con la progresión de la enfermedad y el deterioro cognitivo (Kimura et al., 2018; Lee et al., 2018). La contribución de esta quimioquina a la fisiopatología de la EA se describirá más detalladamente en el apartado 3.5.

Por otro lado, los niveles de la enzima **ciclooxigenasa 2 (COX2)**, responsable de la síntesis de las prostaglandinas en el SNC, se encuentran elevados en el córtex frontal y el hipocampo de los pacientes con EA (Ho et al., 1999; Pasinetti & Aisen, 1998). Además de su contribución a la neuroinflamación, la sobreexpresión de esta enzima está relacionada con la síntesis de A β y su agregación, la formación de NFTs, el estrés oxidativo, la plasticidad sináptica, la muerte neuronal, la autofagia y la apoptosis; contribuyendo al deterioro cognitivo (revisado en Guan & Wang, 2019).

La **óxido nítrico sintasa 2 (NOS2)** es responsable de la síntesis de NO, el cual se encuentra incrementado en los pacientes con EA (revisado en Balez & Ooi, 2016). Sin embargo, la deficiencia de NO en las células endoteliales parece contribuir a la patología de la EA (Austin et al., 2013).

Finalmente, los **mediadores especializados en la pro-resolución (SPMs)** constituyen mediadores lipídicos endógenos producidos durante la fase de resolución de la inflamación (Headland & Norling, 2015; Serhan, 2014). Tras la activación de la respuesta inflamatoria, las lipooxigenasas (12-LOX, 15-LOX y 5-LOX) generan los SPMs a partir de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y del ácido araquidónico. Este grupo de lípidos actúan sobre diferentes receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) estimulando múltiples vías de señalización implicadas en la fase de resolución. Los principales receptores sobre los cuales actúan son: receptor 2 del péptido N-formilo (FPR2/ALX), receptor tipo quimioquina 1 (ChemR32/CMKLR1), receptor 32 acoplado a proteína G (GPR32) y receptor 18 acoplado a proteína G (GPR18/ARV2) (Chiang & Serhan, 2017). Los SPMs se han visto implicados en diferentes enfermedades neurodegenerativas (Schwartz & Baruch, 2014), siendo la EA donde más se ha estudiado su implicación (Whittington et al., 2017). En pacientes de EA se ha descrito una disminución de los niveles de la neuroprotectina D1 (NPD1), lipoxina A4 (LXA4) y de la resolvina D1 (RVD1) en LCR e hipocampo lo que se correlaciona con un mayor deterioro cognitivo (revisado en Serhan, 2014).

Hipótesis inflamatoria

Desde finales de los años 80, diferentes estudios han sugerido la relación entre el sistema inmunitario y la EA (Rogers et al., 1988). La hipótesis inflamatoria sugiere que el aumento de la producción de moléculas proinflamatorias exagera las patologías tanto de A β como de tau (revisado en Heneka & O'Banion, 2007). Por otro lado, la edad predispone a procesos inflamatorios, lo que podría explicar por qué la edad es el mayor factor de riesgo de la EA (Cribbs et al., 2012). Mientras que otros factores de riesgo para la EA tales como la hipercolesterolemia, la diabetes, la obesidad y la hipertensión comparten en su fisiopatología la presencia de una inflamación crónica (Amor et al., 2014). Por otro lado, se ha documentado que el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) disminuye el riesgo de desarrollar EA y retrasa la aparición de la enfermedad (revisado en Heneka & O'Banion, 2007). Sin embargo, la eficacia de los AINEs en la EA sigue siendo objeto de debate (Etminan et al., 2003). Esta falta de eficacia puede deberse a la gran complejidad de la respuesta inmunitaria en la EA, la cual depende de las diversas funciones de las células gliales.

Recientemente, la identificación de genes de riesgo para la EA mediante el análisis de asociación de todo el genoma (GWAS), determinó que la mayoría de los genes implicados están asociados a funciones inmunitarias y muchos de ellos son específicos de las células de microglía, tales como: APOE, TREM2, BIN1, CD33, INPP5D, CTSB, CTSD y PICALM (Lambert et al., 2013). Estos datos sugieren que la respuesta celular aberrante durante el proceso inflamatoria tiene un papel clave en la patogénesis de la EA (Figura 9).

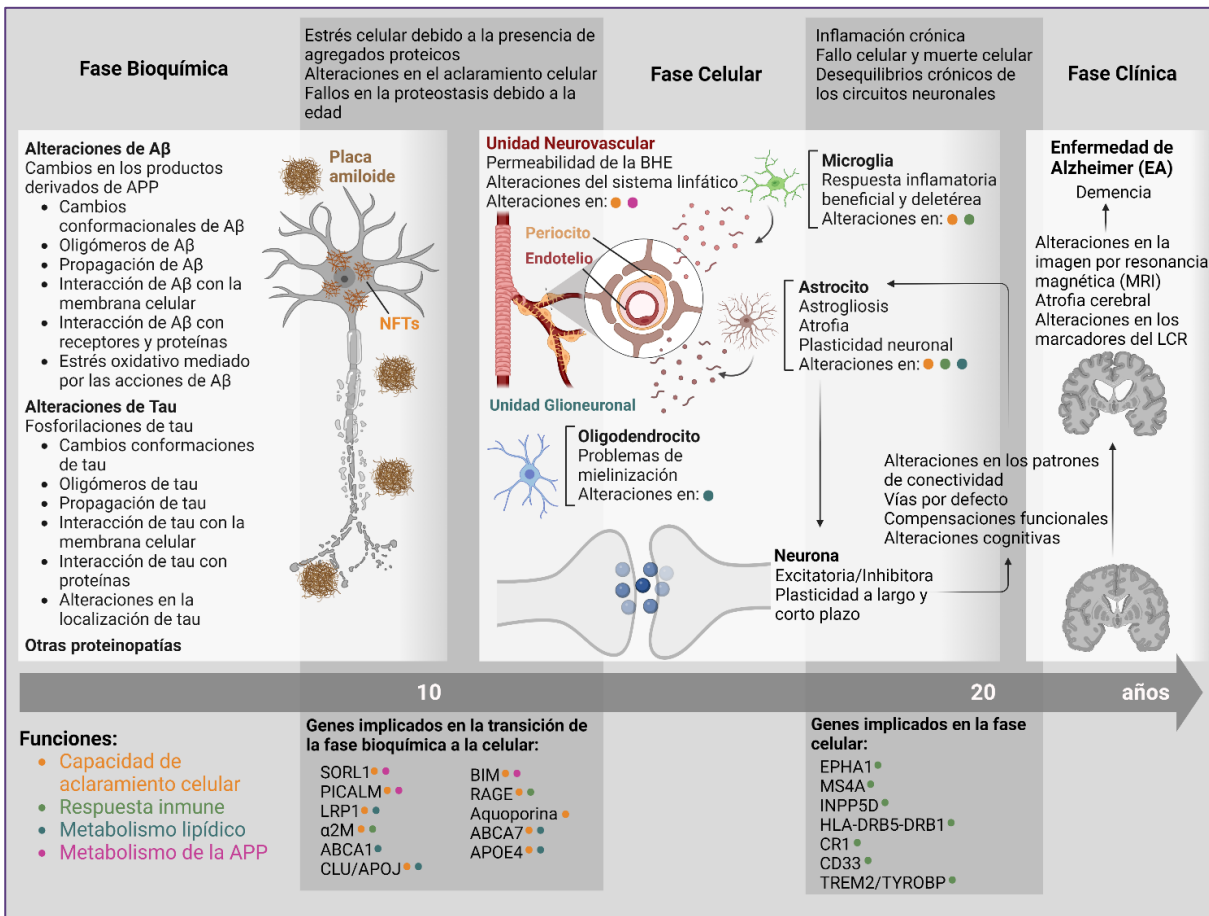


Figura 9. Fase bioquímica, celular y clínica de la EA. Figura adaptada (De Strooper & Karran, 2016). En esta figura se indica la transición desde la fase bioquímica a la fase clínica de la EA pasando por la fase celular. Las diferentes funciones celulares alteradas se indican en diferentes colores, este código de colores se utiliza para describir la función de los genes de riesgo de la EA implicados en la transición hacia la fase celular y clínica. APP: proteína precursora amiloidea, Aβ: péptido β-amiloide, BHE: barrera hematoencefálica, LCR: líquido cefalorraquídeo.

Según la hipótesis defendida por De Strooper y Barran, los agregados de Aβ y tau constituirían factores de riesgo para el desarrollo de la EA en lugar de desencadenantes de esta. Esta visión se caracteriza por la presencia de una primera fase bioquímica determinada por la presencia de estos agregados proteicos que pueden verse incrementados debido a alteraciones en el aclaramiento celular y la proteostasis, debidos a la edad y factores de riesgo genéticos. Durante esta fase, tendríamos una respuesta inflamatoria benigna destinada a mantener la homeostasis cerebral. Sin embargo, sería la respuesta celular aberrante de las células gliales y neuronales, resultante de la neuroinflamación crónica y la presencia de diferentes factores de riesgo genéticos, la responsable del desarrollo de la EA. De este modo, la fase clínica de la enfermedad tan solo se manifiesta cuando la respuesta celular es incapaz de mantener la homeostasis cerebral (De Strooper & Karran, 2016).

Las células de **microglía** son las células inmunitarias residentes del SNC, que se originan a partir de progenitores mieloides del saco vitelino fetal durante la embriogénesis temprana (Ginhoux et al., 2010). Durante el desarrollo y la neurogénesis, la microglía interacciona

estrechamente con las neuronas ayudando a conformar los patrones finales de los circuitos neuronales a través de la formación y poda sináptica. En el cerebro maduro, la microglía puede responder a cambios en la actividad sensorial e influir en la actividad neuronal (Wake et al., 2011). Las células de microglía se encuentran en constante movimiento, extendiendo y retrayendo sus ramificaciones, con el fin de vigilar activamente el parénquima cerebral. De esta manera, responden rápidamente a las agresiones patológicas (F. Leng & P. Edison, 2021).

Durante la respuesta inflamatoria, se induce la respuesta microglial. La microglía reactiva retrae sus procesos y migra hacia la zona de daño donde internaliza los elementos patógenos mediante pinocitosis, fagocitosis o endocitosis mediada por receptores, para su degradación. Por otro lado, liberan diversas moléculas tales como ROS, citoquinas como IL1 β , IL6, TNF α y quimioquinas, que constituyen componentes principales del proceso neuroinflamatorio (F. Leng & P. Edison, 2021). Lue y colaboradores, en su estudio publicado en 1996, fueron los primeros en reportar niveles más bajos de activación microglial en los cerebros de individuos resilientes en comparación con individuos con EA. Además, describieron que la reactividad microglial se correlacionaba más estrechamente con la pérdida de sinapsis que con los niveles de placas amiloides y NFTs (Lue et al., 1996). Durante la EA, las células de microglía migran hacia las zonas donde se deposita el A β , el cual es reconocido por múltiples receptores desencadenando la reactividad microglial (Yu & Ye, 2015). Los principales receptores a los que se une el A β son: 1) Receptores *scavengers*: receptor *scavenger* A-1 (SCARA-1), receptor de macrófagos con estructura colágena (MARCO), receptor *scavenger* B-1 (SCARB-1), receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE) y cluster de diferenciación 36 (CD36); 2) GPCRs: FPR2 y CMKLR1; 3) Receptores tipo Toll (TLR): TLR2, TLR4, TLR6, TLR9 y CD14; 4) Receptor desencadenante expresado en células mieloides (TREM): TREM2. La activación principalmente de los TLR activa la expresión de citoquinas proinflamatorias y la activación del inflammasoma, en concreto el NLRP3, el cual juega un papel importante en la liberación de la IL1 β y en la fisiopatología de la EA (Heneka et al., 2013; Ravichandran & Heneka, 2021). Por otro lado, el receptor TREM2 se considera un transductor de los efectos fisiológicos y patológicos de A β en la EA (Carmona et al., 2018). Las mutaciones en TREM2 reducen su afinidad por A β y se han relacionado con un mayor riesgo de desarrollar la EA (revisado en Carmona et al., 2018).

Normalmente, la activación microglial suele resolverse una vez eliminado el estímulo inmunitario. Sin embargo, la microglía en los cerebros envejecidos presenta deficiencias funcionales que pueden promover su reactividad sostenida. Por otro lado, múltiples factores de riesgo genético para la EA se relacionan con alteraciones funcionales de las células de microglía. La respuesta aberrante de la microglía durante la respuesta celular de la EA puede contribuir a la patogénesis de esta enfermedad (De Strooper & Karran, 2016).

Los **astrocitos** son el tipo de célula glial más abundante en el SNC (del 20% al 40% de todas las células gliales). Sus funciones principales son las de servir de soporte a la BHE y controlar su permeabilidad, mantener la homeostasis iónica en el SNC, proporcionar nutrientes a las neuronas, remodelar las sinapsis, regular el estrés oxidativo, secretar factores de crecimiento y reparar el tejido neuronal (Sofroniew, 2020). Los astrocitos desempeñan un papel activo en la formación de las sinapsis y en la sincronización e integración de los numerosos procesos sinápticos. Responden a la liberación de neurotransmisores y segregan activamente gliotransmisores tales como trifosfato de adenosina (ATP), glutamato y D-serina modulando

la actividad neuronal (Allen, 2014). De hecho, los astrocitos participan en la "sinapsis tripartita", proporcionando un tercer componente al clásico flujo "bipartito" entre neuronas pre y postsinápticas (Allen, 2014; Gittis & Brasier, 2015). También desempeñan un papel crucial durante la respuesta inflamatoria (Colombo & Farina, 2016; Sofroniew, 2020).

Durante la respuesta inflamatoria en la EA, la presencia de depósitos de A β y NFTs promueve la astrogliosis reactiva. La astrogliosis reactiva es una respuesta compleja y dinámica al daño cerebral (Burda & Sofroniew, 2014) caracterizada por hipertrofia de los astrocitos (engrosamiento de los procesos y el soma), su proliferación y el aumento de la expresión de los filamentos intermedios tales como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), la vimentina y la nestina. Este es un fenómeno temprano en la EA que aparece con anterioridad a los depósitos de A β , tanto en los modelos murinos de la EA (Heneka et al., 2005) como en los pacientes con EA (Carter et al., 2012). Los astrocitos producen una multitud de señales moleculares que pueden influir en muchos tipos diferentes de células neurales y no neurales, incluidas las células implicadas en las respuestas inmunitarias innatas, tales como ROS, citoquinas como IL1 β , IL6, TNF α y quimioquinas como CCL2 (Sofroniew, 2020).

Estrés oxidativo y disfunción mitocondrial

El estrés oxidativo está causado por un desequilibrio entre la producción y la acumulación de ROS. Aunque actúan como agentes de señalización, en cantidades excesivas actúan como agentes citotóxicos debido a su capacidad de oxidar las principales biomoléculas, tales como los ácidos nucleicos (DNA y RNA), las proteínas y los lípidos (Misrani et al., 2021). En los pacientes con EA, diferentes estudios han descrito la presencia de un desequilibrio oxidativo y un aumento de ROS y sus subproductos (revisado en Butterfield & Halliwell, 2019). En concreto, la peroxidación lipídica se encuentra incrementada en los pacientes con EA. Los niveles de los productos de peroxidación lipídica tales como los aldehídos reactivos se han encontrado incrementados en el hipocampo, el córtex piriforme y los eritrocitos de pacientes con la EA (revisado en Misrani et al., 2021).

Por otro lado, el estrés oxidativo contribuye a la disfunción mitocondrial (Swerdlow, 2011). Diversos estudios han documentado la disfunción mitocondrial a través del procesamiento anormal de ROS como un factor esencial en la patogénesis de la EA (revisado en Tobore, 2019), contribuyendo a las primeras etapas de la enfermedad y de los primeros síntomas clínicos. La disfunción mitocondrial presente en los pacientes con la EA incluye alteraciones en la biogénesis, los procesos de fisión y fusión mitocondrial, el transporte mitocondrial y la mitofagia (revisado en Misrani et al., 2021).

Hipótesis de la cascada mitocondrial

La hipótesis de la cascada mitocondrial fue propuesta por primera vez en el año 2004 por Swerdlow y Khan (Swerdlow et al., 2014; Swerdlow & Khan, 2004). Según esta hipótesis la pérdida de la función mitocondrial asociada a la edad y factores genéticos y ambientales afectan a la expresión y el procesamiento de APP iniciando la acumulación de A β , y promoviendo el desarrollo de la EA.

Disfunción del metabolismo de la glucosa

Los pacientes con DCL y con la EA presentan alteraciones en el metabolismo de la glucosa, principal fuente de energía del SNC (revisado en Butterfield & Halliwell, 2019). Diversos estudios identifican que el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial constituyen las principales causas de las alteraciones en el metabolismo de la glucosa (revisado en Butterfield & Halliwell, 2019). Por otro lado, la utilización celular de la glucosa está mediada por la señalización de la insulina, y los pacientes con DCL y EA presentan resistencia a la insulina (Arnold et al., 2018). De hecho, la diabetes tipo 2 (DMT2), uno de cuyos componentes clave es la resistencia a la insulina, es un importante factor de riesgo para el desarrollo de la EA (Arnold et al., 2018). Por este motivo, algunos autores han designado la EA como diabetes de tipo 3 (Kroner, 2009).

Las alteraciones del metabolismo de la glucosa están implicadas en la neurodegeneración mediada principalmente a través del aumento del ATP extracelular. El déficit energético celular altera la capacidad del retículo endoplásmico de evitar la agregación proteica, a través de la ubiquitinización y degradación proteica, promoviendo los depósitos de A β y tau. De este modo, el metabolismo de la glucosa es un mediador clave que promueve una disfunción metabólica, conduciendo a la agregación proteica, y, en consecuencia, la neurodegeneración (revisado en González et al., 2022).

Infección y alteración de la microbiota intestinal

Diferentes estudios han demostrado la presencia de diferentes componentes infecciosos tales como bacterias, hongos, protozoos y virus en muestras de pacientes con EA, así como una fuerte asociación positiva entre la infección y la EA (revisado en Ashraf et al., 2019). Los principales patógenos incluyen bacterias tales como *Chlamydophila pneumoniae*, *Borrelia burgdorferi*, *Treponema pallidum*, *Helicobacter pylori*; virus, principalmente el virus del herpes simple tipo 1 (VHS-1) y hongos tales como *Alternaria*, *Botrytis*, *Candida*, *Cladosporium* y *Malassezia* (revisado en Ashraf et al., 2019).

Por otro lado, varios estudios han establecido una correlación positiva entre la EA y las alteraciones en la microbiota intestinal (revisado en Kowalski & Mulak, 2019). Existe una comunicación bidireccional entre el SNC y el intestino a través del eje intestino-cerebro, de modo que los agentes citotóxicos producidos como consecuencia de la alteración de la microflora intestinal pueden atravesar la BHE y depositarse en el SNC, provocando la generación de ROS, neuroinflamación y neurodegeneración (MahmoudianDehkordi et al., 2019). Por otra parte, la disbiosis del microbioma intestinal provoca inflamación sistémica, neuroinflamación y resistencia a la insulina, que contribuyen a la patogénesis de la EA (Zhang et al., 2018). Estudios recientes donde se comparó la composición de la microbiota intestinal de pacientes con EA y controles sanos, se detectó una menor abundancia de *Firmicutes* y *Bifidobacterium*, y una mayor abundancia de *Bacteroidetes* en los pacientes con EA en comparación con los controles sanos (Vogt et al., 2017). Además, la abundancia bacteriana relativa se correlacionó con el aumento de A β y tau en el LCR de pacientes con la EA (Vogt et al., 2017).

Hipótesis infecciosa

La hipótesis infecciosa de la EA considera que esta enfermedad es causada o exacerbada por infecciones o microbios comensales, siendo responsables de la activación de la respuesta inflamatoria y la agregación de A β y tau. Esta hipótesis se basa en la función del A β como péptido antimicrobiano y se sustenta en la presencia de ciertos agentes infecciosos en el SNC de pacientes con la EA, así como en las alteraciones de la microbiota intestinal en estos pacientes (Seaks & Wilcock, 2020; Vojtechova et al., 2022; Whitson et al., 2022).

Alteraciones neurovasculares

La presencia de alteraciones neurovasculares constituye otra de las características fisiopatológicas presentes en los pacientes con la EA (Zlokovic, 2011). Los ratones que expresan el principal factor de riesgo genético de la EA, la APOE ϵ 4 humana, presentan alteraciones en la BHE que también se observa en humanos portadores de APOE ϵ 4 (Bell et al., 2012). Por otro lado, la degeneración de pericitos o células musculares lisas vasculares bajo estrés hipóxico conducen a la neurodegeneración y a problemas en la eliminación de A β (Winkler et al., 2014), lo que sugiere que la aterosclerosis y la hipoperfusión del cerebro podrían ser una causa previa en un subgrupo de pacientes con EA. Además, los factores de riesgo genéticos de la EA tales como APOE ϵ 4, proteína de ensamblaje de clatrina de unión a fosfatidilinositol (PICALM) y la apolipoproteína J (APOJ) afectan a la capacidad de aclaramiento de A β en humanos (Verghese et al., 2013; Zhao et al., 2015), debido a alteraciones en el flujo de la circulación perivascular y del sistema linfático del cerebro (Tarasoff-Conway et al., 2015).

Hipótesis vascular

La hipótesis vascular propone que el daño vascular inicial juega un papel clave en el desarrollo de la EA (Scheffer et al., 2021). Los factores de riesgo vasculares, tales como la hipertensión y la diabetes causan hipoperfusión cerebral crónica (HCC), isquemia y/o hipoxia, promoviendo el estrés oxidativo y neuroinflamación, que de forma crónica favorecen la deposición de A β y tau. Además, la ruptura de la integridad de la unidad neurovascular da lugar a la acumulación cerebral de proteínas séricas neurotóxicas, inflamación y disfunción vascular y sináptica que contribuyen a defectos en el metabolismo y la eliminación de A β y tau (Zlokovic, 2011). A su vez, A β y tau se depositan en los vasos sanguíneos y en el espacio perivascular (Merlini, 2017), conduciendo a cambios morfológicos y a la disfunción vascular (Greenberg et al., 2004). De este modo, la coexistencia de la EA y la patología vascular aumenta considerablemente el riesgo de demencia (Attems & Jellinger, 2014).

Disfunción sináptica

La disfunción y pérdida sináptica constituye otra de las características fisiopatológicas de la EA (revisado en Arendt, 2009; Tzioras et al., 2023). La pérdida sináptica está estrechamente relacionada con el deterioro cognitivo tanto en humanos como en modelos animales de EA (revisado en Tzioras et al., 2023). Diversos estudios demuestran que el deterioro cognitivo

presente en los pacientes con EA se correlaciona mejor con las alteraciones sinápticas que con el número de placas amiloides y NFTs, el grado de pérdida neuronal o la reactividad glial (Masliah, 1995; Terry et al., 1991). Además, diferentes líneas de evidencia sitúan las alteraciones de la función sináptica y su degeneración en las fases más tempranas de la EA, antes de la acumulación de agregados de A β y tau y de la pérdida neuronal (Lleó et al., 2019; Masliah et al., 2001; Selkoe, 2002). La evidencia científica sitúa a las formas solubles de A β y tau como los principales agentes tóxicos responsables de las alteraciones sinápticas presentes en los pacientes con EA (revisado en Arendt, 2009; Tzioras et al., 2023). Por otro lado, el fenotipo alterado en las células gliales podría estar también implicado en la pérdida sináptica como consecuencia de una fagocitosis excesiva de las mismas (revisado en Tzioras et al., 2023).

Las anomalías sinápticas pueden alterar el equilibrio entre excitación e inhibición en circuitos vulnerables a la patología de la EA dando lugar a la hiperexcitabilidad y crisis epilépticas y al deterioro cognitivo presente en estos pacientes (Bi et al., 2020; Scaduto et al., 2022). Los estudios realizados por Palop y Mucke demostraron cómo el estrés provocado por los oligómeros de A β es en parte responsable de la hiperexcitabilidad neuronal (Palop & Mucke, 2010). Mientras que, el aumento de la actividad neuronal puede incrementar la producción de A β y tau acelerando así la progresión de la patología (Cirrito et al., 2005; Yamada et al., 2014), convirtiéndose en un círculo vicioso.

Neurodegeneración y atrofia cerebral

Otras de las principales características fisiopatológicas de la EA son la presencia de neurodegeneración y atrofia celular. Las principales regiones que sufren pérdida neuronal en la EA son: el hipocampo, la corteza entorrinal, el núcleo basal de Meynert (NbM) y el *locus coeruleus* (LC) (Arendt et al., 2015). Además, también se ha descrito daño neuronal en otras regiones cerebrales tales como la amígdala, la sustancia negra (SN), el bulbo olfatorio anterior y los núcleos del rafe. Hasta la fecha, se creía que la corteza transentorrinal y entorrinal eran las primeras áreas en sufrir neurodegeneración y desde donde la patología se extendía hacia otras áreas cerebrales. Sin embargo, este concepto ha sido cuestionado recientemente sugiriendo un posible origen de la neurodegeneración en los núcleos subcorticales no talámicos que dan lugar a inervación cortical, como NbM y el LC (revisado en Arendt et al., 2015).

El NbM es la principal fuente de neuronas colinérgicas que inervan la corteza cerebral. La pérdida neuronal de este núcleo parece afectar a la concentración del neurotransmisor acetilcolina (ACh). Las funciones del sistema colinérgico incluyen la atención, el aprendizaje, la memoria, la respuesta al estrés, el ciclo vigilia/sueño y la información sensorial. Estas tareas se ven afectadas en la EA, en parte, debido a la alteración colinérgica (Zarow et al., 2003). En la EA, el transporte de colina, la liberación de ACh y la expresión de los receptores nicotínicos y muscarínicos se encuentran alterados. El déficit de inervación colinérgica podría estar causado por la presencia de NFTs (Mesulam, 2013), y por agregados de A β (Beach et al., 2000; Potter et al., 2011) en el NbM. Mientras que la deficiencia de ACh se correlaciona con los acúmulos de A β , la hiperfosforilación de tau y la disfunción cognitiva en la EA (Ferreira-Vieira et al., 2016). De este modo, la alteración del sistema colinérgico parece ser clave en la patología de la EA.

Hipótesis colinérgica

La hipótesis colinérgica se describió por primera vez hace más de 20 años y sugiere que una disfunción de las neuronas colinérgicas contribuye sustancialmente al deterioro cognitivo observado en las personas de edad avanzada y en la EA (Francis et al., 1999). Esta premisa ha servido de base para el desarrollo de fármacos para la EA hasta la fecha (Ferreira-Vieira et al., 2016). Sin embargo, estudios recientes no han reportado cambios o incluso incrementos en la actividad de la colina acetiltransferasa y/o la acetilcolinesterasa en cerebros de pacientes con EA en fases iniciales, lo que ha llevado a cuestionar la validez de la hipótesis, así como la justificación del uso de colinomiméticos para tratar el trastorno, sobre todo en las fases iniciales (revisado en Terry & Buccafusco, 2003).

Por otro lado, desde los años 80 la evidencia anatómica de la reducción de las neuronas del LC en los pacientes con EA se ha asociado con una alteración de los niveles de noradrenalina (NA), lo que parece contribuir a la fisiopatología de la EA (revisado en Beardmore et al., 2021). Sin embargo, la neurodegeneración del LC ha sido un rasgo característico de la EA infravalorado. Hoy en día, la comprensión de la degeneración del LC se está volviendo crucial a medida que aumentan las evidencias que relacionan la degeneración noradrenérgica con la EA como profundizaremos en el apartado 3.4.

Hipótesis noradrenérgica

En 1987 se relacionó por primera vez la hipótesis noradrenérgica con la EA (Bondareff et al., 1987). Según esta hipótesis la degeneración del LC exacerba la respuesta inflamatoria que provoca la liberación de citoquinas y activación glial e induce la acumulación de A β y tau (Ross et al., 2015). Esta hipótesis no sería excluyente sino complementaria a las hipótesis mencionadas con anterioridad. La disfunción del sistema noradrenérgico representaría un papel central, contribuyendo a la neuroinflamación crónica y a la respuesta celular aberrante y pérdida de homeostasia cerebral, promoviendo la progresión hacia la EA.

Por otro lado, la atrofia cerebral, disminución del peso y volumen cerebral, ocurre como consecuencia de la esta pérdida celular, y se acompaña de un ensanchamiento de los surcos, la reducción de los giros y el agrandamiento de los ventrículos. Las regiones cerebrales mayormente afectadas en la EA son: el neocórtex, el hipocampo y el sistema límbico (revisado en Pini et al., 2016). Recientemente, los estudios neuropatológicos y de neuroimagen han identificado sistemáticamente 4 subtipos de EA basados en la atrofia cerebral regional y la distribución de la patología de tau: la EA típica, la EA con predominio límbico, la EA con preservación del hipocampo y la EA de atrofia mínima (Figura 10) (Ferreira et al., 2020).

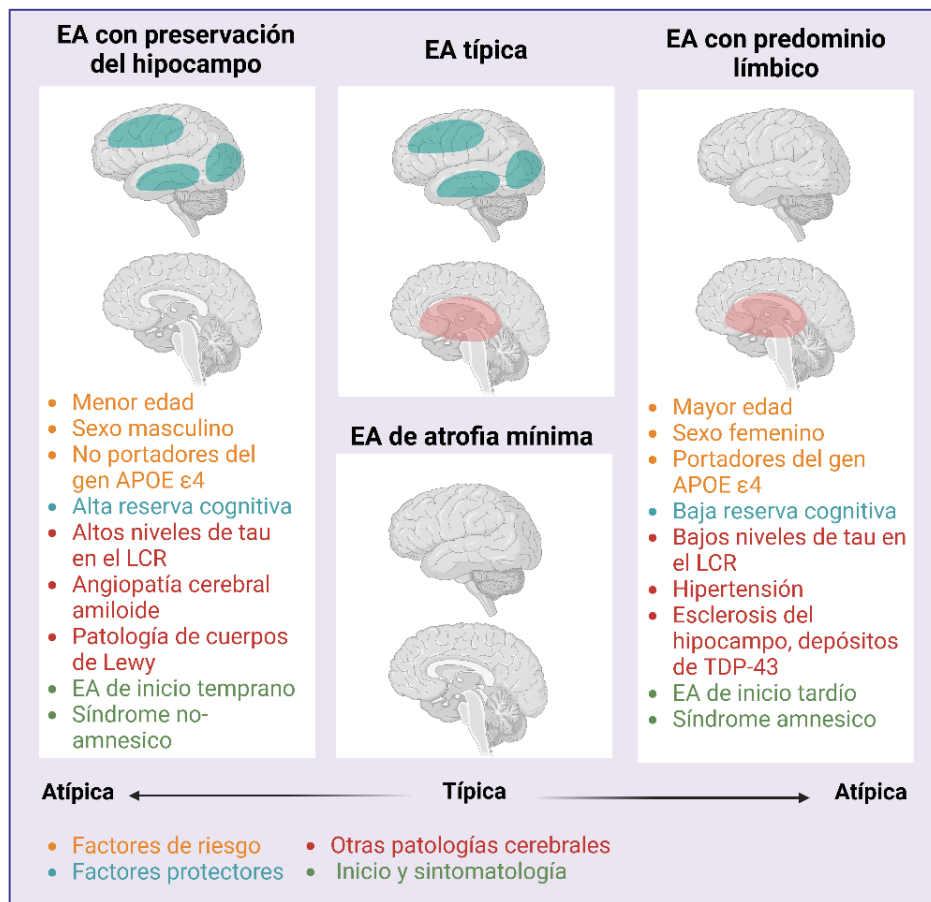


Figura 10. Subtipos de la enfermedad de Alzheimer (EA). Figura adaptada (Ferreira et al., 2020). LCR: líquido cefalorraquídeo.

3.1.8 Diagnóstico y tratamiento

Diagnóstico y biomarcadores

En el año 1984, el *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS-ADRDA) definió los criterios para el diagnóstico clínico de la EA (McKhann et al., 1984). En los criterios NINCDS-ADRDA el diagnóstico de la EA se limitaba a un diagnóstico clínico donde se evaluaba el estadio de demencia. Definen la EA como un síndrome clínico caracterizado por un deterioro cognitivo progresivo sustancial, que afecta a varios dominios, o síntomas neuroconductuales lo suficientemente graves como para interferir en las actividades de la vida cotidiana, conllevando la pérdida de la independencia del individuo. El diagnóstico definitivo de EA tan solo se establecía tras la confirmación histopatológica post mortem del diagnóstico clínico.

Desde la publicación de los criterios NINCDS-ADRDA, se han realizado grandes progresos en la identificación de los cambios estructurales y moleculares asociados a la EA en el cerebro, así como sus huellas bioquímicas. Grupos pertenecientes al *National Institute on Aging* y la *Alzheimer's Association* revisaron los criterios de la NINCDS-ADRDA con el fin de incluir biomarcadores biológicos en el diagnóstico de la EA (Dubois et al., 2010; Dubois et al., 2007; McKhann et al., 2011).

En la actualidad, el diagnóstico de la EA depende principalmente de la determinación de biomarcadores biológicos a través del uso de la tomografía por emisión de positrones (PET) de moléculas trazadoras y del análisis de las proteínas del LCR (Scheltens et al., 2021). Jack y colaboradores agruparon los biomarcadores en: A ($A\beta$), T (tau fosforilada) y N (neurodegeneración), conocido como el marco ATN (Jack et al., 2018). Los biomarcadores A constituyen la unión del ligando PET de amiloide cortical o unos niveles bajos de $A\beta_{42}$ en el LCR. Los biomarcadores T constituyen la elevación de tau fosforilada en LCR y la unión del ligando PET de tau cortical. Finalmente, los biomarcadores N incluyen los niveles de tau total en el LCR, el hipometabolismo cerebral medido mediante PET con 18F-fluorodeoxiglucosa (FDG-PET) y la atrofia cerebral medida mediante resonancia magnética (RM) (revisado en Jack et al., 2018).

Tratamientos no farmacológicos

Los cambios en el estilo de vida pueden reducir hasta un 40% el desarrollo de la EA. Hasta la fecha se han completado tres grandes ensayos de intervención multidominio en los estilos de vida de pacientes con EA (FINGER, MAPT y PreDIVA) (Kivipelto et al., 2018). El estudio finlandés de intervención geriátrica para prevenir el deterioro cognitivo y la discapacidad, conocido como modelo FINGER, combinó nutrición, ejercicio físico, entrenamiento cognitivo y actividades sociales, así como la gestión del riesgo vascular y metabólico. Este ensayo mostró beneficios sobre la cognición, incluso en personas con susceptibilidad genética a la EA (Ngandu et al., 2015). En el año 2019, la OMS publicó las primeras directrices para la reducción del riesgo de deterioro cognitivo y demencia (Risk Reduction of Cognitive Decline and Dementia: WHO Guidelines, "WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee," 2019). En 2020, más de 25 países se unieron a la red mundial FINGERS, cuyo objetivo es adaptar, probar y optimizar el modelo FINGER en distintas zonas geográficas (revisado en Scheltens et al., 2021).

Tratamientos farmacológicos

En la actualidad, la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA) ha aprobado seis fármacos para el tratamiento de la EA (Tabla 1). Cinco de estos fármacos, a saber, donepezilo, rivastigmina, galantamina, memantina y memantina combinada con donepezilo, tratan temporalmente los síntomas de la EA, pero no modifican los cambios cerebrales subyacentes de la enfermedad ni el curso de esta. El sexto fármaco, el aducanumab, fue aprobado por la FDA en junio de 2021 y es el primer medicamento aprobado cuyo mecanismo de acción aborda la fisiopatología subyacente de la EA en lugar de los síntomas.

Tabla 1. Fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Fármaco	Mecanismo de acción	Efecto
<i>Donecepilo</i>	Inhibidor de la colinesterasa	Aumento de la acetilcolina
<i>Rivastigmina</i>	Inhibidor de la colinesterasa	Aumento de la acetilcolina
<i>Galantamina</i>	Inhibidor de la colinesterasa	Aumento de la acetilcolina
<i>Memantina</i>	Agonista no competitivo de los NMDAR	Disminución de las acciones del glutamato
<i>Memantina + Donecepilo</i>	Inhibidor de la colinesterasa + Agonista no competitivo de los NMDAR	Aumento de la acetilcolina + disminución de las acciones del glutamato
<i>Aducanumab</i>	Anticuerpo monoclonal anti-amiloide	Disminución de los depósitos de amiloide

El aducanumab actúa reduciendo las placas de A β en el SNC, pero no constituye una cura para la EA, ni es adecuado para todos los pacientes. El fármaco se estudió en personas con DCL o demencia leve debida a la EA con acumulación de A β en el SNC. A diferencia de los otros fármacos aprobados, el aducanumab se asocia con un mayor riesgo de sufrir afecciones graves tales como edemas y hemorragias, que puede ser un indicador de neuroinflamación, por lo que presenta unos mayores efectos secundarios. Por otro lado, es importante señalar que el aducanumab se aprobó mediante un proceso denominado vía de aprobación acelerada, que se emplea en fármacos destinados a tratar patologías graves para las que no existe tratamiento. Esta vía exige que se verifique el beneficio clínico del medicamento en un ensayo posterior a la aprobación, por lo que el beneficio clínico del aducanumab todavía no está del todo descrito. Por ello, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) no ha admitido todavía este fármaco en Europa.

Ensayos clínicos

En el año 2022, se registraron 143 compuestos clínicos en 172 ensayos clínicos para la EA (registrados en clinicaltrials.gov a fecha de 25 de junio de 2022). La [Figura 11](#) agrupa los compuestos clínicos según su acción (potenciadores cognitivos, tratamiento de los síntomas neuropsiquiátricos o modificadores de la enfermedad), fase del ensayo clínico y mecanismo de acción. Del total de los compuestos en ensayos clínicos, 31 fármacos se encuentran en 47 ensayos clínicos de fase 3, 82 fármacos en 94 ensayos clínicos de fase 2 y 30 fármacos en 31 ensayos clínicos de fase 1 (revisado en Cummings et al., 2022). Los compuestos modificadores de la enfermedad actúan sobre la fisiopatología de la EA tratando de ofrecer un efecto neuroprotector y constituyen el 68% del total de los fármacos en fase clínica 3. Dentro de estos, el 29% actúan sobre A β , el 19% sobre la plasticidad sináptica/neuroprotección, el 14% sobre el estrés oxidativo y otro 14% sobre el metabolismo/bioenergética. El resto de los mecanismos de acción, tales como inflamación/inmunidad, tau, vasculatura, eje intestino-

cerebro y la proteostasis/proteinopatías constituyen un 5% cada uno del total de los fármacos en fase 3 (Figura 12).

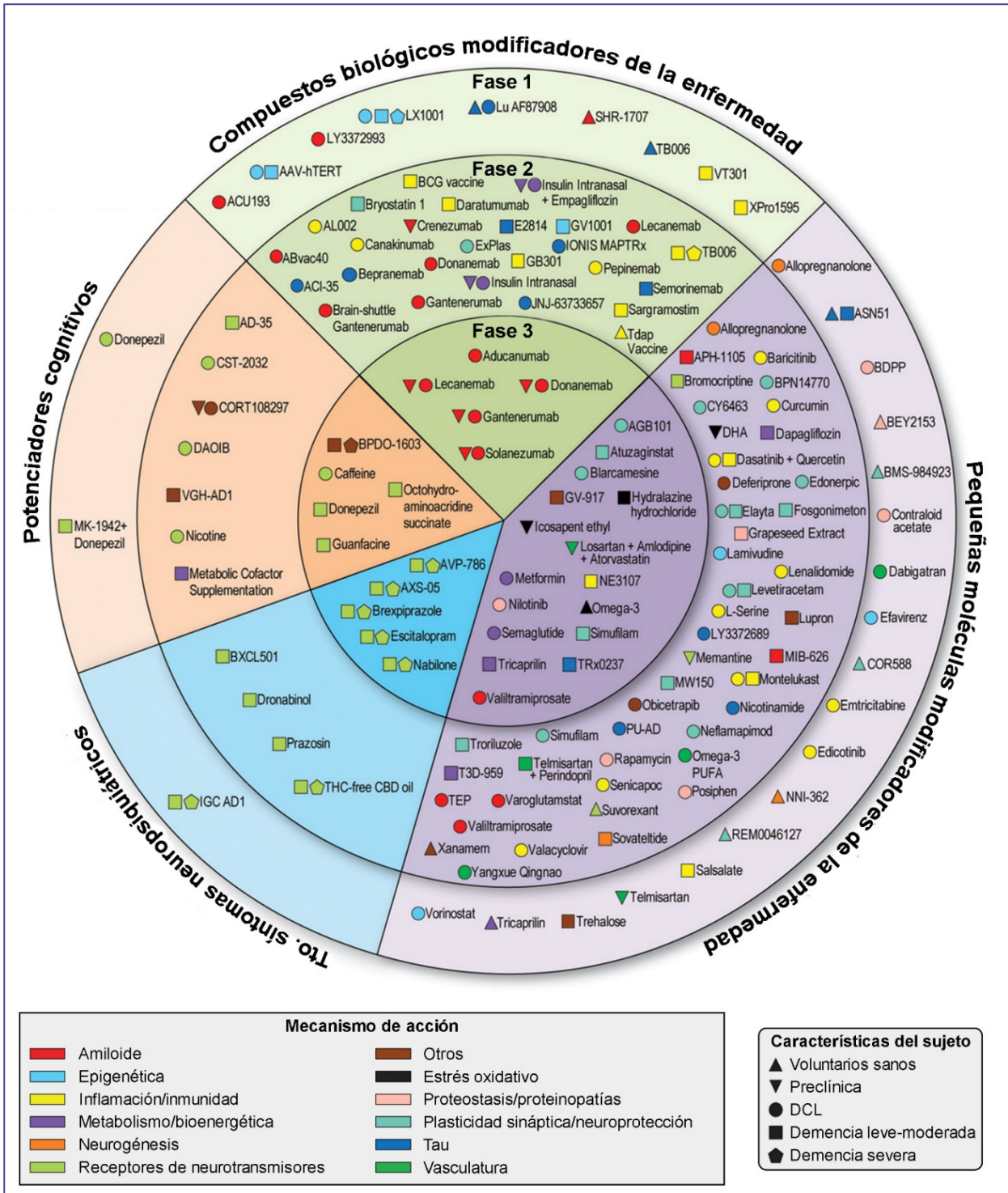


Figura 11. Compuestos en ensayos clínicos para la enfermedad de Alzheimer (registrados en clinicaltrials.gov a fecha de 25 de junio de 2022). Figura adaptada de (Cummings et al., 2022). El nombre de los compuestos aparece en lengua inglesa.

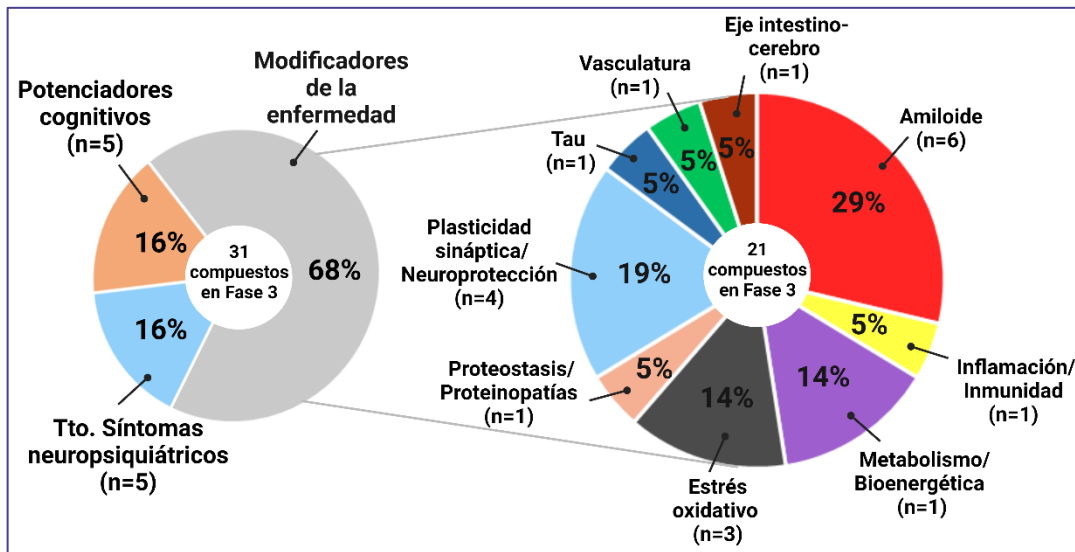


Figura 12. Mecanismos de acción de los compuestos clínicos en fase 3 para el tratamiento de la EA. Figura adaptada de (Cummings et al., 2022).

Debido a la neurodegeneración temprana del LC, principal fuente de noradrenalina (NA) en el SNC, que tiene lugar en la EA, se han empezado a considerar como agentes clínicos fármacos que actúan sobre el sistema noradrenérgico (véase apartado 3.4). Estos fármacos se utilizan para el tratamiento de otras enfermedades mentales y pueden actuar como potenciadores cognitivos, tratar algunos de los síntomas neuropsiquiátricos y, además, podrían actuar como modificadores de la enfermedad como consecuencia de los efectos de la NA en el SNC (revisado en David & Malhotra, 2022)

3.2 NORADRENALINA

La **noradrenalina (NA)**, también conocida como norepinefrina (NE), es una molécula endógena perteneciente al grupo de las catecolaminas junto con la adrenalina y la dopamina. Su estructura química consiste en un benceno con dos hidroxilos (que forman un grupo catecol) y una amina en la cadena lateral (Figura 13).

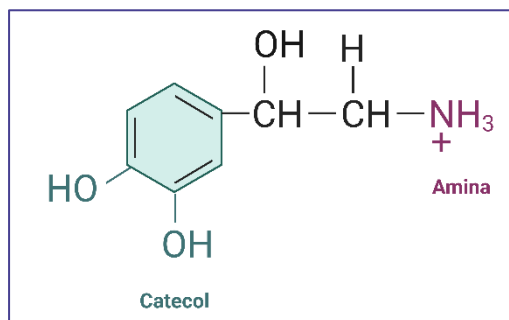


Figura 13. Estructura química de la noradrenalina (NA).

3.2.1 Historia

Fue el fisiólogo y farmacólogo sueco Ulf Svante von Euler quién demostró en el año 1945 que el neurotransmisor llamado hasta entonces "simpatina" era un derivado no metilado de la adrenalina (V. Euler, 1945). Tras su descubrimiento, Ulf von Euler centró el resto de sus años en el estudio de esta molécula. Estudió su papel como neurotransmisor (Von Euler, 1946), su almacenamiento en las vesículas sinápticas de las terminales nerviosas, su distribución, su excreción y su concentración en condiciones fisiológicas y patológicas. En 1948 fue capaz de aislarla (Von Euler, 1948) y tres años más tarde, en 1951, describió el sistema noradrenérgico (Von Euler, 1951). Publicó que la NA es liberada por los nervios simpáticos inervando diferentes tejidos y el cerebro, siendo el principal mediador nervioso adrenérgico en los mamíferos (Von Euler, 1951). En 1954, se encontró NA en el SNC (Vogt, 1954) y las investigaciones sobre el papel de este neurotransmisor continúan en la actualidad.

3.2.2 Sistema Noradrenérgico

La NA puede ser liberada tanto a nivel periférico, donde actúa como una hormona, como a nivel central, actuando como un neurotransmisor y neuromodulador del SNC. Es por ello, por lo que la NA juega un papel muy importante en el mantenimiento de múltiples funciones en el organismo (véase apartado 3.2.3).

Sistema noradrenérgico periférico

El sistema nervioso simpático (SNS) y las células cromafines neuroendocrinas, situadas en la médula adrenal o suprarrenal, son los principales responsables de la síntesis y liberación de la NA y otras catecolaminas a la circulación sanguínea, actuando como hormonas (Figura 14).

Además, ciertas células del sistema inmune también presentan la capacidad de sintetizar y liberar NA (Scanzano & Cosentino, 2015).

Las glándulas suprarrenales están situadas encima de cada riñón, y presentan dos áreas especializadas: la corteza suprarrenal es la responsable de la síntesis de mineralocorticoides, glucocorticoides y andrógenos; mientras que la médula suprarrenal, perteneciente al sistema nervioso autónomo (SNA), conforma la parte interna de estas glándulas y es responsable de la liberación de adrenalina (80%), NA (20%) y dopamina (<1%). El SNS, a través de las fibras preganglionares, estimula las células cromafines de la médula suprarrenal induciendo la liberación de NA.

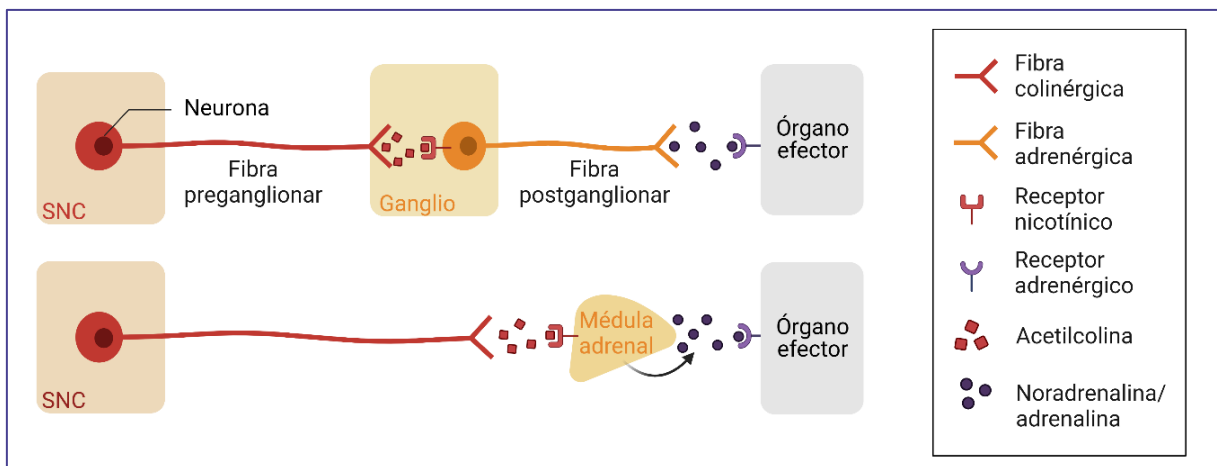


Figura 14. Sistema noradrenérgico periférico. El sistema nervioso simpático sintetiza y libera la NA a través de las fibras postganglionares y de la médula adrenal o suprarrenal. La NA actúa como hormona actuando sobre diversos órganos efectores.

Sistema noradrenérgico central

El sistema noradrenérgico central está compuesto por varios cuerpos celulares pequeños que se encuentran en el tronco cerebral y por proyecciones neuronales en todo el SNC. Las neuronas noradrenérgicas están organizadas en el SNC en siete grupos celulares etiquetados de A1 a A7. Los grupos A1, A2, A3, A5 y A7 conforman los grupos medulares y pontinos (Dahlström & Fuxe, 1964), mientras que el grupo A6 representa el *Locus Coeruleus* (LC), situado en la protuberancia rostral bajo el cuarto ventrículo.

El LC es el principal núcleo noradrenérgico, ya que contiene casi el 50% de las neuronas noradrenérgicas. El nombre LC significa mancha azul en latín debido a su aspecto azulado, por lo que puede verse sin necesidad de una tinción específica. Este color se debe a la acumulación de neuromelanina (NM) en los cuerpos de las células nerviosas noradrenérgicas. Dentro del LC se distinguen dos tipos celulares: células multipolares grandes en el LC ventral, y células fusiformes más pequeñas en el LC dorsal. La localización de las neuronas dentro del LC varía en función de hacia dónde se extienden sus proyecciones (Loughlin et al., 1986).

Las **proyecciones eferentes** del sistema noradrenérgico se dividen en dos grupos:

- La *vía noradrenérgica dorsal*. Las neuronas del LC inervan principalmente el hipotálamo, el septo, varios núcleos del cerebro medio, el tálamo, el hipotálamo, la amígdala, el hipocampo y el neocórtex. El LC también se proyecta al cerebelo y a algunos núcleos del tronco cerebral y de la médula espinal. La mayor densidad de terminales nerviosas noradrenérgicas se da en la corteza cerebral, concretamente en el neocórtex, donde los axones noradrenérgicos se distribuyen por todas las regiones y capas (Figura 15).

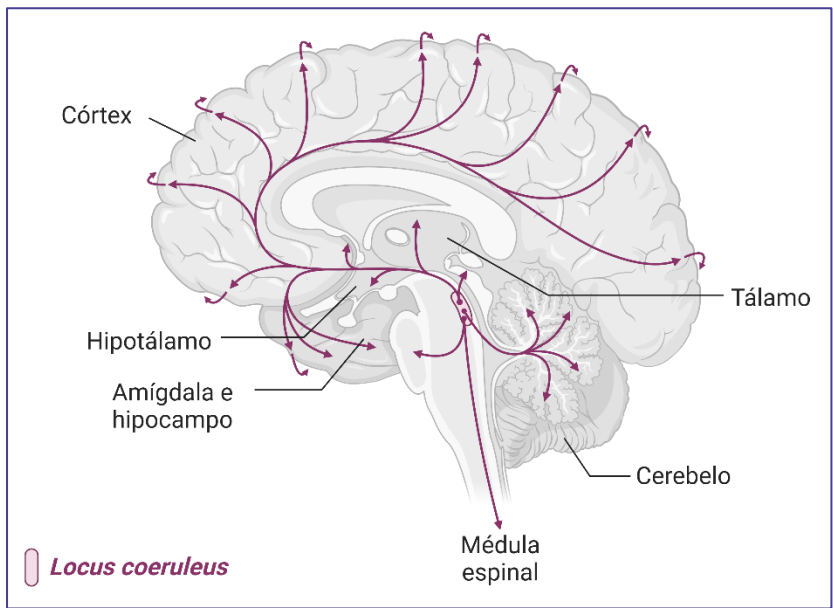


Figura 15. Proyecciones de la vía noradrenérgica dorsal.

- La *vía noradrenérgica ventral*. Las proyecciones axonales noradrenérgicas de esta vía se originan en los grupos medulares (A1 y A2), y pontinos (A5 y A7). Estas neuronas inervan el cerebro medio, en particular el hipotálamo y la amígdala, el hipocampo y el neocórtex. Las fibras descendientes llegan a los centros medulares y a varios núcleos de la médula espinal.

Las **proyecciones aferentes** del LC provienen de diferentes localizaciones, recibiendo diferentes tipos de información (Uematsu et al., 2015). El LC recibe información visceral y simpática, información emocional, homeostática y cognitiva, e información neuromoduladora (Figura 16).

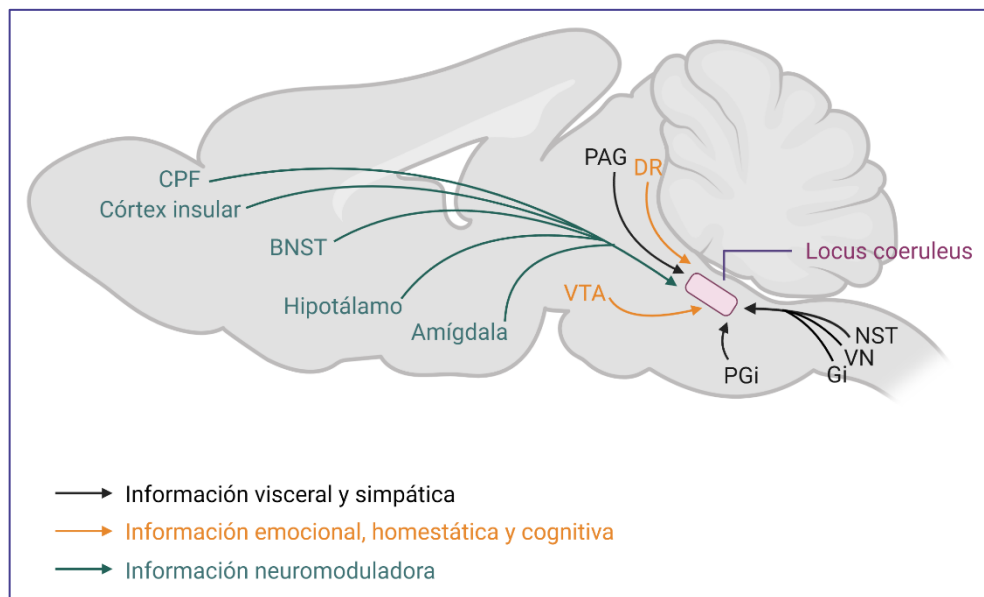


Figura 16. Proyecciones aferentes del Locus coeruleus (LC) en el cerebro de ratón. Figura adaptada de (Uematsu et al., 2015). BNST: núcleo del lecho de la estría terminal, CPF: corteza prefrontal, DR: Núcleo dorsal del Rafe, Gi: Núcleo gigantocelular, NST: Núcleo del tracto solitario, PAG: Sustancia gris periacueductal, PGI: Núcleo paragigantocelular, VN: Núcleo vestibular.

Biosíntesis de la noradrenalina

Los neurotransmisores pertenecientes al grupo de las catecolaminas derivan del aminoácido L-tirosina. La L-tirosina es transportada a través de la BHE por el transportador de aminoácidos neutros (LAT) al espacio extracelular del SNC. A continuación, este aminoácido es captado por las células que necesitan sintetizar NA mediante un transportador de tirosina especializado en el citosol. En primer lugar, la L-tirosina se transforma en ácido L-dihidroxifenilacético (L-DOPA) mediante la tirosina hidroxilasa (TH). La TH es una enzima citosólica cuya actividad es inhibida por una concentración excesiva de catecolaminas, de modo que es la etapa limitante de la reacción (Daubner et al., 2011). En segundo lugar, la L-DOPA se descarboxila en dopamina (DA) a través de la dopamina descarboxilasa (DC). Una vez sintetizada la DA en el citosol, es transportada a las vesículas sinápticas de los terminales nerviosos a través del transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2), un transportador específico de aminas (Eiden et al., 2004). Las neuronas noradrenérgicas expresan la enzima dopamina β -hidroxilasa (DBH), que hidroxila la DA formando la NA dentro de las vesículas secretoras que se encuentran unidas a la membrana (Goldstein et al., 1972). La NA puede transformarse en su forma metilada, la adrenalina, a través de la acción de la feniletanolamina N-metiltransferasa. Esta enzima se encuentra principalmente en las neuronas adrenérgicas de la médula suprarrenal (Goldstein et al., 1972). Sin embargo, en el SNC sólo se encuentra en grupos muy pequeños de células, por lo que la adrenalina es poco abundante (Kitahama et al., 1985). En la [Figura 17](#) se resume la ruta de biosíntesis de la NA.

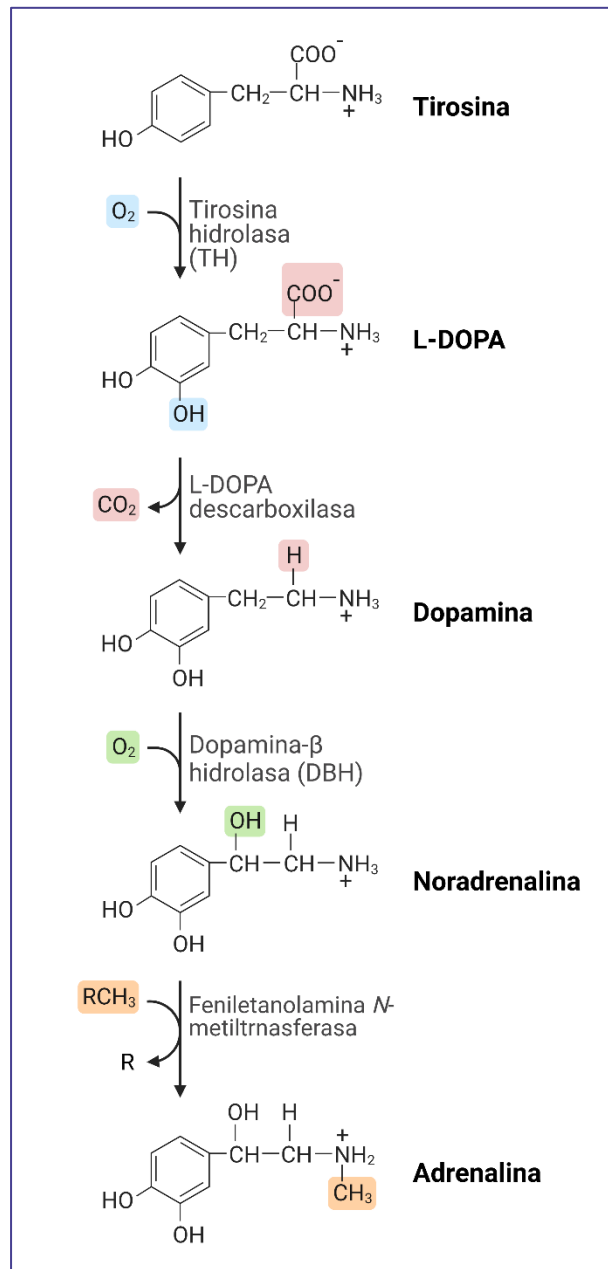


Figura 17. Biosíntesis de la noradrenalina (NA).

Liberación de la noradrenalina

Las neuronas noradrenérgicas presentan dos modos de liberación de la NA. Esta puede liberarse en la hendidura sináptica actuando como neurotransmisor o de manera extrasináptica a través de las varicosidades, actuando como neuromodulador (Figura 18). Estas varicosidades son ampliaciones en el extremo de las fibras nerviosas que funcionan como terminales presinápticas (Geffen & Livett, 1971). La liberación de la NA a través de las varicosidades permite su liberación al espacio extracelular difundiéndose a los receptores cercanos. Este proceso de transmisión por volumen permite la activación de los receptores en un campo amplio, promoviendo respuestas coordinadas de muchas células dentro de una

zona de difusión determinada (Agnati et al., 1995). La liberación extrasináptica de la NA media efectos paracrinós en neuronas, células gliales (microglía, astrocitos y oligodendrocitos) y microvasculatura cerebral, controlando de este modo el comportamiento de estas células. Como resultado, la señalización noradrenérgica actúa como un regulador global de la actividad cerebral (O'Donnell et al., 2012).

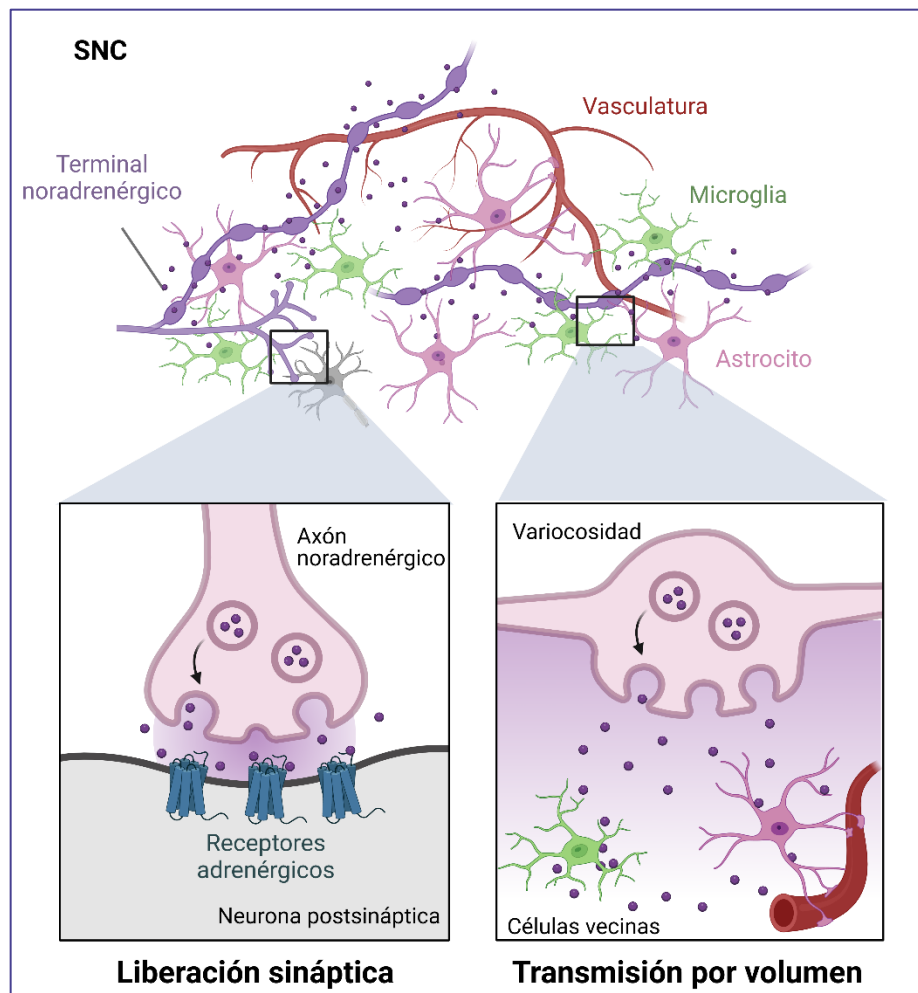


Figura 18. Modos de liberación de la noradrenalina en el sistema nervioso central (SNC).

Por otro lado, las neuronas noradrenérgicas pueden liberar cotransmisores que modulan las acciones de la NA, tales como ATP, el neuropéptido Y, el glutamato, la encefalina y la galanina (Svensson et al., 2018).

Receptores Adrenérgicos

Una vez liberada, la NA ejerce sus acciones a través de la unión a sus receptores adrenérgicos o adrenoreceptores. Los receptores adrenérgicos son proteínas con siete dominios transmembrana α -helicoidales, un extremo N extracelular y un extremo C intracelular, pertenecientes a la familia de los GPCRs (Strosberg, 1993). Existen tres tipos principales de receptores adrenérgicos: α 1, α 2 y β . A su vez, los receptores α 1 adrenérgicos incluyen los subtipos α 1A, α 1B y α 1D, los receptores α 2 adrenérgicos comprenden los subtipos α 2A, α 2B y α 2C. Finalmente, los receptores β adrenérgicos constan de los subtipos β 1, β 2 y β 3.

Los *receptores α 1 adrenérgicos*, se encuentran generalmente acoplados a la proteína Gq. De modo que, la activación de este tipo de receptor conduce a la activación de la fosfolipasa C (PLC), que cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2), aumentando la formación de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). Como resultado, se movilizan las reservas intracelulares de Ca^{+2} , lo que conduce a la activación de la proteína quinasa C (PKC). La PKC participa en una amplia variedad de cascadas de transducción de señales intracelulares a través de la fosforilación de diferentes proteínas. La estimulación de los receptores α 1 adrenérgicos conduce a una respuesta excitatoria postsináptica.

Los *receptores α 2 adrenérgicos* activan las proteínas Gi/o que inhiben la adenilato ciclasa (AC) y estimulan la fosfolipasa A2, disminuyendo el AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) y activando los canales iónicos de K^+ . La entrada de K^+ al interior celular lleva a una despolarización de la membrana y a la inhibición del potencial de acción en la neurona postsináptica. Además, los receptores α 2 adrenérgicos también se localizan a nivel presináptico donde inhiben la liberación de la NA debido a la disminución de los niveles de Ca^{+2} intracelular, y son responsables de modular la recaptación de la NA desde la hendidura sináptica.

Los *receptores β adrenérgicos*, estimulan a las proteínas Gs que activan la AC, generando AMPc como segundo mensajero, lo que activa la proteína quinasa A (PKA). La PKA está implicada en la activación de diferentes rutas celulares a través de la fosforilación de proteínas. Una de las más relevantes es la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB). La PKA fosforila la CREB a dando lugar a su forma activa, p-CREB, la cual se traslada al núcleo, donde regula los genes relacionados con el crecimiento, la supervivencia, la plasticidad sináptica y la neuroprotección. La PKA también fosforila a diferentes enzimas que juegan un papel importante en el metabolismo celular, como la acetil-CoA carboxilasa, la glucógeno fosforilasa (inhibiendo la glucogenólisis) y la glucógeno sintasa (inhibiendo la glucogénesis), entre otras proteínas.

En la [Figura 19](#) se resumen las vías de señalización de los receptores adrenérgicos.

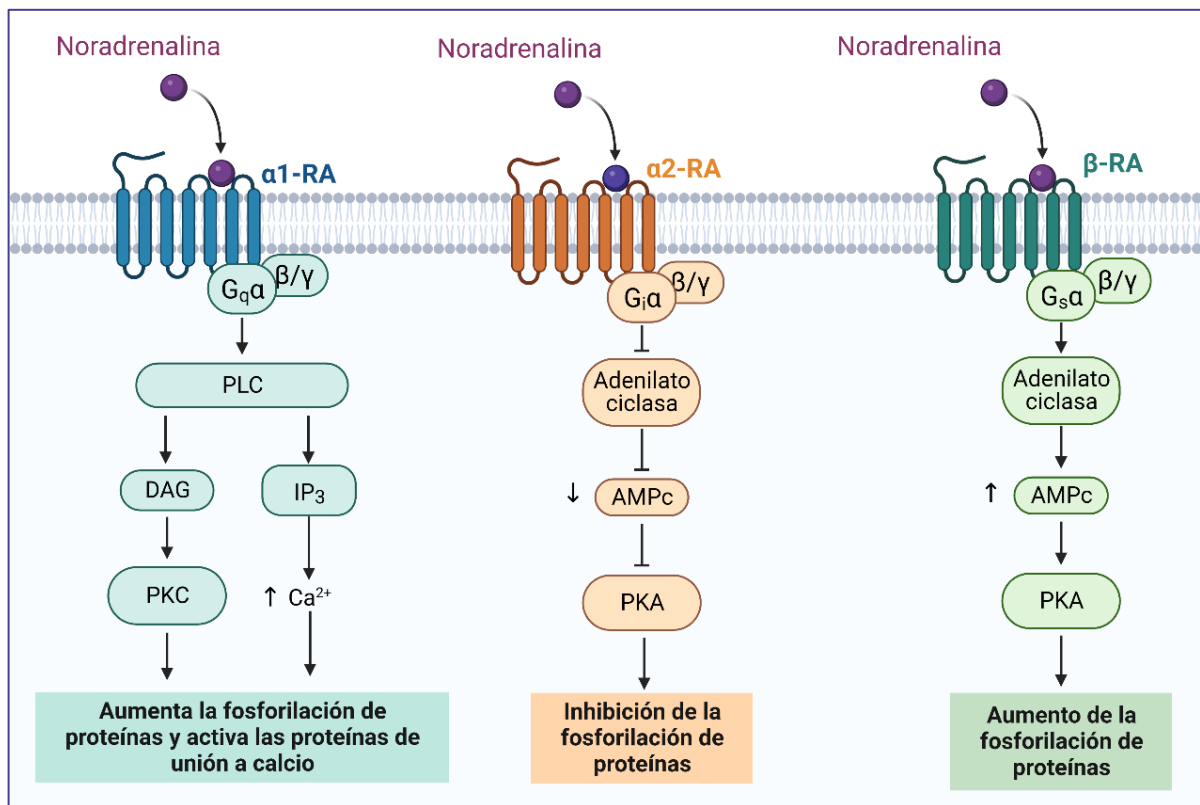


Figura 19. Vías de señalización de los receptores adrenérgicos. α1-RA: receptores α1 adrenérgicos, α1-RA: receptores α1 adrenérgicos, β-RA: receptores β adrenérgicos.

En el SNC, los receptores α1 y β adrenérgicos se localizan principalmente a nivel postsináptico, donde generalmente ejercen una acción excitadora, mientras que los receptores α2 adrenérgicos existen tanto pre como postsinápticos, donde comúnmente tienen efectos inhibitorios. Estos receptores también son expresados en el SNC por células no neuronales tales como células gliales y las células endoteliales en los vasos sanguíneos. Por otro lado, los receptores adrenérgicos tienen diferentes afinidades por la NA, siendo esta de mayor a menor: α2 (~50 nM), α1 (~300 nM), y β1-3 (~800 nM), lo que sugiere que las células muestran diferentes respuestas dependiendo de la concentración local de NA a la que están expuestas, en combinación con los receptores adrenérgicos expresados (Atzori et al., 2016; Ramos & Arnsten, 2007).

Degradación y recaptación de la noradrenalina

Una vez la NA ha sido liberada y ha ejercido su acción tras la unión a sus receptores, la degradación y la recaptación de NA son indispensables para la finalización de la señal (Figura 20).

La degradación está regulada por las enzimas monoamino oxidasas (MAO), localizadas en la membrana interior de las mitocondrias localizadas en los terminales nerviosos simpáticos, y la catecol-O-metiltransferasa (COMT), ampliamente presente en los tejidos, las células gliales y las neuronas postsinápticas en el SNC. En primer lugar, la NA es transformada en 3,4 dihidroxifenilglicolaldehído (DOPEGAL) por la acción de la MAO. Posteriormente, la aldehído

deshidrogenasa (ALDH) convierte el DOPEGAL en el metabolito ácido 3, 4-dihidroxi-mandélico (DHMA). El DHMA estimula una aldosa reductasa en las neuronas simpáticas, que convierte el DOPEGAL en 3,4 dihidroxifenilglicol (DHPG), siendo este el principal metabolito de la NA. A continuación, la COMT transforma el DHPG en 3-metoxi,4-hidroxifenilglicol (MHPG) en el tejido extraneuronal, seguido de una oxidación que favorece la formación de 3-metoxi-4-hidroxifenilglicolaldehído (MOPEGAL), un intermediario de corta duración, por la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa. Por último, este intermediario es modificado por la ALDH en ácido vanililmandélico (VMA) en el hígado, que es el producto final de la degradación de la NA. La NA también puede sufrir una vía metabólica de degradación alternativa donde es convertida en normetanadrenalina por la COMT, y posteriormente la MAO la metaboliza en MOPEGAL (Wehrwein et al., 2016).

Parte de la NA, en lugar de ser degradada, es recaptada por la neurona presináptica principalmente por el transportador de NA (NET). Una vez en el citosol, la NA puede ser degradada o almacenada de nuevo a través del transportador VMAT2 localizado en las vesículas para estar disponible de nuevo para su liberación (Wehrwein et al., 2016).

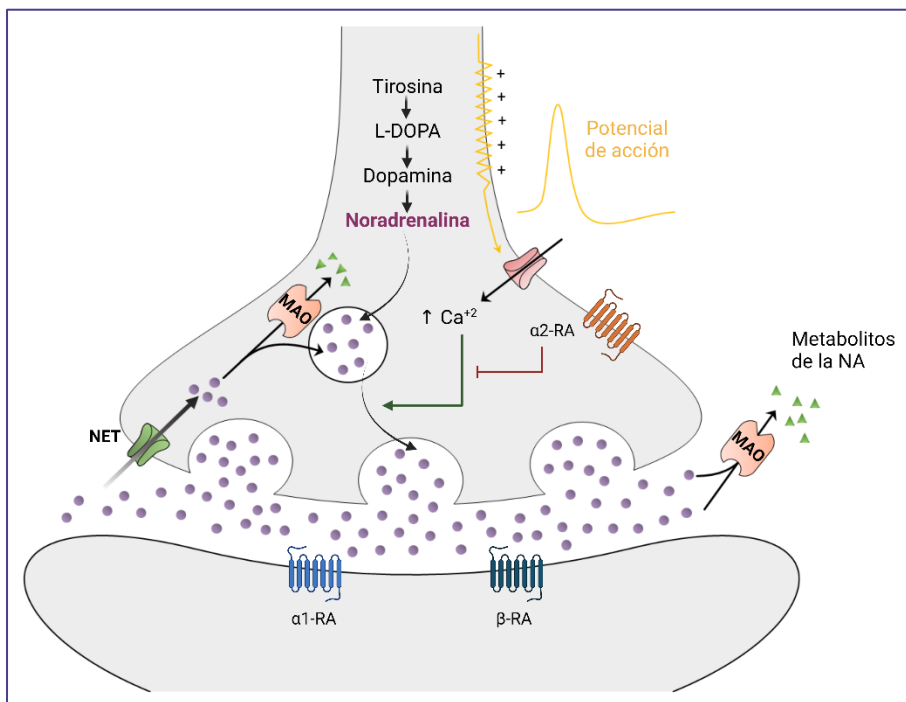


Figura 20. Síntesis, liberación y recaptación/degradación de la noradrenalina. MAO: monoaminoxidasa, NA: noradrenalina, NET: transportador de noradrenalina, α-RA: receptor α adrenérgico, β-RA: receptor β adrenérgico.

3.2.3 Funciones de la noradrenalina

El sistema noradrenérgico desempeña diversas funciones tanto a nivel periférico como central. Los efectos de la NA dependen del patrón espaciotemporal de su liberación, del tipo celular y del receptor adrenérgico activado.

Respuesta de “lucha o huida”

Los desafíos físicos, la excitación emocional, el aumento de la actividad física o los cambios en el entorno pueden evocar estrés y la consiguiente liberación de NA. A nivel periférico, estas situaciones activan el SNS y la liberación de NA junto con la adrenalina provocando alteraciones en la función de diversos órganos y tejidos, tales como la dilatación de las pupilas y los bronquiolos, el aumento de la frecuencia cardíaca y la constricción de los vasos sanguíneos, el aumento de la secreción de renina por los riñones, la inhibición del peristaltismo, la midriasis y cambios metabólicos que aumentan los niveles de glucosa en sangre y ácidos grasos libres. Esta respuesta corporal constituye una de sus funciones principales y es comúnmente conocida como la respuesta de “lucha o huida” (revisado en Tank & Lee Wong, 2015).

Funciones cognitivas

A nivel central, la NA liberada actúa como neurotransmisor y como neuromodulador en el SNC regulando de múltiples maneras la actividad de las células neuronales y no neuronales (revisado en O'Donnell et al., 2012). El sistema noradrenérgico central forma parte de los sistemas neuromoduladores del tronco cerebral junto con el sistema dopaminérgico, colinérgico y serotoninérgico. Estos actúan modulando y regulando los niveles de actividad de otros sistemas del SNC (revisado en Sara & Bouret, 2012).

Clásicamente, la NA está implicada en la regulación del estado de alerta, manteniendo el estado de alerta y promoviendo la vigilia, y controlando el ciclo sueño-vigilia; así como en la excitación y facilitación de la detección de señales sensoriales (revisado en Samuels & Szabadi, 2008). Sin embargo, otros estudios han demostrado que también puede influir en algunas áreas de la cognición y el comportamiento, tales como la atención localizada, la consolidación de la memoria, el aprendizaje y la flexibilidad conductual principalmente (revisado en Sara & Bouret, 2012).

Regulación de las células gliales

A nivel celular, la NA produce efectos tanto en neuronas como en las células gliales. Las células gliales expresan los receptores adrenérgicos y la NA modula la actividad metabólica, la liberación del glutamato y el K^+ y la actividad inflamatoria entre otras, alterando la comunicación celular (Figura 21) (O'Donnell et al., 2012).

Los astrocitos expresan los receptores α_1 , α_2 y β_1 adrenérgicos. La acción de la NA sobre la captación de glutamato, el metabolismo del glucógeno y la producción de lactato y glutamina se encuentra particularmente bien documentada. La NA aumenta los niveles de calcio intracelular y la captación de glutamato a través de los receptores α_1 adrenérgicos y aumenta la producción del glucógeno a través de los receptores α_2 adrenérgicos (Hertz et al., 2010). Mientras que la acción de la NA a través de los receptores β_1 adrenérgicos promueve la degradación del glucógeno y el aclaramiento de K^+ durante el aumento de la actividad neuronal (Hajek et al., 1996; Quach et al., 1988).

Las células de microglía expresan principalmente los receptores β_1 y β_2 adrenérgicos. Los receptores β_2 adrenérgicos se encuentran densamente expresados en las células de microglía en comparación con otros tipos celulares del SNC, y la mayoría de los efectos de la NA están mediados por la activación de este receptor (Tanaka et al., 2002). La activación de

los receptores β_2 adrenérgicos promueve la migración de la microglía hacia las zonas de daño (Heneka et al., 2010) y la fagocitosis de restos celulares y moléculas nocivas tales como las placas de $A\beta$ (Heneka et al., 2010; Kong et al., 2010). Sin embargo, la NA suprime la proliferación de la microglía a través de estos receptores (Fujita et al., 1998).

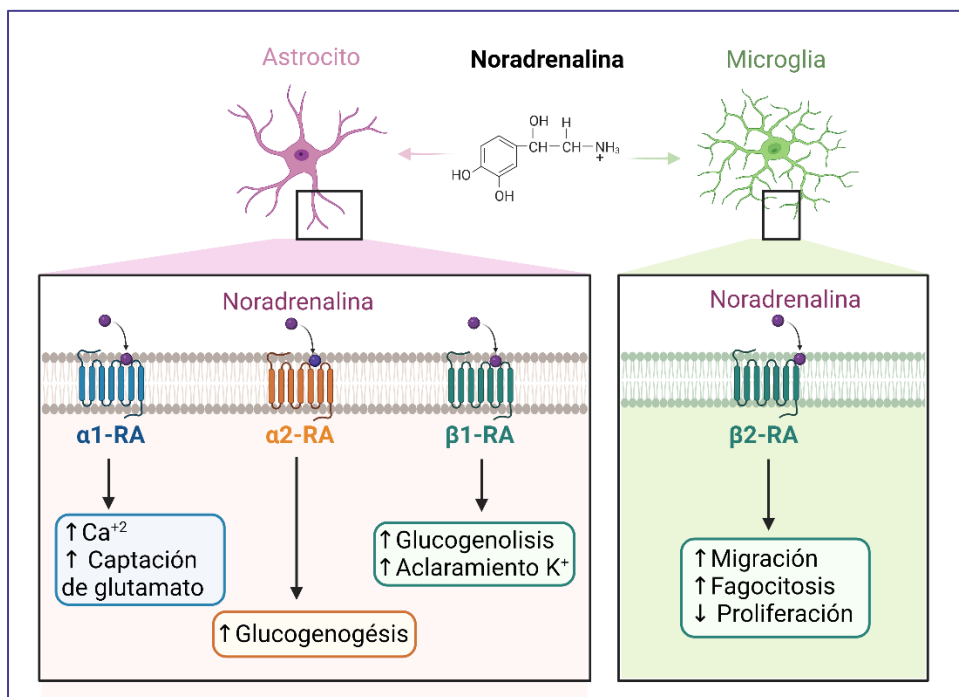


Figura 21. Efectos de la noradrenalina sobre las células gliales. α_1 -RA: receptores α_1 adrenérgicos, α_2 -RA: receptores α_2 adrenérgicos, β_1 -RA: receptores β_1 adrenérgicos, β_2 -RA: receptores β_2 adrenérgicos.

Función neuroprotectora

Por otro lado, la NA presenta un importante papel neuroprotector a través de la inducción de la producción de factores neurotróficos y la inhibición de la transcripción de genes inflamatorios (Figura 22) (Feinstein et al., 2002; Marien et al., 2004).

La NA aumenta la producción de factores neurotróficos, principalmente el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Zafra et al., 1992), que desempeña un papel importante en la supervivencia neuronal, la neuroplasticidad y la neurogénesis (Binder & Scharfman, 2004). La NA induce la expresión de BDNF en cultivos de astrocitos a través de la activación de los receptores α_1 , β_1 y β_2 adrenérgicos (Juric et al., 2008). En cultivos neuronales, la NA induce la expresión de BDNF y del factor de crecimiento neuronal (NGF), protegiendo frente a la toxicidad de $A\beta$ (Counts & Mufson, 2010). Por otro lado, la NA presenta un efecto neuroprotector mediante la disminución de la liberación astrogliar de glutamato. Este efecto parece estar mediado a través de la activación del receptor β_2 adrenérgico y la producción de CCL2 (Madrigal et al., 2009).

La acción antiinflamatoria de la NA se describió por primera vez cuando se demostró que las células gliales expresaban el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) en cultivo y que esta expresión disminuía tras la activación de los receptores $\beta 2$ adrenérgicos tras añadir NA (Frohman et al., 1988). Estudios posteriores describieron otros efectos antiinflamatorios de la NA, tales como la inhibición de la expresión de iNOS (Farber et al., 2005), de citocinas proinflamatorias (Dello Russo et al., 2004; Feinstein et al., 2002), tales como IL1 β , IL6 y TNF α (Hetier et al., 1991; Liu et al., 2016) y de diferentes quimioquinas, tales como CX3CL1, CCL2, CCL7, CCL12 y CXCL16 (Hinojosa et al., 2013). Estas acciones antiinflamatorias de la NA parecen estar mediadas a través de los receptores $\beta 2$ adrenérgicos y el aumento de AMPc que inhibe la traslocación al núcleo del factor nuclear κ B (NF κ B) y del aumento de la expresión del receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (PPAR γ) (Feinstein et al., 2002). Por otro lado, el propio BDNF actúa sobre el receptor tirosina quinasa β (TrK β) que lleva a la activación de vías de señalización que favorecen una menor expresión de moléculas proinflamatorias (Binder & Scharfman, 2004), por lo que la inducción de BDNF por la NA podría ser otro de los mecanismos moleculares a través de los cuales ejerce su acción antiinflamatoria. Finalmente, parte de los efectos antiinflamatorios de la NA podrían ser independientes de su acción sobre los receptores adrenérgicos, pudiendo estar mediadas por su acción directa a través del receptor TrK β (Liu et al., 2015). La NA podría incrementar la señalización de TrK β mediante su fosforilación e incluso actuando directamente sobre este receptor como consecuencia de la homología estructural que comparte su anillo catecol con alguno de los agonistas de TrK β .

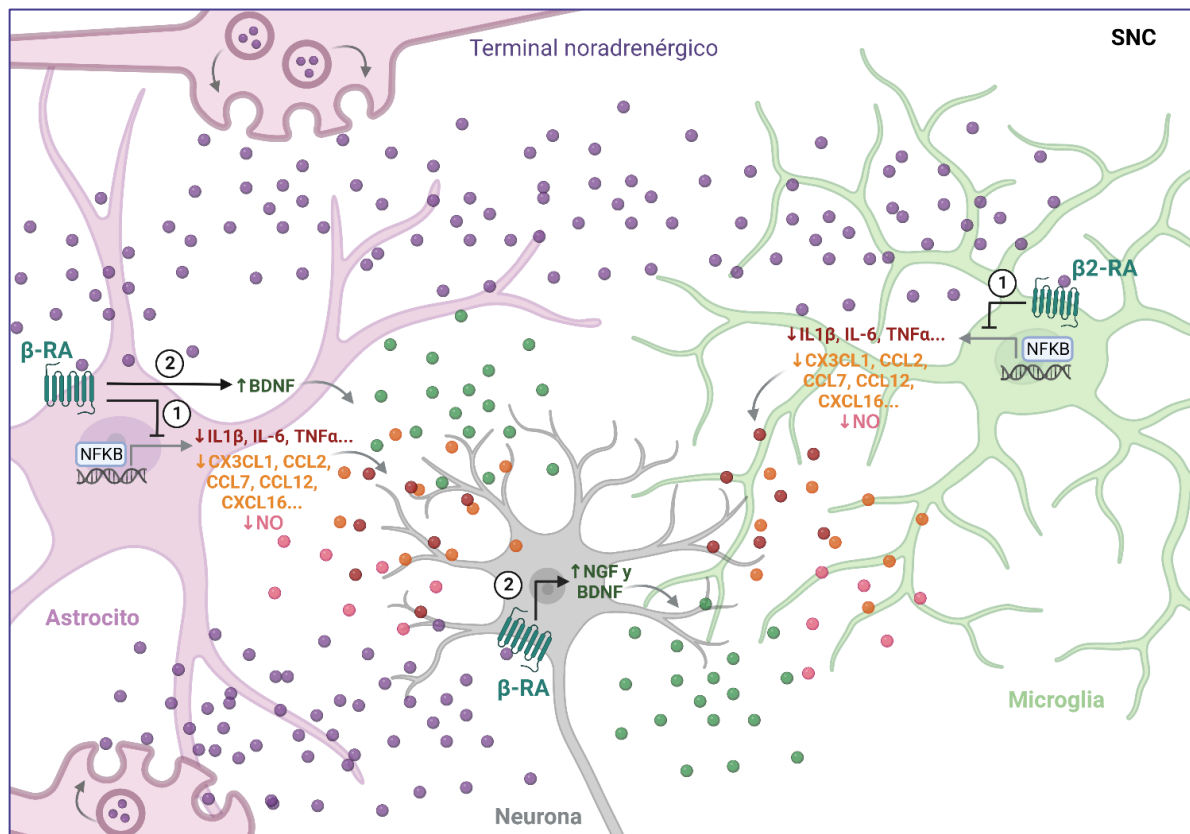


Figura 22. Efectos neuroprotectores de la noradrenalina (NA). 1) La NA actúa reduciendo la expresión de moléculas proinflamatorias tales como citoquinas y quimioquinas, así como la síntesis y liberación

de óxido nítrico (NO). 2) La NA induce la expresión y síntesis de factores neurotróficos tales como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y el factor de crecimiento neuronal (NGF). β -RA: receptor β adrenérgico. SNC: sistema nervioso central.

Estudios *in vitro*, realizados por el grupo de investigación donde se realizó esta tesis doctoral, determinaron que la NA ejerce una acción neuroprotectora contra la excitotoxicidad a través de la producción astrocítica de la quimioquina CCL2 (Madrigal et al., 2009). Sin embargo, la quimioquina CCL2 parece jugar un papel dual, siendo neuroprotectora a bajas concentraciones, pero considerándose un mediador de la inflamación a altas concentraciones (Sokolova et al., 2009). Así, el bloqueo de sus acciones, mediante el uso de alteraciones genéticas u otros medios, han demostrado reducir el daño neuronal producido por diferentes causas (B. D. Semple, T. Kossmann, et al., 2010). Sin embargo, debido a sus efectos neuroprotectores, la supresión completa de la actividad de CCL2 puede tener consecuencias deletéreas. Esto se debe posiblemente a su relevante papel como mediador de un proceso crítico como es la respuesta inmune y también a su implicación otros procesos en distintas partes del organismo (Deshmane et al., 2009). Por tanto, según la información existente, el mantenimiento de unas concentraciones de CCL2 adecuadas parece ser necesario para el control de una respuesta inflamatoria adecuada y el mantenimiento de la homeostasis tisular. En este sentido, estudios *in vitro* realizados por el grupo de investigación donde se realizó esta tesis doctoral determinaron que la NA disminuye la liberación masiva de CCL2 resultante de la exposición astrogliar a un estímulo proinflamatorio (Hinojosa et al., 2013).

3.3 QUIMIOQUINAS

Las quimioquinas son un tipo de citoquinas, concretamente citoquinas quimiotácticas, que conforman una familia de pequeñas proteínas (60-100 aminoácidos) de bajo peso molecular (8-15 KDa) (Hughes & Nibbs, 2018). La mayoría de las quimioquinas son secretadas y actúan principalmente a través de su unión a GPCRs localizados en la superficie de las células diana (Hughes & Nibbs, 2018). Muchas de las quimioquinas se unen a más de un receptor, normalmente compartido por diferentes quimioquinas. La activación de estos receptores provoca el movimiento de las células hacia las zonas donde se acumulan sus ligandos, actuando de este modo como señales químicas de atracción (Rossi & Zlotnik, 2000).

3.3.1 Clasificación y nomenclatura

Las quimioquinas comparten su estructura tridimensional, la cual está formada por tres dominios: un bucle de tres láminas β -plegadas antiparalelas, una α -hélice en el C-terminal y, por último, un N-terminal flexible con dos cisteínas unidas por enlaces disulfuro. Sin embargo, el dominio N-terminal, a través del cual las quimioquinas se unen a su receptor, difiere entre las diferentes quimioquinas en la ubicación de las dos primeras cisteínas. Atendido a esto, las quimioquinas se clasifican estructuralmente de la siguiente manera (Laing & Secombes, 2004; Luster, 1998) (Figura 23):

- *Familia XC*: tiene una sola cisteína junto a la N-terminal.
- *Familia CC*: tiene dos cisteínas adyacentes.
- *Familia CXC*: tiene un aminoácido entre las cisteínas.
- *Familia CX3C*: tiene tres aminoácidos entre las cisteínas.

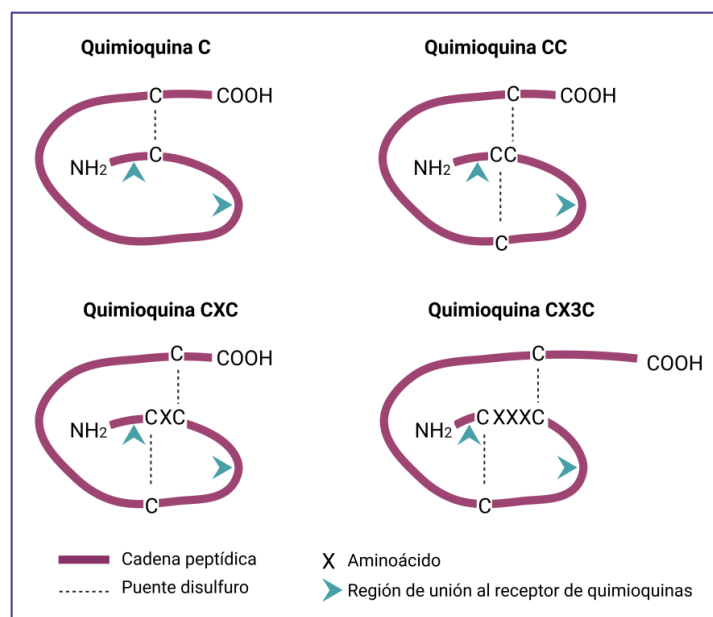


Figura 23. Clasificación estructural de las quimioquinas.

La "C" representa la cisteína y la "X" los aminoácidos, siendo el número después de la X el número de aminoácidos entre dos cisteínas. De este modo, la actual nomenclatura de las citoquinas se realiza en base a la familia a la que pertenecen seguido de una "L" que significa ligando y un número basado en el orden de descubrimiento. Los receptores reciben la misma nomenclatura, pero el nombre de la familia se sigue de una "R" haciendo referencia a receptor.

Además de esta nomenclatura, las citoquinas conservan un segundo nombre, previo a la creación de esta nomenclatura, en base a su función (homeostática, proinflamatoria, asociada a las plaquetas y/o asociada al plasma), la primera célula descubierta para producirlas o asignado arbitrariamente (Bacon et al., 2002).

Las quimioquinas también pueden clasificarse según su función y expresión en dos grupos:

- *Quimioquinas inflamatorias o inducibles*: este tipo de quimioquinas son producidas en respuesta a señales microbiológicas, inmunitarias o inflamatorias por células activadas con el fin de reclutar células al lugar de lesión.
- *Quimioquinas homeostáticas o constitutivas*: liberadas constitutivamente para lograr el tráfico celular durante la embriogénesis, la hematopoyesis o la vigilancia inmunitaria.

Sin embargo, aunque esta clasificación se sigue utilizando actualmente, muchas quimioquinas constitutivas también se inducen en determinadas condiciones inflamatorias, mientras que algunas quimioquinas inducibles se expresan y regulan constitutivamente en diferentes tejidos.

3.3.2 Funciones de las quimioquinas

Las quimioquinas son agentes clave en múltiples procesos en los que interviene la migración celular. En el SNC presentan importantes funciones fisiológicas durante el desarrollo cerebral, regulando la proliferación y migración celular, el mantenimiento de la homeostasis cerebral, participando en los procesos de neurotransmisión y comunicación celular, así como en el mantenimiento de la supervivencia celular (Ambrosini & Aloisi, 2004; Williams et al., 2014). Sin embargo, las funciones de las quimioquinas durante la respuesta inflamatoria constituyen uno de los procesos más estudiados. La expresión y síntesis de ciertas quimioquinas se regula a través de procesos infecciosos o neuroinflamatorios para estimular la quimiotaxis de las células gliales como astrocitos y microglía, así como de células inmunitarias no residentes del SNC a través de la BHE (Ambrosini & Aloisi, 2004). Las quimioquinas presentan un papel fundamental en el reclutamiento de leucocitos hacia el SNC. Estos leucocitos pueden producir otras quimioquinas facilitando la respuesta inmunitaria innata y adaptativa (Williams et al., 2014).

En la [Figura 24](#) se muestran las principales funciones en las que están involucradas las quimioquinas en el SNC.

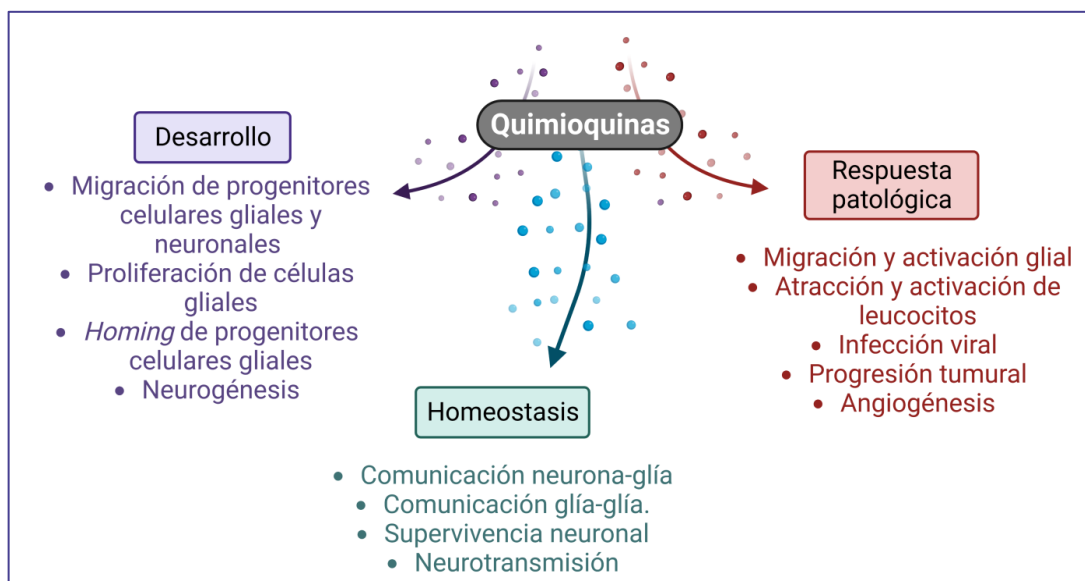


Figura 24. Funciones de las quimioquinas. Figura adaptada de (Ambrosini & Aloisi, 2004).

3.3.3 Quimioquina CCL2

CCL2 también conocida como proteína 1 quimioatrayente de monocitos (MCP-1) es una quimioquina perteneciente a la familia tipo CC compuesta por cinco miembros (MCP-1/CCL2, MCP-2/CCL8, MCP-3/CCL7, MCP-4/CCL13 y MCP-5/CCL12). CCL2 fue la primera quimioquina humana de este tipo descubierta, su gen se localiza en el cromosoma 17 y la proteína está formada por 76 aminoácidos, con un peso molecular de 13 KDa (Bacon et al., 2002).

Su función mejor conocida es la de regular la migración de diferentes tipos celulares que expresan su receptor, CCR2, tales como células del sistema inmunitario hacia la zona lesionada, participando en la respuesta inflamatoria (Deshmane et al., 2009). Según su grado de O-glicosilación, encontramos diferentes isoformas de CCL2 con variaciones en la masa molecular, lo cual puede interferir en su acción quimioatrayente (Jiang et al., 1991; Proost et al., 1998). Por otro lado, CCR2 también tiene dos isoformas que varían en el C-terminal, CCR2A y CCR2B, siendo esta última la más abundante con una expresión del 90% (Markx et al., 2019). Cada isoforma puede activar diferentes vías de señalización, ejerciendo así diferentes acciones.

Mecanismo de señalización de CCL2

El receptor CCR2 es un GPCR acoplado a la proteína Gq. Por tanto, la unión de CCL2 a su receptor resulta en la inhibición de la enzima adenilato ciclasa (AC) y la activación de PLC, que produce DAG e IP3. A continuación, el calcio del retículo endoplásmico activa la PKC y la proteína quinasa II dependiente de la calmodulina (CaMKII). También tiene lugar la activación de la PI3K y Akt dando lugar a la translocación de NFκB al núcleo celular. Además, CCL2 induce la fosforilación de las MAPKs (ERK, JNK, p38), lo que conduce a la translocación de la proteína activadora 1 (AP-1) (Bose & Cho, 2013). En última instancia, estas vías de

señalización intervienen en la proliferación, migración y supervivencia celular (Fei et al., 2021) (Figura 25).

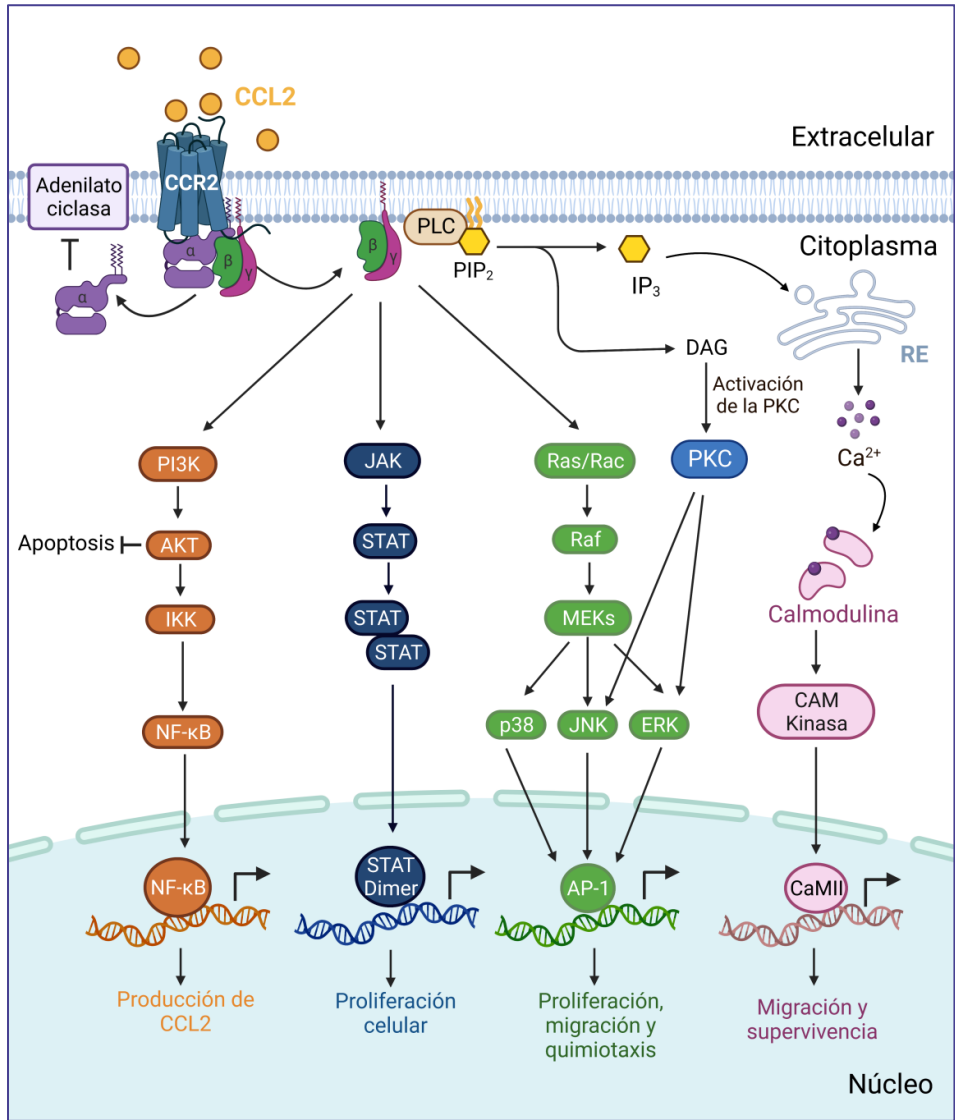


Figura 25. Vías de señalización de la quimioquina CCL2. Figura adaptada de (Fei et al., 2021).

Expresión de CCL2 y su receptor CCR2 en el SNC

CCL2 se produce tanto de forma constitutiva como inducida, por diferentes poblaciones celulares. En el SNC se expresa de forma constitutiva por parte de las neuronas y de las células gliales (Banisadr, Gosselin, Mechighel, Rostène, et al., 2005; Banisadr et al., 2002; Berman et al., 1996; Glabinski & Ransohoff, 1999), pero sólo se induce su expresión en microglía y astrocitos, siendo los astrocitos su fuente de producción más significativa (Glabinski et al., 1996). Su receptor CCR2 se expresa en neuronas y astrocitos en diferentes áreas cerebrales (Banisadr, Gosselin, Mechighel, Rostène, et al., 2005; Banisadr et al., 2002) y en células progenitoras de oligodendrocitos (OPC) preferentemente en la médula espinal

(Marques et al., 2018). Mientras que sigue siendo objeto de debate si CCR2 se expresa en las células de microglía (Biber & Boddeke, 2014).

En cuanto a las regiones cerebrales, CCL2 se expresa en niveles elevados en la corteza, hipocampo, *locus coeruleus* (LC) y cerebelo. Mientras que su expresión constitutiva está restringida a algunas áreas cerebrales, como el cerebelo o el LC (Banisadr, Gosselin, Mechighel, Kitabgi, et al., 2005; Banisadr, Gosselin, Mechighel, Rostène, et al., 2005; Banisadr et al., 2002).

Funciones de CCL2 en el SNC

Durante el desarrollo del cerebro, las quimiocinas representan moléculas de señalización que impulsan la correcta migración y la orientación axonal de las células progenitoras neuronales (Tran et al., 2004). CCL2, al igual que otras quimioquinas, puede actuar localmente como quimioatrayente durante la formación de diversas estructuras cerebrales (Katsumoto et al., 2014; Tran et al., 2004). Las células progenitoras neuronales de la zona subventricular (SVZ) expresan CCR2 y migran en respuesta a un gradiente de CCL2 (Widera et al., 2004). CCL2 también actúa como quimioatrayente de progenitores neuronales que expresan el receptor CCR2 hacia las zonas lesionadas (Belmadani et al., 2006; Widera et al., 2004) y participa en la diferenciación neuronal (Liu et al., 2007). En 2006 Belmadani et al. demostraron que la migración de los precursores neuronales injertados en secciones de hipocampo hacia la zona de inflamación/lesión dependía de la señalización de CCL2 (Belmadani et al., 2006). En un modelo de isquemia cerebral de ratón, la expresión de CCL2 aumentó en las células gliales, y esta se correlacionó con la migración de los progenitores neuronales hacia la zona isquémica (Yan et al., 2007). Por otro lado, CCL2 aumenta la diferenciación neuronal de los progenitores neuronales sin alterar su proliferación neuronal (Liu et al., 2007). En consecuencia, la deficiencia de CCL2 reduce la **neurogénesis y la diferenciación de los progenitores neuronales** (Kiyota et al., 2013). En un modelo de ratón de la EA, la deficiencia de CCL2 redujo la neurogénesis y la diferenciación en la zona subgranular (SGZ) del giro dentado del hipocampo (Kiyota et al., 2013).

Por otro lado, CCL2 puede actuar como **neuromodulador** en el SNC. CCL2 actúa intensificando la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica en las neuronas del hipocampo, participando en la regulación de la sinapsis neuronal (Mélik-Parsadaniantz & Rostène, 2008; Zhou et al., 2011). En las neuronas dopaminérgicas y colinérgicas, la expresión de CCR2 colocaliza con neurotransmisores, lo que indica que CCL2 podría estar implicado en la comunicación neuronal y relacionada con enfermedades que presentan alteraciones dopaminérgicas o colinérgicas (Conductier et al., 2010; Guyon et al., 2009). CCL2, al igual que otras quimioquinas, se mantiene en vesículas hasta que una corriente de despolarización dependiente del calcio, procedente de las neuronas de los ganglios dorsales, la libera (Jung et al., 2008) en la médula espinal donde puede reclutar células que expresan CCR2 (Van Steenwinckel et al., 2011). Además, en estudios de nocicepción en neuronas de la médula espinal, CCL2 bloquea la señal inhibitoria del receptor del ácido gamma-aminobutírico (GABA) a través de su acción sobre el receptor CCR2, influyendo en la actividad eléctrica neuronal y generando hiperalgesia (Biber & Boddeke, 2014).

La liberación de CCL2 por parte de los astrocitos se asocia con **efectos neuroprotectores**. CCL2 ha demostrado promover la neuroprotección (Bruno et al., 2000) y reducir la muerte celular apoptótica (Eugenin et al., 2003), debido a la toxicidad del NMDA, al disminuir la

liberación neuronal de glutamato, que aumenta en ciertas enfermedades neurodegenerativas como la EA. Este efecto neuroprotector de CCL2 solo se detectó cuando se añadía antes del agente tóxico, lo que sugiere que el CCL2 se utiliza como una señal temprana de las neuronas y/o los astrocitos. La liberación de CCL2 por parte de los astrocitos promueve la liberación de citoquinas antiinflamatorias protegiendo a las neuronas contra toxinas como el metilmercurio (Godefroy et al., 2012) y la endotoxemia (Zisman et al., 1997).

CCL2 se eleva durante la inflamación y desempeña un papel esencial en la **neuroinflamación crónica** (Gerard & Rollins, 2001), siendo responsable de la estimulación del TNF α además de alterar la permeabilidad de la BHE (Guo et al., 2020), ya que las células endoteliales microvasculares cerebrales responden a CCL2 (Roblek et al., 2019; Song & Pachter, 2004), para permitir la transmigración de leucocitos (Cédile et al., 2017; Dzenko et al., 2005; Ge et al., 2008) y la infiltración de monocitos desde la periferia hasta el cerebro. En consecuencia, los niveles de CCL2 aumentan en enfermedades que cursan con neuroinflamación, como en EA (Sokolova et al., 2009), enfermedad de Parkinson (EP) (Reale et al., 2009), demencia asociada al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Kelder et al., 1998), isquemia (B. D. Semple, N. Bye, et al., 2010), esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Baron et al., 2005; Gupta et al., 2011) y esclerosis múltiple (EM) (Mahad & Ransohoff, 2003). Por ello, se ha sugerido su bloqueo como diana en el tratamiento de varias de estas enfermedades (Deshmane et al., 2009)

3.4 NORADRENALINA EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

En los últimos años, varias son las revisiones científicas que se han publicado en las que se recapitula la evidencia disponible hasta la fecha sobre el papel del sistema noradrenérgico en las enfermedades neurodegenerativas, especialmente en la EA (Behl et al., 2022; T. Chalermpananupap et al., 2013; Chen et al., 2022; David & Malhotra, 2022; Gutierrez et al., 2022; Malatt & Tagliati, 2022; Matchett et al., 2021; Mercan & Heneka, 2022; Phillips et al., 2016; Slater & Wang, 2021).

El papel del LC y la NA en la EA se basa en las siguientes observaciones:

- La respuesta celular aberrante, particularmente de las células gliales, durante el proceso inflamatorio juega un papel central en la fisiopatología de la EA (apartado 3.1.7).
- La NA presenta un importante papel regulador de la actividad glial, así como un efecto neuroprotector a través de la regulación de la expresión y síntesis de moléculas inflamatorias y factores neurotróficos (apartado 3.2.3).
- El sistema noradrenérgico sufre diferentes alteraciones en la EA (apartado 3.4.1).
- Las alteraciones del sistema noradrenérgico se asocian con la gran parte de la sintomatología de la EA (apartado 3.4.2).
- La disfunción del sistema noradrenérgico exacerba la patología de modelos preclínicos de la EA (apartado 3.4.5)
- Algunas estrategias farmacológicas que afectan a la transmisión noradrenérgica reducen la fisiopatología de la EA (apartado 3.4.6)

3.4.1 Alteración del sistema noradrenérgico en la enfermedad de Alzheimer

Diversos estudios han demostrado la existencia de una pérdida temprana de neuronas noradrenérgicas en el LC y de la inervación noradrenérgica en las diferentes regiones cerebrales en la EA, lo que conlleva una compleja desregulación del sistema noradrenérgico central. De este modo, la alteración de este sistema podría contribuir al establecimiento y progresión de la EA (Figura 26). Por tanto, el restablecimiento de una adecuada señalización noradrenérgica podría representar una potencial estrategia terapéutica para reducir la progresión de esta devastadora enfermedad (Chen et al., 2022).

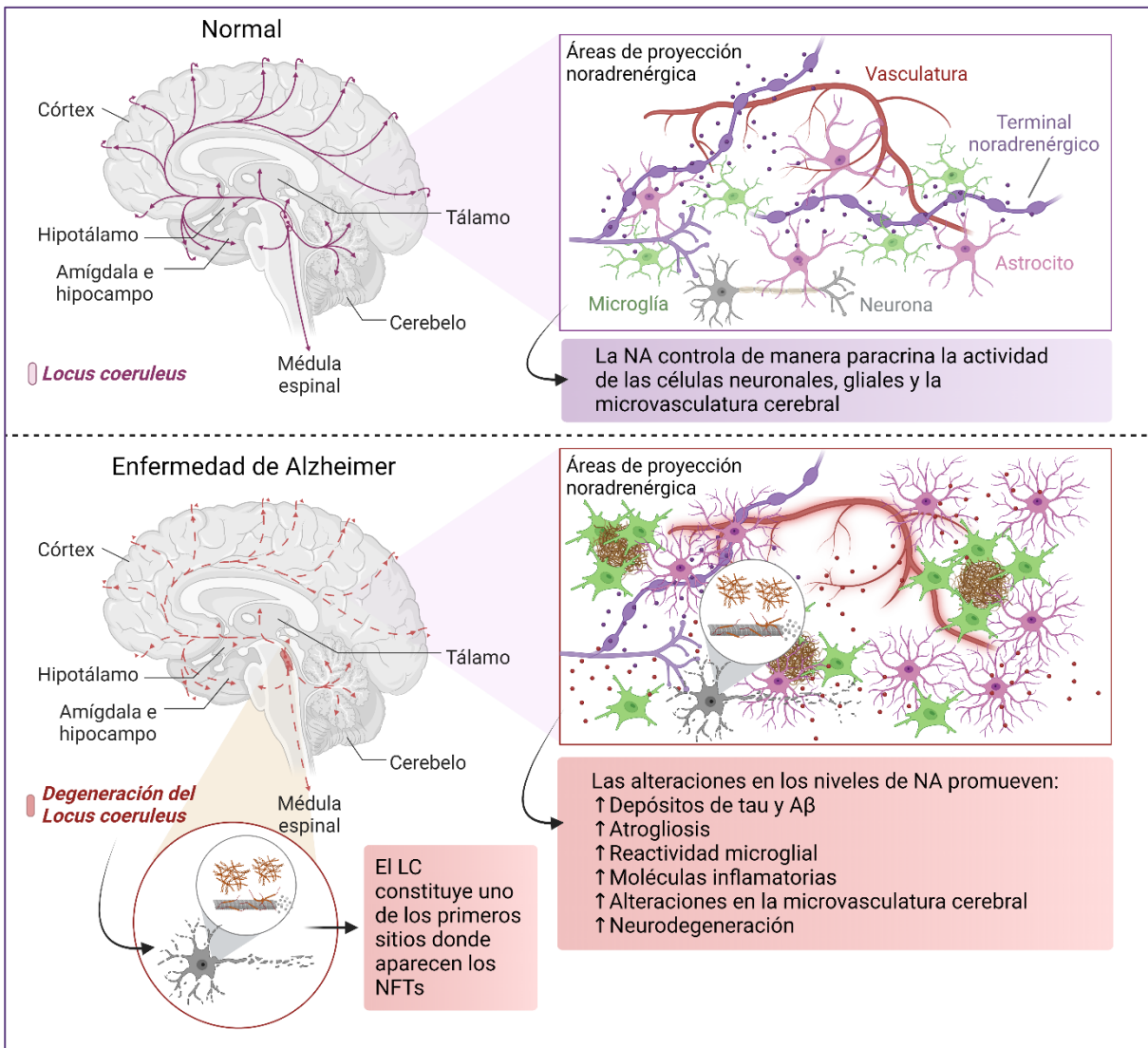


Figura 26. Hipótesis acerca de la implicación de las alteraciones del sistema noradrenérgico en la enfermedad de Alzheimer (EA). Aβ: péptido β amiloide, LC: Locus coeruleus, NA: noradrenalina, NFTs: ovillos neurofibrilares de tau.

Neurodegeneración del Locus coeruleus

A principios de los años 80, se describió por primera vez la existencia de una degeneración temprana del LC en pacientes de EA, la cual parece producirse mucho antes de que aparezca cualquier otra característica patológica (Bondareff et al., 1981; Iversen et al., 1983; Mann et al., 1984; Tomlinson et al., 1981). Además, antes de que se produzca la muerte neuronal tiene lugar una disminución de las neuronas pigmentadas del LC debido a la contracción celular y a la pérdida del fenotipo (Hoogendijk et al., 1995). La pérdida neuronal del LC, además de tratarse de un evento temprano de la enfermedad, parece correlacionarse mejor con la gravedad y duración de la EA que la pérdida neuronal en el núcleo basal de Meynert (NbM) tal y como se había descrito tradicionalmente (Zarow et al., 2003).

En el año 2011, Braak y sus colegas caracterizaron en una cohorte de individuos el LC como el primer sitio donde comenzaban a acumularse NFTs (Braak et al., 2011). Sin embargo, estudios de muestras post mortem demostraron que el LC es una de las últimas regiones cerebrales donde se deposita A β (Thal et al., 2002).

La llegada de las técnicas de neuroimagen, como la Resonancia Magnética (RM) y la Tomografía por Emisión de Positrones (PET), permitió el estudio *in vivo* del LC en el cerebro humano. Las imágenes basadas en la RM pueden proporcionar información tanto estructural como funcional sobre el LC con una alta resolución espacial y una buena fiabilidad de forma segura y no invasiva. Aprovechando las propiedades paramagnéticas de las neuronas ricas en neuromelanina (NM) del LC, varios estudios de RM estructural permitieron cuantificar tanto el tamaño del LC como su contenido de NM, lo que se considera una medida de la integridad del LC. Por otro lado, las imágenes PET se basan en el uso de un radiotrazador específico, proporcionando información sobre el metabolismo cerebral, la aparición de neuroinflamación y el depósito de agregados típicos de la EA, tales como los depósitos de A β y tau.

Estudios de RM determinaron que el tamaño del LC es un indicador de la reserva cognitiva relacionándose su tamaño con el rendimiento cognitivo (Plini et al., 2021). El uso de esta técnica de neuroimagen permitió detectar una disminución en el tamaño del LC tanto en pacientes con deterioro cognitivo leve (DCL), como con EA (Dutt et al., 2020). Además, la atrofia del LC se correlaciona con los niveles de A β en el LCR (Betts et al., 2019) y con la gravedad de los síntomas neuropsiquiátricos (Cassidy et al., 2022) en pacientes con EA. Sorprendentemente, una reducción del volumen del LC en controles sanos, inicialmente asintomáticos, se asoció con el desarrollo de la EA en dos años (Dutt et al., 2020). Recientemente, un nuevo estudio encontró que aquellos sujetos con DCL que evolucionaron a demencia por EA, presentaban un menor volumen del LC en comparación con individuos sanos, mientras que esta reducción no se detectó en los individuos con DCL que permanecieron estables durante el seguimiento (Galgani et al., 2022). Estos datos destacan el potencial papel de la RM para predecir la progresión clínica en el DCL, y apoyan el papel clave de la degeneración del LC en la progresión hacia la EA.

Por otro lado, estudios de resonancia magnética funcional (RMf) demostraron que individuos con antecedentes maternos o paternos de EA presentan una reducción de la conectividad funcional del LC con varias regiones cerebrales. Este hallazgo estaba estrechamente relacionado con el deterioro de la capacidad de memoria, demostrando así que el LC es una región crucial para la vulnerabilidad a la EA en esta población de riesgo (Del Cerro et al., 2020).

El uso de PET mediante un trazador capaz de medir la capacidad de síntesis de catecolaminas demostró que la disminución en producción de catecolaminas del LC se asociaba a una reducción del rendimiento de la memoria en adultos sanos (Ciampa et al., 2022). El PET también se ha utilizado en asociación con la RM, demostrando la relación entre el deterioro del LC y el depósito de A β y tau en pacientes con EA (M. J. Dahl et al., 2022; Jacobs et al., 2021), así como en sujetos asintomáticos que desarrollaron DCL a lo largo del tiempo (Prokopiou et al., 2022).

El conjunto de los estudios análisis de tejido cerebral post mortem, así como de los estudios *in vivo* mediante el uso de técnicas de neuroimagen se recapitulan en la [Tabla 2](#). Estos estudios nos demuestran que la pérdida neuronal en el LC parece constituir una de las

características fisiopatológicas fundamentales de la EA. Por lo tanto, la degeneración del LC podría representar un potencial biomarcador temprano para el diagnóstico de la EA y la monitorización de la progresión de esta enfermedad, así como un biomarcador de cribado para la selección de candidatos para ser sometidos a ensayos clínicos. Además, podría ayudar al desarrollo de estrategias terapéuticas alternativas basadas en el uso de fármacos moduladores de la NA en un momento en el que el daño neurológico no llegue a ser demasiado incapacitante (T. Chalermpanupap et al., 2013).

Tabla 2. Degeneración del Locus coeruleus en la Enfermedad de Alzheimer.

Referencia	Cohorte	Tipo de estudio	Resultados principales del estudio
(Galgani et al., 2022)	C (n=53)	RM	Menor volumen del LC en sujetos con DCL que evolucionaron a EA
	DCL (n=73)		
	EA (n=34)		
(Cassidy et al., 2022)	C (n = 118)	RM	La pérdida de la señal de NM en el LC predice los síntomas neurocicológicos independientemente de los depósitos de Aβ y tau
	DCL (n = 44)		
	EA (n = 28)		
(Ciampa et al., 2022)	C (n = 49)	PET	La capacidad de síntesis de catecolaminas del LC se asocia con una mejor capacidad de memorización
(M. J. Dahl et al., 2022)	ADAD (n=9)	RM y PET	El tamaño del LC se asocia con los depósitos de tau y las alteraciones en la memoria
(Prokopiou et al., 2022)	C (n=128)	RM y PET	La actividad del LC se asocia con los depósitos de Aβ y el deterioro cognitivo
(Plini et al., 2021)	C (n=395)	RM	El tamaño del LC predice la capacidad de atención en sujetos con EA, DCL y en controles
	DCL (n=156)		
	EA (n=135)		
(Jacobs et al., 2021)	EA (n =221)	RM y PET	La acumulación de tau en el LC se asocia a la progresión de la EA
(Dutt et al., 2020)	C (n= 814)	RM	Atrofia del LC en pacientes con DCL y EA
	DCL (n= 542)		
	EA (n= 160)		
(Del Cerro et al., 2020)	C (n=28)	RM	La reducción de la conectividad funcional del LC se correlaciona con el deterioro de la memoria
	LOAD (n= 31)		
(Betts et al., 2019)	C (n=25)	MRI	La disminución del volumen del LC se correlaciona con los niveles de amiloide en el LCR en pacientes con EA
	SCD (n=21)		
	DCL (n=16)		

	EA (n=11)		
(Pletnikova et al., 2018)	Individuos de 30 a 65 años (n= 431)	Análisis post mortem	Los acúmulos de tau presentes en el LC aumentan con la edad
(Theofilas et al., 2018)	EA (n=24)	Análisis post mortem	El acúmulo de NFTs en el LC se asocia con la pérdida neuronal
(Theofilas et al., 2017)	EA (n=68)	Análisis post mortem	La pérdida neuronal en el LC se correlaciona con la progresión de la EA
(Kelly et al., 2017)	C (n=11)	Análisis post mortem	La pérdida neuronal en el LC se correlaciona con la duración de la EA
	DCL (n=10)		
	EA (n=8)		
(Braak & Del Tredici, 2011)	Individuos de 4 a 29 años (n=42)	Análisis post mortem	Presencia de acúmulos de tau en núcleos subcorticales, como en LC, sin presencia de acúmulos en regiones corticales
(Braak et al., 2011)	Individuos de 1 a 100 años (n=2332)	Análisis post mortem	Acumulación temprana de tau en el LC
(Zarow et al., 2003)	67 estudios	Metaanálisis	Degeneración del LC en la EA
(Thal et al., 2002)	Individuos de 42 a 93 años (n=51)	Análisis post mortem	Acumulación de A β en el LC durante las últimas etapas
(Hoogendijk et al., 1995)	C (n=5)	Análisis post mortem	Disminución de las neuronas pigmentadas del LC en pacientes con EA debido a la contracción celular y a la pérdida del fenotipo
	EA (n=5)		
	EP (n=5)		
	EM (n=5)		
(German et al., 1992)	C (n=7)	Análisis post mortem	La pérdida neuronal en el LC se correlaciona con la duración de la EA
	EP (n=6)		
	EA (n=9)		
	DS (n=3)		
(Mann et al., 1984)	EA leve a severa (n= 22)	Análisis post mortem	Pérdida neuronal en el LC del 71.2%
(Iversen et al., 1983)	C (n= 6)	Análisis post mortem	Pérdida neuronal en el LC en pacientes con EA
	EA (n= 6)		
(Tomlinson et al., 1981)	C (Edad media=47 años) (n=10)	Análisis post mortem	Pérdida neuronal en el LC en pacientes con EA que se correlaciona con la gravedad de la enfermedad

	C (Edad media=76 años) (n=15)		
	EA (Edad media=81 años) (n=15)		
(Bondareff et al., 1981)	C (n=10)	Análisis post mortem	Pérdida neuronal en el LC en pacientes con EA
	EA (n= 20)		

ADAD: enfermedad de Alzheimer's autosómica dominante, C: control, DCL: deterioro cognitivo leve, DS: síndrome de Down, EA: enfermedad de Alzheimer, EP: enfermedad de Parkinson, EM: esclerosis múltiple, LC: locus coeruleus, LCR: líquido cefalorraquídeo, LOAD: enfermedad de Alzheimer de inicio tardío, NA: noradrenalina, PET: tomografía por emisión por positrones, RM: resonancia magnética, RMI: imagen por resonancia magnética, SCD: deterioro cognitivo subjetivo.

Alteración de los niveles cerebrales de NA

A pesar de la pérdida de las neuronas noradrenérgicas en el LC, existe evidencia contradictoria respecto a los niveles cerebrales de NA (Tabla 3), mientras que algunos estudios que muestran una disminución de la NA, otros muestran que los niveles de NA en los pacientes con EA permanecen constantes, o incluso elevados.

Mediante el uso de técnicas como cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) varios grupos han encontrado una reducción en los niveles de NA en diferentes regiones del cerebro (Arai et al., 1984; Herregodts et al., 1989; Iversen et al., 1983; Martignoni et al., 1992; Matthews et al., 2002; Nazarali & Reynolds, 1992; Reinikainen et al., 1988), la cual se correlaciona con el deterioro cognitivo (Matthews et al., 2002). Los niveles de NA en plasma se correlacionan con la progresión de la EA y podrían usarse también como un biomarcador con el que seguir la evolución de la enfermedad (Pillet et al., 2020).

Sin embargo, la degeneración LC promueve diferentes mecanismos compensatorios para paliar la muerte de las neuronas noradrenérgicas por lo que el sistema noradrenérgico sufre diferentes cambios a lo largo de la progresión de la EA (Szot et al., 2006).

En los pacientes de EA con degeneración severa del LC, las neuronas noradrenérgicas supervivientes aumentan la expresión de las enzimas implicadas en la síntesis de NA, como la tiroxina hidrolasa (TH), mientras que reducen la captación de NA en los terminales sinápticos, lo que resulta en un aumento de los niveles de NA en el LCR que se correlaciona con la alteración de la función cognitiva (Elrod et al., 1997). Mustapic y colaboradores observaron en muestras de plasma que la actividad de la dopamina β-hidroxilasa (DβH), la enzima encargada de producir NA a partir de DA, se encuentra elevada en pacientes con EA en las etapas tempranas, mientras que su actividad se encontró incrementada en los pacientes con EA en etapas tardías (Mustapic et al., 2013). Además, las neuronas supervivientes del LC aumentan el número de conexiones axonales y dendríticas para conservar el número de contactos (Gannon & Wang, 2019; Szot et al., 2007). Estos cambios en el sistema noradrenérgico parecen mantener una adecuada señalización de NA a pesar de la pérdida del LC en las primeras etapas de la EA. De hecho, varios estudios han

demostrado que no hay cambios en los niveles cerebrales de NA tanto en los casos de EA esporádica como familiar (Sparks et al., 1988; Tohgi et al., 1992).

Tabla 3. Alteraciones en los niveles de noradrenalina en la Enfermedad de Alzheimer.

Referencia	Cohorte	Tipo de muestra	Resultados principales del estudio
(Pillet et al., 2020)	C (n=17)	Plasma	↓ NA en la EA
	OD (n= 22)		
	EA (n= 32)		
(Matthews et al., 2002)	C (n= 33)	Lóbulo temporal	↓ NA en la EA
	EA (n= 46)		
(Elrod et al., 1997)	C (n= 96)	LCR	↑ NA en la EA
	EA (n= 74)		
(Martignoni et al., 1992)	C (n= 36)	LCR	↓ NA en la EA
	EP (n= 29)		
	AMS (n=15)		
	EA (n= 22)		
(Nazarali & Reynolds, 1992)	C (n= 10)	Corteza temporal	↓ NA en la EA
	No-EA (n= 11)		
	EA (n= 13)		
(Tohgi et al., 1992)	C (n= 15)	LCR	No cambios en NA en la EA
	EA (n= 11)		
(Herregodts et al., 1989)	C (n= 6)	Giros pre y post centrales, la circunvolución cingular, el núcleo amigdalino y el núcleo anterior del tálamo	↓ NA en la EA
	EA familiar (n= 4)		
	EA esporádica (n= 4)		
(Sparks et al., 1988)	C (n= 18)	Hipotálamo	No cambios en NA en la EA
	EA (n= 10)		
(Reinikainen et al., 1988)	C (n= 14)	Corteza frontal, corteza temporal, hipocampo y putamen	↓ NA en la EA
	EA (n= 20)		
(Mann et al., 1984)	C (n= 9)	Giro cingulado, sustancia innominada, putamen,	↓ NA en la EA
	EA (n= 4)		

		Hipotálamo, núcleo medial del tálamo y zona del rafe	
(Iversen et al., 1983)	C (n= 6)	Corteza temporal	↓ NA en la EA
	EA (n= 6)		

C: control, EA: enfermedad de Alzheimer, EP: enfermedad de Parkinson, LCR: líquido cefalorraquídeo, NA: noradrenalina, OD: otras demencias, AMS: estado mental alterado.

Sin embargo, estos mecanismos compensatorios pueden dar lugar a una hiperactividad noradrenérgica y al establecimiento de nuevas conexiones disfuncionales que alteran la adecuada señalización noradrenérgica, lo que podría contribuir a la fisiopatología de la EA y al establecimiento de los síntomas prodrómicos en las etapas tempranas, tales como las alteraciones del sueño y la ansiedad (Weinshenker, 2008). En este sentido, el aumento de los niveles cerebrales de NA se correlacionó con la disminución de la función cognitiva (Tohgi et al., 1992) y el envejecimiento (Elrod et al., 1997) en pacientes con EA.

Por tanto, parece que es tan solo cuando las neuronas del LC restantes no pueden compensar suficientemente la pérdida neuronal global, cuando se observa una disminución de los niveles tisulares de NA en diferentes regiones cerebrales de los pacientes con EA avanzada en comparación con controles sanos (Gannon et al., 2015; Gannon & Wang, 2019). De este modo, una hipótesis propuesta es que tanto la señalización noradrenérgica hiperactiva o aberrante en las etapas más tempranas, como la deficiencia noradrenérgica en las etapas más tardías contribuyen a la fisiopatología de la EA (Figura 27) (Weinshenker, 2008).

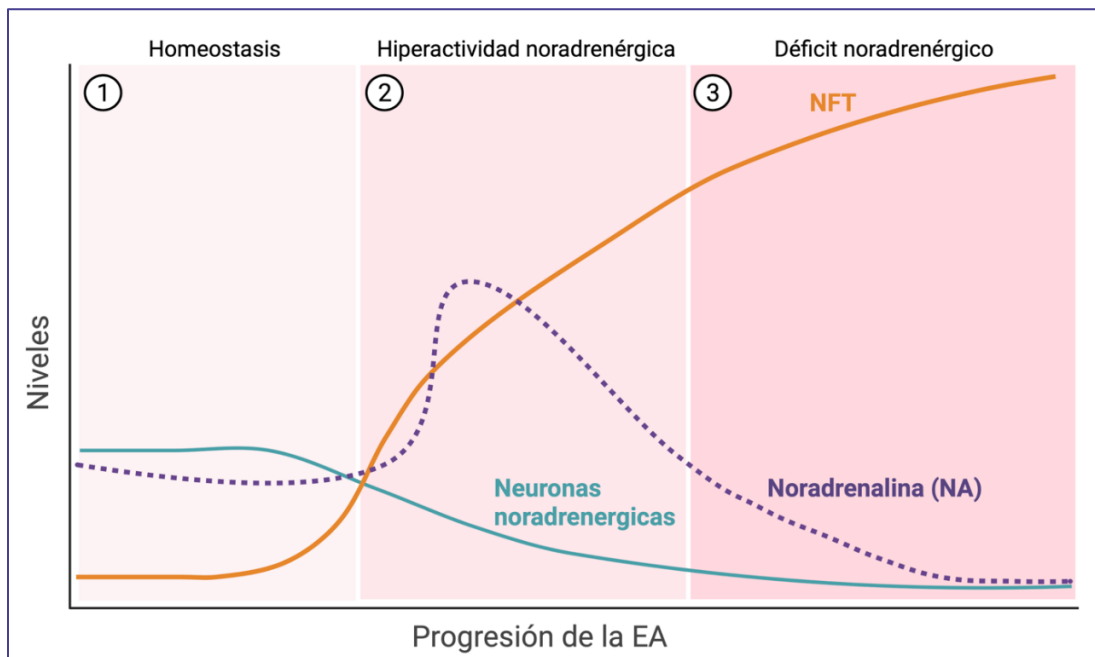


Figura 27. Hipótesis de la alteración de los niveles cerebrales de noradrenalina durante la progresión de la EA. 1) En las etapas más tempranas de la EA los ovillos neurofibrilares (NFTs) comienzan a acumularse en el interior de las neuronas noradrenérgicas en el LC. 2) En etapas posteriores, la pérdida neuronal en el LC promueve una serie de mecanismos compensatorios (aumento de la síntesis de NA

y disminución de su recaptación) que dan lugar a un incremento de los niveles cerebrales de la NA y una hiperactividad noradrenérgica. 3) Finalmente, en la EA avanzada existe una gran pérdida neuronal y una disminución de los niveles cerebrales de NA.

Además, la pérdida de las neuronas del LC no solo afecta a la producción y niveles cerebrales de la NA. Aparte de la NA, las neuronas del LC sintetizan y liberan otros neuromoduladores tales como: ATP, neuropéptido Y, galanina, encefalina, BDNF, y otras neurotrofinas. Por lo tanto, la disminución de estos moduladores, debido a sus propiedades neurotróficas y neuroprotectoras, podría también contribuir a la neurodegeneración característica de la EA (Weinshenker, 2008).

Alteración de los receptores adrenérgicos

Además de la pérdida neuronal en el LC y la alteración de los niveles de NA, también la expresión y densidad de los receptores adrenérgicos se encuentra alterada en los pacientes con EA (Tabla 4).

El estudio dirigido por Kalaria observó un aumento de la densidad de los receptores $\beta 1$ y $\beta 2$ adrenérgicos en el hipocampo y la corteza frontal de pacientes con EA respecto a individuos sanos (Kalaria et al., 1989). Sin embargo, se encontró una disminución en la densidad de los receptores $\beta 2$ adrenérgicos en la microvasculatura cerebral y de los receptores $\beta 1$ en el putamen (Kalaria et al., 1989). Mientras que otro estudio no encontró diferencias en cuanto a la densidad de los receptores $\beta 1$ adrenérgicos en la corteza entre pacientes con EA y controles (Lemmer et al., 1993).

En cuanto a los receptores α adrenérgicos, diferentes estudios han reportado una disminución en la densidad de los receptores $\alpha 1$ en el córtex prefrontal, el hipocampo y el cerebelo (Kalaria, 1989; Shimohama et al., 1986). Estudios posteriores, demostraron una disminución de los receptores $\alpha 1A$ adrenérgicos en la corteza prefrontal y del receptor $\alpha 1D$ adrenérgico en el hipocampo de pacientes con EA (Szot et al., 2007). Por otro lado, la densidad de los receptores $\alpha 2$ adrenérgicos se encontró incrementada en la corteza, el giro dentado (Ruiz et al., 1993; Szot et al., 2006) y en la microvasculatura cerebral (Kalaria et al., 1989), inervada por las neuronas noradrenérgicas del LC de los pacientes con EA. Sin embargo, otros estudios no encontraron cambios significativos en la densidad de receptores $\alpha 2$ en la corteza, mientras que encontraron una disminución de la densidad de los receptores $\alpha 2$ adrenérgicos en el hipocampo (Pascual et al., 1992) y el núcleo basal de Meynert (NB) (Shimohama et al., 1986) en pacientes con EA.

Tabla 4. Alteración de los receptores adrenérgicos en la enfermedad de Alzheimer.

Referencia	Cohorte	Tipo de muestra	Resultados principales del estudio
(Szot et al., 2007)	C (n= 17)	CPF e HP	↓ Receptores α 1A α 1D adrenérgicos en la EA
	EA (n= 15)		
(Szot et al., 2006)	C (n= 17)	Giro dentado	↑ Receptores α 2 adrenérgicos en la EA
	EA (n= 15)		
(Matthews et al., 2002)	C (n= 33)	HP	No cambios receptores α 2A adrenérgicos en la EA
	EA (n= 46)		
(Ruiz et al., 1993)	C (n= 9)	Córtex	↑ Receptores α 2 adrenérgicos en la EA
	EA (n= 9)		
(Lemmer et al., 1993)	C (n= 9)	HP y cerebelo	No cambios receptores β 1 adrenérgicos en la EA
	EA (n= 8)		
(Pascual et al., 1992)	C (n= 9)	HP	↓ Receptores α 2 adrenérgicos en la EA
	EA (n= 8)		
(Kalaria et al., 1989)	C (n= 24)	CPF y HP	↑ Receptores β 1 y β 2 adrenérgicos en la EA
	EA (n= 27)		
(Kalaria et al., 1989)	C (n= 24)	Putamen y microvasculatura	↓ Receptores β 1 y β 2 adrenérgicos y ↑ receptores α 2 adrenérgicos en la EA
	EA (n= 27)		
(Kalaria et al., 1989)	C (n= 24)	CPF, HP, putamen y cerebelo	↓ Receptores α 1A y α 2 adrenérgicos en la EA
	EA (n= 27)		
(Shimohama et al., 1986)	C (n= 7)	Córtex, HP, cerebelo, NbM	↓ Receptores α 1A y α 2 adrenérgicos en la EA
	EA (n= 7)		

C: control, CPF: corteza prefrontal, EA: enfermedad de Alzheimer, HP: hipocampo, NbM: núcleo basal de Meynert,

Estos cambios en los receptores adrenérgicos podrían compensar la pérdida neuronal y los cambios en los niveles de NA, pero también podrían contribuir a la carga de A β y tau favoreciendo la progresión de la EA (Figura 28).

En un estudio se trató con el agonista β adrenérgico isoproterenol cultivos de células HEK293 y cultivos primarios de células derivadas de hipocampo observándose un aumento de la producción de A β y de la actividad γ -secretasa en ambos tipos celulares (Ni et al., 2006). En este estudio, también se administró NA a ratas mediante inyecciones intracerebroventriculares, provocando un aumento de la actividad γ -secretasa y de la producción de A β en el hipocampo. De acuerdo con lo anterior, la administración crónica de

isoproterenol o clenbuterol, un agonista específico de los receptores β_2 adrenérgicos, a ratones APP/PS1 aumentó la densidad de las placas amiloides, mientras que el tratamiento con el antagonista de los receptores β_2 adrenérgicos ICI 118.551 tuvo el efecto contrario, disminuyendo la densidad de las placas amiloides (Ni et al., 2006). Como complemento a estos resultados, el uso del antagonista β adrenérgico propranolol, redujo la acumulación de A β en cultivos neuronales derivados de los ratones Tg2576 que sobreexpresan APP (Wagner et al., 2012). Además, los análisis *in vivo* realizados en una línea de ratones que muestra un fenotipo de envejecimiento acelerado, conocida como ratón acelerado por la senescencia 8 (SAMP8), demostró que la administración de propranolol durante tres semanas atenúa las alteraciones de la memoria cognitiva y reduce la acumulación de A β y de tau hiperfosforilado (Dobarro, Orejana, Aguirre, & Ramirez, 2013). El tratamiento de ratones Tg2576 con nebovilol, un antagonista del receptor adrenérgico β_1 , redujo la producción de A β (Wang et al., 2013).

Además, diferentes estudios demuestran que el A β puede interaccionar directamente con los receptores β adrenérgicos (Igbavboa et al., 2006; Wang et al., 2011). La unión de A β a los receptores β_2 adrenérgicos puede causar su desensibilización y posteriormente internalización en las neuronas corticales prefrontales (Wang et al., 2011), alterando así la señalización noradrenérgica. En su conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis de que el incremento de la expresión de los receptores β adrenérgicos puede contribuir a la deposición de A β en la EA, mientras que el A β puede a su vez alterar la señalización noradrenérgica.

Por otro lado, los receptores α adrenérgicos también parecen aumentar la producción de A β y mediar sus efectos tóxicos. El tratamiento de ratones APP/PS1 con clonidina, un agonista α_2 adrenérgico, aumenta la deposición de A β (Chen et al., 2014). Mientras que, el uso del antagonista α_2 adrenérgico idazoxan disminuye la carga de A β mejorando los déficits cognitivos (Chen et al., 2014). Zhang y colaboradores demostraron que los oligómeros de A β pueden unirse a un sitio alostérico de los receptores α_2A adrenérgicos (F. Zhang et al., 2020). La unión de los oligómeros amiloides redirige la vía de señalización hacia la activación de GSK3 β , la principal enzima que fosforila tau, aumentando los niveles de tau fosforilada.

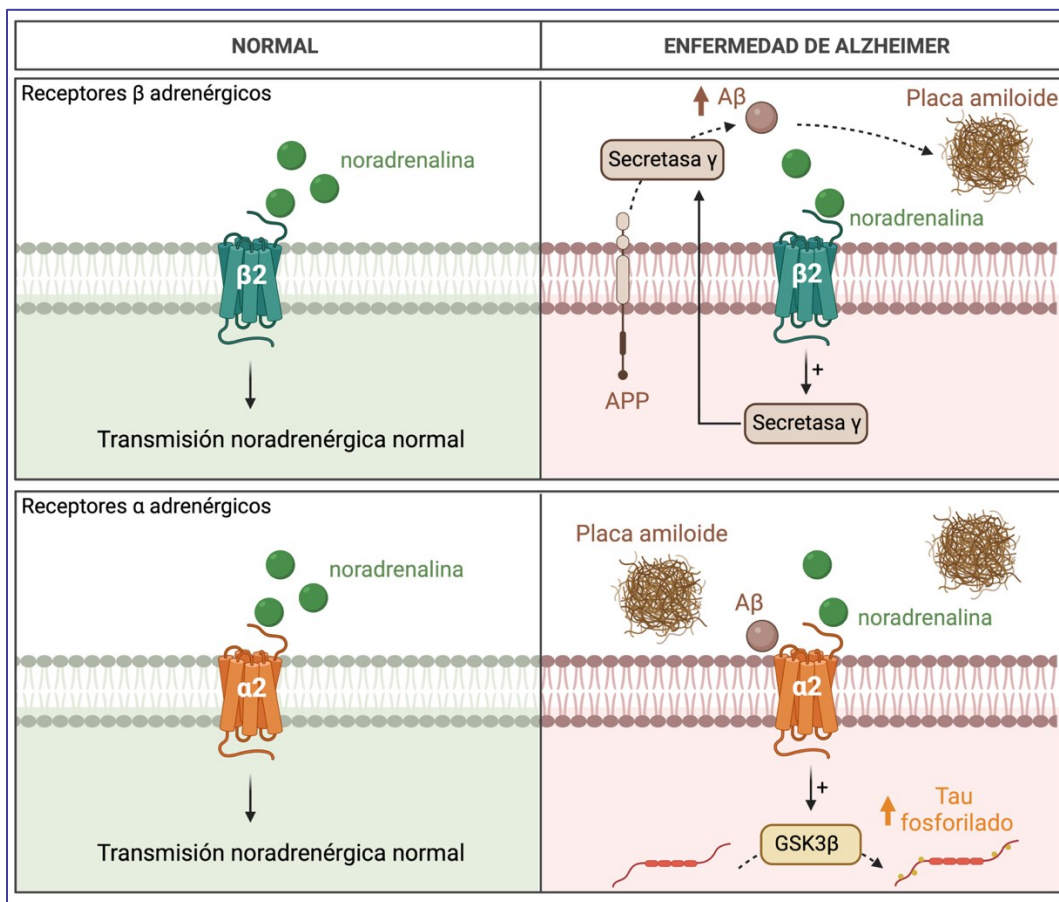


Figura 28. Contribución de los receptores adrenérgicos a la acumulación de A β y tau fosforilado. Los receptores β_2 adrenérgicos pueden activar la γ secretasa incrementando la producción de A β . A β actúa como un modulador alostérico de los receptores α_2 adrenérgicos modulando la vía de señalización hacia la activación de la GSK-3 β y el incremento en la fosforilación de tau.

Así pues, la alteración en la señalización a través de los receptores adrenérgicos, además de alterar la propia señalización noradrenérgica, podría contribuir a la deposición de A β y tau contribuyendo a la progresión de la EA.

3.4.2 Sintomatología de la EA asociada a la disfunción del sistema noradrenérgico.

El sistema noradrenérgico central participa en la modulación de diferentes circuitos corticales y en el control de multitud de funciones cognitivas tales como la memoria episódica, la atención, la ansiedad, el aprendizaje, el estado de ánimo, el ciclo sueño-vigilia y el dolor. Es por ello por lo que, la desregulación que sufre el sistema noradrenérgico a lo largo de la progresión de la EA parece contribuir a la sintomatología que presentan estos pacientes.

Alteraciones de la memoria

Uno de los síntomas y signos tempranos más importantes de la EA son las alteraciones de la memoria episódica (Gold & Budson, 2008). Debido al importante papel que desempeña el

LC en todas las fases de formación y recuperación de la memoria, la degeneración progresiva de las neuronas noradrenérgicas en la EA parece contribuir a las tempranas alteraciones en la memoria episódica que sufren estos pacientes (James et al., 2021). Un estudio reciente demuestra una correlación entre la integridad del LC y el deterioro de la memoria en pacientes de EA (Martin J. Dahl et al., 2022).

Alteraciones de la atención

La atención parece depender especialmente del sistema noradrenérgico. Mientras que la actividad fásica del LC puede promover la atención focalizada o selectiva, la actividad tónica puede producir un estado de alta flexibilidad conductual o exploración (Aston-Jones et al., 1999). Las alteraciones en la atención aparecen de manera muy temprana en la EA (Malhotra, 2019; Perry & Hodges, 1999). De este modo, algunos síntomas iniciales que aparentemente se deben a la pérdida de memoria episódica pueden ser debidos a fallos en los procesos atencionales. Estas alteraciones afectan a la capacidad para orientar la atención hacia los estímulos destacados presentando importantes repercusiones en el desempeño de la vida diaria en los pacientes con EA. En este sentido, los pacientes con EA presentan dificultades en situaciones en las que la orientación y el mantenimiento de la atención son vitales, tales como la capacidad para conducir en una carretera con mucho tráfico (Mather et al., 2016).

Síntomas neuropsiquiátricos

La depresión, la ansiedad y/o la psicosis son algunos de los síntomas neuropsiquiátricos que forman parte de la sintomatología en algunos pacientes de EA (Lanctot et al., 2017). Se encuentran entre los primeros signos y síntomas del deterioro cognitivo incipiente, pero son poco reconocidos y a menudo difíciles de tratar. Los pacientes con antecedentes de depresión tienen menos neuronas en el LC (Forstl et al., 1994), y en la demencia existe una correlación positiva entre la degeneración del LC y la depresión y el comportamiento agresivo (Matthews et al., 2002; Zubenko & Moosy, 1988). La degeneración del LC se cree que contribuye directamente a la elevada comorbilidad con la depresión en los pacientes con EA (Chan-Palay & Asan, 1989; Morgese & Trabace, 2019).

Alteraciones del ciclo sueño-vigilia

La alteración del ciclo sueño-vigilia es bastante frecuente en los pacientes de EA, y en la gran mayoría de los casos precede a los síntomas cognitivos. La alteración de este ciclo da lugar a despertares frecuentes, vagabundeo nocturno y somnolencia diurna excesiva (Oh et al., 2019). La acumulación temprana de NFTs en las neuronas del LC parece llevar a una disrupción del ciclo sueño-vigilia (Oh et al., 2019). De hecho, estudios de RM han demostrado la existencia de una correlación entre los síntomas de los trastornos del sueño y la reducción del volumen del LC (Van Egroo et al., 2021).

Dolor crónico

El dolor crónico es especialmente frecuente en pacientes con trastornos neurodegenerativos como la EA (van Kooten et al., 2016). La disfunción del sistema noradrenérgico promueve la neuroinflamación también en las áreas cerebrales que median el componente afectivo del dolor y la cognición, las cuales influyen tanto en el dolor crónico como en la EA. Mientras que el dolor crónico parece promover la neurodegeneración del LC a través de la reactividad

microglial y la neuroinflamación, por lo que podría acelerar la patogénesis de la EA (Cao et al., 2019).

3.4.3 Disfunción del sistema noradrenérgico en otras enfermedades neurológicas

La pérdida de neuronas noradrenérgicas y/o alteración del sistema noradrenérgico es común en muchas enfermedades neurológicas y contribuye a sus déficits cognitivos y conductuales (Holland et al., 2021).

Demencia frontotemporal (DFT)

La demencia frontotemporal (DFT) es un término clínico que comprende un grupo de enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por déficits progresivos en el comportamiento, la función ejecutiva o el lenguaje, siendo una de las causas de demencia temprana (Bang et al., 2015). Desde el punto de vista patológico, la DFT puede subdividirse en diferentes grupos atendiendo a la patología de tipo proteico, comprendiendo las proteinopatías tau y TDP-43 el 85-95% de los casos de DFT. En un estudio reciente, se encontró una disminución significativa del LC en aquellas personas con DFT en comparación con individuos sanos, siendo esta degeneración del LC más acusada en aquellos casos de DFT que cursan con depósitos de tau en comparación con los casos de TDP-43, de tal modo que, la degeneración del LC podría llegar a usarse como un marcador de diagnóstico diferencial entre estos dos tipos de DFT (Matti et al., 2022).

Enfermedad de Parkinson (EP)

La EP es una enfermedad neurodegenerativa progresiva relacionada con la edad. Aunque se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas nigroestriadas debido principalmente a los acúmulos de la proteína α -syn, su patología también implica la pérdida de neuronas serotoninérgicas y colinérgicas, así como una profunda pérdida de neuronas noradrenérgicas en el LC (Paredes-Rodriguez et al., 2020; Rommelfanger & Weinshenker, 2007; Singh, 2020). Estudios realizados en el año 1983 en una cohorte de pacientes con EP fueron los primeros en demostrar una pérdida neuronal en el LC, concluyendo que la demencia observada en algunos pacientes de la EP podría estar relacionada con la degeneración y el fallo de la función noradrenérgica (Mann & Yates, 1983). En el año 2003, un estudio comparativo con una cohorte de 19 pacientes con EP determinó que la pérdida en las neuronas noradrenérgicas del LC era mayor que la encontrada en otras regiones cerebrales tales como la sustancia nigra (SN) o el núcleo basal de Meynert (NbM) (Zarow et al., 2003). Estudios más recientes observaron que el LC es uno de los lugares donde antes aparecen los acúmulos de α -syn en la EP (Moussaud et al., 2014).

Esclerosis múltiple (EM)

Varios estudios informaron de cambios en los niveles periféricos y cerebrales de NA en pacientes con EM (Barkhatova et al., 1998; Cosentino et al., 2002; Rajda et al., 2006). En una cohorte de pacientes con esclerosis múltiple remitente recidivante (EMRR), los niveles en el LCR del metabolito de la NA metoxihidroxifenilglicol (MHPG) se correlacionaron negativamente con la duración de la enfermedad y el número de recaídas (Markianos et al.,

2009), lo que podría reflejar una disminución de la respuesta del sistema noradrenérgico. Los resultados de un estudio publicado en el año 2011 apoyan la hipótesis de que la desregulación local del apoyo trófico en la médula espinal en los pacientes con EM resulta en un estrés del LC y en la consiguiente disminución de los niveles de NA cerebrales, contribuyendo a una mayor inflamación y una menor neuroprotección (Polak et al., 2011).

Trastorno de déficit de atención e hiperactividad (TDAH)

El TDAH es un trastorno crónico de inicio en la infancia que se caracteriza por un déficit de atención, impulsividad e hiperactividad debido principalmente a una disfunción de la corteza prefrontal modulada por la transmisión noradrenérgica (Mueller et al., 2017). Además, la alteración de las concentraciones de NA y DA en la corteza prefrontal parece también estar implicada en la sintomatología de esta enfermedad (Levy, 2009). La menor disponibilidad del transportador de noradrenalina (NET) parece ser la causa de la disminución en los niveles cerebrales de NA observados en las personas con TDAH (Ulke et al., 2019). De este modo, los tratamientos con agonistas de los receptores α_2 adrenérgicos o inhibidores de la recaptación de NA, como la atomoxetina, han demostrado ser eficaces en el TDAH, debido principalmente a las mejoras en la atención y la memoria, entre otros beneficios cognitivos (Chan et al., 2016; Ozgen et al., 2021).

3.4.4 Vulnerabilidad del Locus coeruleus a la neurodegeneración

La pérdida temprana de las neuronas noradrenérgicas del LC y/o la disfunción del sistema noradrenérgico en las enfermedades neurológicas, especialmente en la EA, sugiere su mayor vulnerabilidad respecto a otros tipos neuronales a los cambios neuropatológicos. Diferentes estudios han descrito que las neuronas noradrenérgicas son especialmente vulnerables a la degeneración debido al estrés oxidativo, a la toxicidad de ciertos metabolitos noradrenérgicos y a su mayor exposición a las toxinas medioambientales y agentes patógenos (Figura 29) (Matchett et al., 2021).

Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es uno de los factores que contribuyen a la vulnerabilidad de las neuronas noradrenérgicas del LC. Estas neuronas presentan una actividad autónoma acompañada de oscilaciones de Ca^{+2} que elevan el estrés oxidativo mitocondrial contribuyendo a su degeneración (Sanchez-Padilla et al., 2014). Además, las neuronas noradrenérgicas del LC tienen axones desproporcionadamente largos y delgados (Braak & Braak, 1996). Por lo tanto, requieren de un alto coste energético para preservar la eficiencia de la conductancia sináptica a lo largo de sus axones, lo que conduce a una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo. Se ha demostrado que el mayor estado oxidativo hace que las neuronas del LC sean más vulnerables al daño por neuroinflamación crónica a través de la activación de la enzima NADPH oxidasa 2 (NOX2) (Wang et al., 2020).

Toxicidad de los metabolitos noradrenérgicos

Investigaciones recientes sugieren que los metabolitos noradrenérgicos también pueden contribuir a la vulnerabilidad del LC y a la neurodegeneración.

El metabolito 3,4-dihidroxifenilglicolaldehído (**DOPEGAL**) parece resultar tóxico a través de su contribución a la agregación de tau en el LC (Kang et al., 2020). Recientemente se ha demostrado que el alelo $\epsilon 4$ de la proteína ApoE (ApoE $\epsilon 4$) puede inducir la oxidación de la NA en DOPEGAL y desencadenar la subsecuente acumulación de tau (Kang et al., 2021). La ApoE $\epsilon 4$ constituye uno de los factores de riesgo más importantes en la EA esporádica. Sin embargo, hasta ahora no se ha establecido ninguna relación entre la ApoE $\epsilon 4$ y la vulnerabilidad del LC. En este estudio se demostró que la ApoE $\epsilon 4$ se une al VMAT2 inhibiendo la captación de la NA. La fuga de NA de las vesículas sinápticas conduce a su oxidación en el metabolito DOPEGAL. Este metabolito tóxico activa la asparagina endopeptidasa (AEP) que escinde la tau y desencadena la neurodegeneración del LC. Además, se ha descrito que el DOPEGAL también puede reaccionar directamente con el residuo Lys353 de la proteína tau estimulando su agregación y propagación (Kang et al., 2022).

Otro de los metabolitos de la NA, es el metoxihidroxifenilglicol (**MHPG**). Niveles altos de MHPG se asociaron a un menor grosor cortical (van Hooren et al., 2021), a unas mayores concentraciones en el LCR de tau fosforilado y A β y a la progresión de la EA (Riphagen et al., 2021). Por lo que, aun desconociéndose el mecanismo exacto de acción, parece que este metabolito podría contribuir a la neurodegeneración del LC y la fisiopatología de la EA.

Otra molécula que podría contribuir a la degeneración del LC es la neuromelanina (**NM**). El LC y la sustancia nigra (SN) constituyen las áreas cerebrales con mayor concentración de NM (Zecca et al., 2004). En 2015 se describió el mecanismo a través del cual la NA y sus metabolitos pueden promover la síntesis de NM (Wakamatsu et al., 2015). Durante el envejecimiento cerebral la NM se acumula en el interior de las neuronas actuando como *quencher* de las moléculas tóxicas, pero también parece contribuir a la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas (Wakamatsu et al., 2015; Zecca et al., 2004). Esto se debe a que, tras la degeneración neuronal, la NM se libera junto con otras moléculas tóxicas activando el sistema inmunitario y exacerbando el estrés oxidativo (Moreno-Garcia et al., 2021).

Toxinas medioambientales y agentes patógenos

Las neuronas noradrenérgicas inervan la mayor parte de la microvasculatura del cerebro, y la NA liberada por las terminales del LC controla el flujo sanguíneo en el sistema nervioso y mantiene la función e integridad de la BHE (Bekar et al., 2012; Raichle et al., 1975). Por lo tanto, la disfunción de la BHE puede aumentar la exposición de los terminales noradrenérgicos a las toxinas de la sangre y agentes patógenos (Pamphlett, 2014). Por otro lado, la cercana proximidad del LC a la pared del cuarto ventrículo aumenta su exposición a las toxinas del LCR y agentes patógenos (Mravec et al., 2014). Finalmente, los axones noradrenérgicos están poco o nada mielinizados (Braak & Braak, 1996), lo que contribuye a exponer el axón a toxinas y otras moléculas patógenas. Por tanto, la mayor exposición de las neuronas noradrenérgicas a toxinas puede contribuir a su disfunción y degeneración. Un ejemplo de ello son los metales pesados, para los que se ha descrito su contribución a la fisiopatología de diferentes enfermedades neurodegenerativas como la EA. Diferentes estudios han descrito que la concentración de metales pesados, como la plata o el mercurio, puede desencadenar la acumulación de tau en las neuronas del LC y su posterior neurodegeneración (Pamphlett et al., 2018).

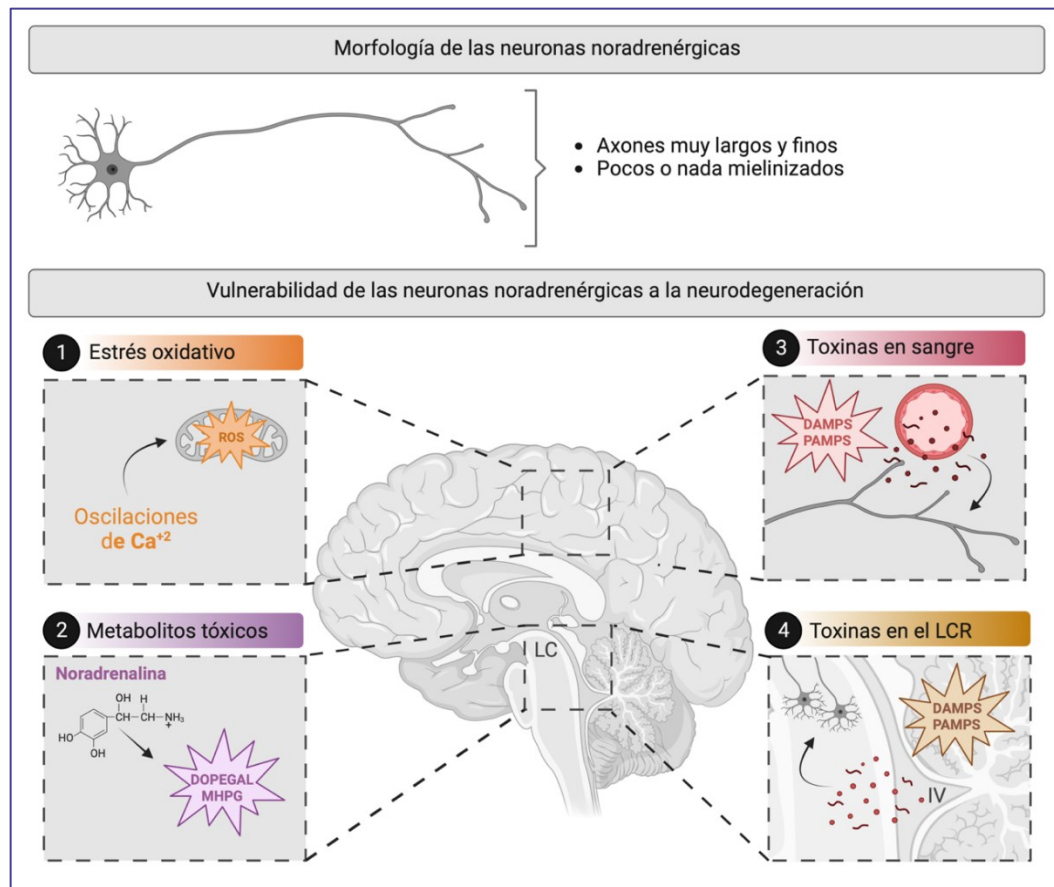


Figura 29. Vulnerabilidad del Locus coeruleus a la neurodegeneración. La morfología de las neuronas noradrenérgicas las hace más vulnerables a diferentes agentes dañinos. 1) Las neuronas noradrenérgicas generan oscilaciones de Ca^{+2} que elevan el estrés oxidativo mitocondrial contribuyendo a su degeneración. 2) Los metabolitos de la noradrenalina como DOPEGAL y MHPG están implicados en la acumulación de tau y neurodegeneración respectivamente. 3) Las neuronas noradrenérgicas intervienen la mayor parte de la microvasculatura cerebral, por lo que están más expuestas a las toxinas y agentes patógenos de la sangre. 4) La cercana proximidad del LC a la pared del cuarto ventrículo aumenta su exposición a las toxinas o agentes patógenos del LCR. LC: locus coeruleus, ROS: especies reactivas de oxígeno, DAMPs: patrón molecular asociado a daño, PAMPs: patrón molecular asociado a patógenos, LCR: líquido cefalorraquídeo.

3.4.5 Degeneración del sistema noradrenérgico en modelos preclínicos de la enfermedad de Alzheimer

La degeneración neuronal noradrenérgica presente en los pacientes con EA también se encontró en los modelos murinos utilizados para estudiar esta enfermedad. La degeneración del LC en ratones APP/PS1 se correlaciona con la neuroinflamación y la activación de la microglía (Cao et al., 2021). Además, en un modelo de rata transgénica de la EA se encontró una deposición temprana de tau hiperfosforilado en el LC (Munoz-Moreno et al., 2018). Por ello, diversos estudios se han centrado en observar la posible conexión entre el daño del LC y la progresión de la EA (Tabla 5).

Neurotoxina del LC: DSP4

La administración del compuesto DSP4 [N-(2-cloroetil)-N-etil-2-bromobencilamina], una neurotoxina selectiva del LC en aves y roedores, es una de las estrategias utilizadas para reproducir la pérdida de neuronas del LC. Tras su inyección intraperitoneal, el DSP4 atraviesa la BHE y se convierte en un derivado que puede ser transportado al interior de los axones noradrenérgicos por el transportador de la NA (NET). Una vez dentro de estas neuronas, el metabolito de DSP4 provoca la destrucción de los terminales neuronales (Ross & Stenfors, 2015). Sin embargo, no todas las áreas cerebrales se ven afectadas por igual. El hipotálamo y el mesencéfalo muestran una mayor reducción de los niveles de NA que otras áreas como la corteza, el hipocampo, el cerebelo o la médula espinal. Además, mientras que la mayoría de las neuronas del LC se ven afectadas por el DSP4, las fibras que se originan en los grupos celulares A1 y A2 no se modifican (Marien et al., 2004). Como resultado, la producción y distribución de la NA se reduce rápidamente. De este modo, la administración de DSP4 puede reproducir algunas de las alteraciones resultantes de la degeneración del LC que se sabe que ocurren en la EA.

La inyección de DSP4 en ratas que recibieron inyecciones intracorticales de A β incrementó la producción de las citoquinas proinflamatorias IL1 β y IL6, así como de otros mediadores inflamatorios como GFAP, NOS2 y COX2 (Heneka et al., 2002). En particular, en los animales tratados con DSP4 se detectó una sobreexpresión de la enzima NOS2 principalmente a nivel neuronal, una alteración también observada en el cerebro de pacientes con EA (Heneka et al., 2001). La administración de DSP4 a ratones APP23 demostró tener efectos detectables 6 meses después. Estos incluían no sólo el aumento de la neuroinflamación, sino también la acumulación de placas amiloides, la pérdida neuronal y la alteración del metabolismo neuronal. También se encontró que los déficits de memoria aumentaban como consecuencia del tratamiento con DSP4 (Heneka et al., 2006). Otros estudios demostraron que la administración de DSP4 provoca la inhibición de la enzima degradadora de A β , la nepriliasina, en otro modelo murino de EA también basado en la sobreexpresión de APP humano (Kalinin et al., 2007). De hecho, los ratones transgénicos con sobreproducción de APP tratados con DSP4 muestran mayores acumulaciones de A β , lo que parece ser consecuencia también de una reducción del reclutamiento de las células de microglía hacia las placas de A β y de una alteración en la fagocitosis de A β (Heneka et al., 2010). Los estudios realizados en ratones APP/PS1 también mostraron una mayor neuroinflamación como resultado de la administración de DSP4 (Jardanhazi-Kurutz et al., 2010; Jardanhazi-Kurutz et al., 2011; Pugh et al., 2007). Recientemente, Flores-Aguilar y colaboradores evaluaron el impacto de la administración de DSP4 antes de la aparición de los depósitos de A β en ratas APPtg. La degeneración temprana del LC, como consecuencia de la administración de la neurotoxina DSP4, agravó la neuroinflamación, los déficits colinérgicos y las alteraciones cognitivas, además de provocar una desregulación de las neurotrofinas, un grupo de proteínas implicadas en la supervivencia neuronal (Flores-Aguilar et al., 2022).

Los efectos del DSP4 también se han evaluado en el modelo de ratón P301S basado en el aumento de la expresión de la proteína tau humana mutante. En este caso, los ratones tratados con DSP4 mostraron un aumento de la neuroinflamación, la neurodegeneración y de los déficits de memoria, llevando a un aumento de la mortalidad (T. Chalermpananupap et al., 2018).

Recientemente, Lannitelli y colaboradores han tratado ratones WT con DSP4 y han observado que en respuesta a la pérdida de neuronas noradrenérgicas en el LC, se incrementó la señalización de la NA lo que se asoció a fenotipos ansiógenos (Lannitelli et al., 2022), modelizando a nivel molecular, celular, sistémico y conductual la EA temprana.

Estos datos confirman que la pérdida de neuronas del LC potencia las alteraciones causadas por los dos principales agentes que contribuyen a la progresión de la EA, a saber, el A β y los NFTs. Sin embargo, el uso de DSP4 tiene ciertas desventajas, ya que suprime no sólo la NA, sino también otros neuromoduladores producidos en el LC, como la galanina o el BDNF, que también se encuentran implicados en la EA (Counts et al., 2008; L. Gao et al., 2022). Además, la lesión de las neuronas causada por el DSP4 podría promover por sí misma respuestas inflamatorias (Wang et al., 2021). Por esta razón, el desarrollo de formas alternativas de simular la degeneración de las neuronas del LC podría dar resultados más fiables.

Ratones dopamina β -hidroxilasa (D β H) Knockout

La D β H, la enzima responsable de la conversión de la dopamina en NA, se localiza en las células cromafines de la médula suprarrenal y en las células noradrenérgicas del LC. La supresión genética de esta enzima constituye una estrategia interesante, ya que resulta en la supresión de la producción de la NA, pero no afecta a otros co-transmisores o a la integridad neuronal. Sin embargo, es escasa la literatura existente sobre el papel de la supresión genética de la D β H en modelos de la EA. Hasta la fecha, tan solo un estudio evaluó los efectos del cruce de ratones APP/PS1 con ratones D β H KO. En este estudio, la ausencia de la enzima D β H resultó en un incremento de los déficits de memoria observados en los ratones APP/PS1 (Hammerschmidt et al., 2013).

Ratones Ear2 Knockout

Los ratones que carecen del receptor nuclear Ear2, necesario para el desarrollo de las neuronas del LC en ratones, muestran una gran reducción en el número de neuronas noradrenérgicas en el LC. De forma consistente, el cruce de ratones Ear2 KO con ratones APP/PS1 también demostró que la depleción de las neuronas noradrenérgicas del LC potencia los déficits de memoria presentes en los ratones APP/PS1 (Kummer et al., 2014).

Uso de B bloqueantes

Otra alternativa para observar los efectos del déficit de la señalización noradrenérgica es el uso de antagonistas de sus receptores. Hay varios antagonistas disponibles para los diferentes tipos de receptores adrenérgicos, y los más relevantes por su uso generalizado son los comúnmente conocidos como betabloqueantes. Estos fármacos son antagonistas específicos de los receptores β adrenérgicos y están indicados para reducir la presión arterial y el tratamiento de diferentes enfermedades cardiovasculares. En este sentido, el tratamiento de ratones transgénicos para APP con el betabloqueante metoprolol, provocó un aumento de la expresión de marcadores inflamatorios, así como un deterioro del comportamiento cognitivo (Evans et al., 2020). Sin embargo, debido al papel de estos receptores en la amiloidogénesis, así como su desregulación en la EA, su inhibición también presenta efectos beneficiosos. Así, el uso clínico de los betabloqueantes se ha asociado con efectos protectores en humanos con respecto al desarrollo de la EA (Rosenberg et al., 2008; Wagner et al., 2012), lo que se discutirá más a fondo en el siguiente apartado.

Tabla 5. Degeneración del LC en modelos preclínicos de la enfermedad de Alzheimer.

Referencia	Modelo animal	Resultados principales del estudio
<i>Neurotoxina del LC: DSP-4</i>		
(Iannitelli et al., 2022)	Ratones WT	Aumento del fenotipo ansioso
(Flores-Aguilar et al., 2022)	Ratas APPtg	Aumento de la neuroinflamación, los déficits colinérgicos y de las alteraciones cognitivas
(T. Chalermphanupap et al., 2018)	Ratones P301S	Aumento en los déficits de memoria, la inflamación, la neurodegeneración y la mortalidad
(Jardanhazi-Kurutz et al., 2011)	Ratones APP/PS1	Aumento de la inflamación y de las placas amiloides
(Jardanhazi-Kurutz et al., 2010)	Ratones APP/PS1	Aumento de las placas amiloides
(Heneka et al., 2010)	Ratones APP V717F	Aumento de las placas amiloides y de la activación glial
(Pugh et al., 2007)	Ratones APP/PS1	Aumento de la inflamación
(Kalinin et al., 2007)	Ratones APP V717F	Aumento de las placas amiloides y de la activación glial
(Heneka et al., 2006)	Ratones APP23	Aumento de la inflamación, las placas amiloides y la pérdida neuronal
(Heneka et al., 2002)	Ratas inyectadas con A β	Aumento de la inflamación
<i>Ratones dopamina β-hidroxilasa (DβH) Knockout</i>		
(Hammerschmidt et al., 2013)	Ratones APP/PS1	Aumento de los déficits de memoria
<i>Ratones Erk2 knockout</i>		
(Kummer et al., 2014)	Ratones APP/PS1	Aumento de los déficits de memoria
<i>Uso de β bloqueantes</i>		
(Evans et al., 2020)	Ratones APPtg	Aumento de la inflamación y de los déficits cognitivos

3.4.6 Farmacología del sistema noradrenérgico: potenciales estrategias terapéuticas

Dado el papel de la NA en la regulación de la neuroinflamación y en la neuroprotección, los fármacos reguladores de la NA podrían contribuir al tratamiento de la patogénesis de la EA. La existencia de diferentes fármacos que actúan sobre la señalización noradrenérgica (Figura 30), actualmente aprobados y utilizados para la depresión y otros trastornos neurológicos, elimina la necesidad de desarrollar nuevas sustancias, así como el largo y costoso proceso necesario para permitir su administración a los pacientes. De este modo, la reutilización de

dichos fármacos podría ser una interesante alternativa o tratamiento coadyuvante a los actuales tratamientos farmacológicos para la EA (Appleby et al., 2013; Behl et al., 2022; T. Chalermphanupap et al., 2013; David & Malhotra, 2022). Los datos de los estudios preclínicos (Matchett et al., 2021), así como los ensayos clínicos recientes (Levey et al., 2022), muestran un papel protector de las terapias con NA (Tabla 6) y confirman los efectos antiinflamatorios y neuroprotectores de la NA demostrados previamente por los estudios *in vitro*.

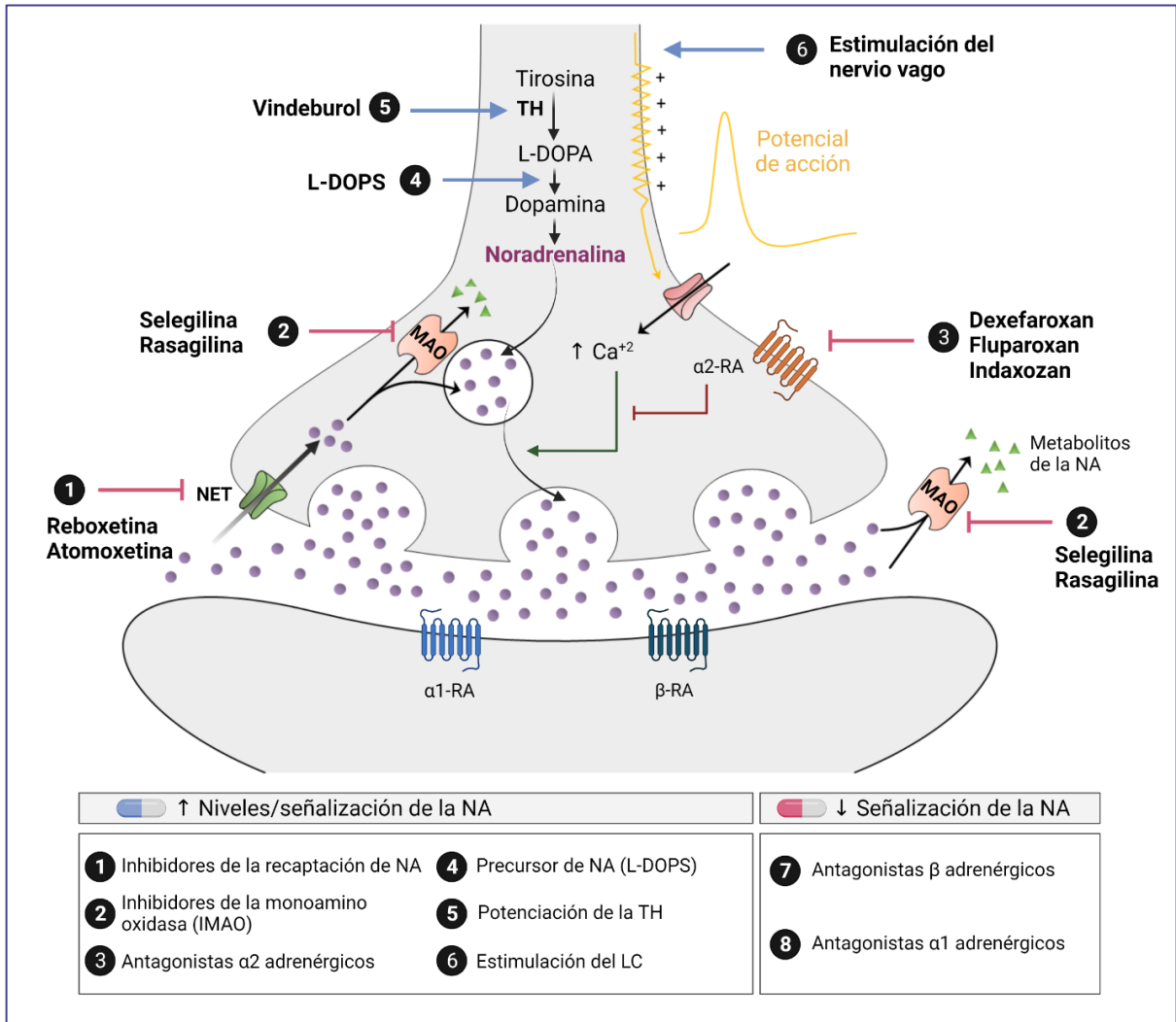


Figura 30. Farmacología del sistema noradrenérgico. Figura modificada del artículo: (Gutierrez et al., 2022). α1-RA: receptor α1 adrenérgico, α2-RA: receptor α2 adrenérgico, β-RA: receptor β adrenérgico, LC: locus coeruleus, MAO: monoamino oxidasa, NA: noradrenalina, NET: transportador específico de noradrenalina, TH: tirosina hidroxilasa.

Inhibidor de la recaptación de noradrenalina (NET)

La administración de desipramina y atomoxetina, inhibidores de la recaptación de NA, en ratas inyectadas intraperitonealmente con el lipopolisacárido (LPS) redujo la expresión de las citoquinas proinflamatorias IL1β y TNFα, así como de la enzima NOS2 y de los marcadores

de activación microglial CD11b y CD40 en la corteza cerebral (O'Sullivan et al., 2009). La desipramina y la atomoxetina también redujeron la expresión de las quimioquinas CXCL10 y CCL5, así como de la molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1) y de la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) en corteza e hipocampo (O'Sullivan et al., 2010). Este tipo de estrategia farmacológica ha sido una de las primeras en probarse en pacientes con DCL. El tratamiento con atomoxetina en estos pacientes redujo los niveles tau fosforilado y normalizó los biomarcadores de la función sináptica, el metabolismo cerebral y la inmunidad glial en muestras de LCR, además de mejorar la actividad cerebral y el metabolismo en circuitos cerebrales claves en la fisiopatología de esta demencia (Levey et al., 2022). Además, el metilfenidato, un inhibidor de la recaptación de noradrenalina-dopamina (NDRI), mejora la apatía y la atención en los pacientes con EA (Lanctot et al., 2014).

Inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAO)

Los IMAO son el tipo más antiguo de antidepresivos y una estrategia alternativa para elevar los niveles de NA en el cerebro. Por esta razón, cabe esperar que su administración tenga algún efecto sobre la progresión de la EA (Appleby et al., 2013; Kim et al., 2013). Además, la activación de la MAO se ha relacionado con la EA y las formas activadas de estas enzimas se consideran biomarcadores de esta enfermedad (Kennedy et al., 2003). Tsunekawa y colaboradores demostraron que el tratamiento con selegilina a ratones que habían sido inyectados con el fragmento 25-35 de A β mejoró las alteraciones cognitivas que presentaban estos ratones (Tsunekawa et al., 2008). La experiencia acumulada en la prescripción de ciertos IMAO para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, facilitó la evaluación de su potencial terapéutico en la EA. Sin embargo, un metaanálisis realizado en el año 2002 concluyó que aunque el tratamiento con selegilina produce una mejora a corto plazo en la cognición y las actividades de la vida diaria, la magnitud del efecto no alcanza importancia clínica y no hay evidencia de efectos a largo plazo (Wilcock et al., 2002). En el año 2021 se realizó un ensayo clínico en una cohorte de 50 pacientes con EA leve y moderada con el fin de evaluar los efectos del tratamiento con rasagilina (Matthews et al., 2021). Los resultados del estudio demuestran una mejora en el metabolismo cerebral en aquellos pacientes tratados con rasagilina en comparación con aquellos tratados con placebo, así como una mejora en la calidad de vida y una disminución de los síntomas neuropsiquiátricos (Matthews et al., 2021).

Antagonistas adrenérgicos α 2

Los receptores adrenérgicos α 2 presinápticos median un bucle de retroalimentación negativa a través del cual la NA regula su propia secreción. Por lo tanto, la administración de antagonistas α 2 adrenérgicos aumenta la liberación de NA en el SNC. El tratamiento con el antagonista α 2 adrenérgico dexefaroxán promueve en ratas la supervivencia a largo plazo de las neuronas, reduciendo su apoptosis (Rizk et al., 2006). Se ha propuesto que la inducción de la IL10 contribuye a las acciones neuroprotectoras de estos antagonistas α 2 adrenérgicos (McNamee, Ryan, Griffin, et al., 2010). La administración de fluparoxán a ratones transgénicos APP/PS1 redujo los déficits de memoria, a pesar de no detectarse diferencias significativas en la acumulación de A β ni en la astrogliosis (Scullion et al., 2011). Sin embargo, el tratamiento con el antagonista indazoxán, en el mismo tipo de ratones transgénicos, redujo los niveles cerebrales de A β 40 y A β 42 y los depósitos de amiloide (Chen et al., 2014).

L-DOPS

L-treo-3,4-dihidroxifenilserina (L-DOPS) es un precursor de la NA, por lo que su administración periférica incrementa los niveles de NA cerebrales (Thomas et al., 1998). La administración de este compuesto a ratones transgénicos de APP incrementó la migración microglial hacia las placas de A β y su fagocitosis (Heneka et al., 2010). Además, el L-DOPS redujo los déficits de memoria y la activación de los astrocitos en el modelo de amiloidosis murino 5xFAD e indujo la expresión de varios factores neurotróficos y de enzimas implicadas en la degradación de A β , como la neprilisina y la enzima degradante de la insulina (Kalinin et al., 2012).

Potenciación de la tirosina hidrolasa (TH)

El vindeburnol es un derivado semisintético del alcaloide vegetal vincamina que actúa aumentando la expresión y actividad de la TH (Garcia et al., 1994), enzima implicada en la síntesis de la NA. Curiosamente, el vindeburnol reactiva la expresión de la TH que se pierde durante el desarrollo en ciertas neuronas del LC (Bezin et al., 2000). En ratones 5xFAD, el tratamiento con vindeburnol redujo la acumulación de placas de A β , indujo la expresión de BDNF (Braun et al., 2014) y evitó algunas alteraciones conductuales características de estos ratones (Braun & Feinstein, 2019).

Estimulación del LC

Una forma alternativa de potenciar la actividad de las neuronas del LC es mediante la estimulación del nervio vago. Esta técnica utiliza dispositivos que se conectan al nervio vago y generan impulsos eléctricos que funcionan como señales transmitidas a través del nervio a ciertas áreas cerebrales, incluyendo el LC, constituyendo una terapia alternativa para la EA (Vargas-Caballero et al., 2022). En estudios con ratas la estimulación del nervio vago aumentó los niveles cerebrales de NA y la expresión de BDNF (Follesa et al., 2007). La estimulación del nervio vago ha demostrado su eficacia en otras enfermedades neurológicas como la epilepsia, la depresión y algunos tipos de dolor. Por este motivo, se probó en pacientes con EA. Los resultados del primer estudio piloto demuestran que la estimulación del nervio vago fue bien tolerada por los pacientes, mientras que sus efectos secundarios fueron leves y transitorios y, lo que es más interesante, provocó una mejora significativa en diferentes pruebas neuropsicológicas (Sjogren et al., 2002) lo cual persistió un año después de la estimulación (Merrill et al., 2006). Aunque todavía no se ha probado en humanos, la potenciación de la actividad del LC también se ha realizado en ratas mediante la activación quimiogénica a través del uso de receptores de diseño activados exclusivamente por un fármaco de diseño (DREADDs). Así, las alteraciones del aprendizaje observadas en ratas TgF344-AD se redujeron cuando se estimuló el LC a través de DREADDs (Rorabaugh et al., 2017).

Betabloqueantes

Debido al papel que los receptores β adrenérgicos juegan en la acumulación del A β , su bloqueo podría constituir una interesante diana terapéutica para disminuir los acúmulos de amiloide. En este sentido, el tratamiento con nebivolol, un antagonista del receptor β 1 adrenérgico, en ratones Tg2576 con neuropatología amiloide redujo significativamente el contenido amiloide del cerebro aunque sin proporcionar ninguna mejora sobre la función cognitiva (Wang et al., 2013). El tratamiento con propranolol, antagonista de los receptores β 2

adrenérgicos y comúnmente utilizado como fármaco antihipertensivo, en ratones SAMP8, que presentan altos niveles de A β 42 en el hipocampo, fosforilación de tau y deterioro cognitivo, disminuyó los niveles de A β y tau y restauró los déficits cognitivos (Dobarro, Orejana, Aguirre, & Ramírez, 2013).

Además, debido al uso generalizado de los fármacos betabloqueantes para controlar la hipertensión, se dispone de una gran cantidad de datos, lo que ha permitido realizar varios estudios de base poblacional que reclutan a pacientes tratados durante periodos relativamente largos, lo que ha demostrado el potencial de los fármacos betabloqueantes en la prevención y reducción de la fisiopatología de la EA (Law & Yeong, 2021; Yu et al., 2011). De este modo, el uso de antagonistas del receptor β 2 adrenérgico se correlaciona con una menor incidencia de la EA entre los pacientes con hipertensión (Hajjar et al., 2005; Khachaturian et al., 2006; Rosenberg et al., 2008). Un estudio centrado en el tratamiento con betabloqueantes durante tres años antes del desarrollo de la EA, encontró que el tratamiento con betabloqueantes se asocia con una reducción de las probabilidades de desarrollar demencia (Wagner et al., 2012). Pero además de reducir la incidencia de la EA, diferentes estudios han demostrado que los betabloqueantes son efectivos frente al tratamiento de parte de la sintomatología de la EA. En este sentido, el tratamiento con propanolol redujo la agresión y la agitación en pacientes con demencia senil (Peskind et al., 2005; Shankle et al., 1995; Summers, 2006; Weiler et al., 1988).

Por otro lado, los betabloqueantes incrementan el flujo del LCR lo que podría mejorar el aclaramiento cerebral de metabolitos tóxicos que se acumulan en la patología de la EA. En este sentido un estudio en una cohorte de más de 69 mil individuos determinó que los betabloqueantes altamente permeables a la BHE se asocian con un menor riesgo de EA en comparación con los de baja permeabilidad, siendo este efecto específico para el diagnóstico de EA y no extendiéndose a la demencia en general (Beaman et al., 2022). Estos hallazgos sugieren que el bloqueo de los receptores β adrenérgicos puede disminuir la incidencia de la EA, así como tratar parte de su sintomatología. Sin embargo, se ha visto que diferentes factores pueden contribuir a la modulación del bloqueo de estos receptores tales como los síntomas conductuales, el sexo o los factores genéticos, como las variantes del receptor β adrenérgico, la apolipoproteína E y el citocromo P450 y P2D6 (Luong & Nguyen, 2013). Por tanto, es necesaria una mejor caracterización de los efectos del uso de los betabloqueantes en la EA, con el fin de garantizar su eficacia farmacológica.

Tabla 6. Farmacología del sistema noradrenérgico en modelos preclínicos.

Referencia	Modelo animal	Resultados principales del estudio
<i>Inhibidor de la recaptación de noradrenalina (NET)</i>		
(O'Sullivan et al., 2010)	Ratas inyectadas con LPS	Disminución de la inflamación
(O'Sullivan et al., 2009)	Ratas inyectadas con LPS	Disminución de la inflamación, activación de las células T y de las moléculas de adhesión celular
<i>Inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAO)</i>		
(Tsunekawa et al., 2008)	Ratones inyectados con A β	Mejora de las alteraciones cognitivas
<i>Antagonistas adrenérgicos α2</i>		
(Chen et al., 2014)	Ratones APP/PS1	Disminución de los depósitos de amiloide
(Scullion et al., 2011)	Ratones APP/PS1	Disminución de los déficits en la memoria de trabajo espacial
(Rizk et al., 2006)	Ratas WT	Aumento de la supervivencia neuronal
<i>L-DOPS</i>		
(Kalinin et al., 2012)	Ratones 5xFAD	Aumento de la expresión de factores neurotróficos y de las enzimas de degradación de A β
(Heneka et al., 2010)	Ratones APP V717F inyectados con DSP-4	Recuperación de las funciones de las células microgliales
<i>Potenciación de la tirosina hidrolasa (TH)</i>		
(Braun & Feinstein, 2019)	Ratones 5xFAD	Previene las alteraciones comportamentales
(Braun et al., 2014)	Ratones 5xFAD	Disminución de los depósitos de amiloide y aumento de BDNF
<i>Estimulación del LC</i>		
(Rorabaugh et al., 2017)	Ratas TgF344	Reducción de las alteraciones en el aprendizaje
(Follesa et al., 2007)	Ratas WT	Aumento de los niveles de NA, BDNF y bFGF
<i>Betabloqueantes</i>		
(Wang et al., 2013)	Ratones Tg2576	Disminución de los depósitos de amiloide
(Dobarro, Gerenu, et al., 2013)	Ratones SAMP8	Disminución de los niveles de A β y tau y restauración de los déficits cognitivos

LC : locus coeruleus, LPS : lipopolisacárido. NA : noradrenalina.

3.5 QUIMIOQUINA CCL2 EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Las quimioquinas pueden regular la migración microglial y el reclutamiento de astrocitos a la zona de neuroinflamación, y por lo tanto ser responsables de la extensión de la inflamación local. Sin embargo, también se ha descrito un papel antiinflamatorio y neuroprotector de las mismas. Es por ello por lo que, su contribución perjudicial o beneficiosa en la fisiopatología de la EA sigue siendo objeto de investigación (Azizi et al., 2014).

En los pacientes con EA, la vía CCL2/CCR2 está relacionada con el desarrollo de la neuroinflamación durante la progresión de la enfermedad. Los niveles de CCL2 se encuentran aumentados en el tejido cerebral (Sokolova et al., 2009), en el LCR (Nordengen et al., 2019) y en el plasma (Lee et al., 2018; Zhang et al., 2013) de pacientes con EA. Aunque varios estudios muestran que los niveles de CCL2 no se encuentran aumentados en pacientes con EA grave (Galimberti et al., 2006; Nordengen et al., 2019), lo que sugiere que el aumento de los niveles de CCL2 podría estar restringido a las primeras etapas de la EA. Por otro lado, CCL2 se acumula en las proximidades de las placas de A β en cerebros humanos (Ishizuka et al., 1997). De este modo, CCL2 podría ayudar a la migración de las células hacia las placas de A β con el fin de aislarlas y reducir su toxicidad. Sin embargo, la sobreproducción de CCL2, como ocurre con otros muchos mediadores inflamatorios, puede convertirse en un factor añadido que amplía el daño causado inicialmente por el A β (Severini et al., 2014).

En cultivos celulares el uso del inhibidor de CCL2 Bindarit reduce el daño neuronal producido por A β en cultivos neuronales primarios mixtos (Severini et al., 2014). En los modelos de ratón de la EA, la vía de señalización CCL2/CCR2 parece contribuir a la respuesta inflamatoria. Así, la sobreexpresión de CCL2 en modelos de amiloidosis aumenta la concentración y agregación de A β y acelera el deterioro cognitivo (Kiyota et al., 2009; Yamamoto et al., 2005). Por otro lado, CCL2 aumenta los niveles de ApoE, vinculado con el depósito de A β , por lo que podría participar en la oligomerización de A β , la microgliosis y el deterioro cognitivo acelerado de la EA (Kiyota et al., 2009). En base a estos datos, CCL2 podría constituir una interesante diana terapéutica ya que su inhibición podría disminuir la producción y acumulación de A β reduciendo el daño asociado a la EA. Sin embargo, CCL2 también es crucial para la migración de astrocitos, microglía y otros tipos de células hacia las placas A β . Estas células pueden reducir el daño neuronal participando en la degradación de las placas de A β (Ries & Sastre, 2016). En este sentido, la delección genética de CCL2 o de su receptor, CCR2, en ratones transgénicos APPS/PS1 (Naert & Rivest, 2011) o APP (Kiyota et al., 2013), provoca el agravamiento de la fisiopatología presente en estos ratones. La deficiencia de señalización CCL2/CCR2 resulta en el aumento de las placas A β , la disfunción neurocognitiva y la reducción de la neurogénesis, ya que impiden la acumulación microglial y la eliminación de A β (El Khoury et al., 2007; Naert & Rivest, 2011).

ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4 ANTECEDENTES, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 ANTECEDENTES INMEDIATOS

La alteración del sistema noradrenérgico y de los niveles de NA es un fenómeno asociado a múltiples enfermedades neurodegenerativas especialmente la EA (Marien et al., 2004). Diferentes estudios han demostrado el potencial neuroprotector de la NA a través de la inhibición de la producción de moléculas proinflamatorias y la inducción de la expresión de factores neurotróficos (Feinstein et al., 2002; Madrigal et al., 2005; Marien et al., 2004). A su vez, varios estudios han determinado que la NA ejerce un importante control en la activación de células gliales como la microglía (Dello Russo et al., 2004) y los astrocitos (Braun et al., 2014), los cuales juegan un importante papel en la fisiopatología de la EA (Kinney et al., 2018). La neurodegeneración del LC, así como el bloqueo de las acciones de la NA han demostrado incrementar la fisiopatología de modelos de EA a través de un aumento de la neuroinflamación y reactividad glial (T. Chalermpanupap et al., 2018; Evans et al., 2020; Heneka et al., 2002; Heneka et al., 2006; Jardanhazi-Kurutz et al., 2010; Kalinin et al., 2007; Kummer et al., 2014; Pugh et al., 2007). Mientras que el restablecimiento de los niveles homeostáticos de NA a través de diversas estrategias terapéuticas ha demostrado poseer una función antiinflamatoria y neuroprotectora en diferentes modelos de EA (Braun & Feinstein, 2019; Braun et al., 2014; T. Chalermpanupap et al., 2013; Heneka et al., 2010; Kalinin et al., 2012). Sin embargo, la mayoría de las terapias con eficacia demostrada en modelos animales de la EA no han llegado a proporcionar un beneficio eficaz en pacientes con la EA, quizá debido a que los modelos animales tan sólo presentan algunos aspectos de esta patología (Drummond & Wisniewski, 2017). Por lo tanto, para determinar el posible efecto terapéutico del mantenimiento de los niveles fisiológicos de la NA en pacientes, es esencial la confirmación de los hallazgos obtenidos en modelos animales en modelos humanos. En este sentido, las células derivadas de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) humanas constituyen una excelente herramienta para la modelización de los aspectos moleculares y celulares de diferentes enfermedades humanas, incluidas las neurodegenerativas y, en concreto, la EA (Abud et al., 2017; J. Penney et al., 2020). Hasta la fecha, ningún estudio ha evaluado los efectos de la NA en células derivadas de iPSCs humanas.

4.2 HIPÓTESIS

Sobre la base de los antecedentes descritos anteriormente, se propuso la siguiente hipótesis:

“El mantenimiento de los niveles homeostáticos de la NA en el SNC, debido a sus efectos neuroprotectores y antiinflamatorios, disminuye la fisiopatología de la enfermedad de Alzheimer (EA), estando parte de estos efectos mediados a través de la regulación de la actividad de las células gliales”

4.3 OBJETIVOS

Teniendo en cuenta la hipótesis de partida mencionada anteriormente, se propusieron los siguientes objetivos generales y específicos con el fin de verificar la validez de la hipótesis propuesta.

4.3.1 Objetivos generales

- Analizar los efectos de la inhibición de la recaptación de la NA y de la supresión genética de CCL2 en el modelo murino 5xFAD de la EA (modelo de amiloidosis).
- Analizar los efectos de la quimioquina CCL2 en la resolución de la inflamación en cultivos primarios de astrocitos.
- Analizar los efectos de la inhibición de la recaptación de la NA en el modelo murino P301S de la EA (modelo de taupatía).
- Analizar los efectos de la NA sobre la respuesta inflamatoria y capacidad fagocítica de cultivos de células de microglía derivadas de iPSCs humanas.

4.3.2 Objetivos específicos

Efecto del tratamiento con reboxetina y de la supresión de CCL2 en el modelo murino 5xFAD de la enfermedad de Alzheimer

- Analizar los efectos del tratamiento con reboxetina, inhibidor de la recaptación de NA, en ausencia y presencia de CCL2 y de la supresión genética de CCL2 en el modelo murino de amiloidosis 5xFAD sobre la:
 - Memoria de trabajo espacial.
 - Expresión y síntesis de marcadores proinflamatorios.
 - Reactividad glial.
 - Acumulación de placas amiloides.
 - Degeneración axonal y muerte celular.

Efecto de la quimioquina CCL2 en la resolución de la inflamación

- Analizar los efectos de la quimioquina CCL2 sobre la vía de la resolvina D1 (RvD1) implicada en la resolución de la inflamación:
 - Analizar los efectos de la supresión genética de CCL2 en el modelo murino de amiloidosis 5xFAD sobre la expresión de las enzimas de síntesis y receptores de la RvD1.
 - Analizar el efecto de la quimioquina CCL2 sobre la expresión de las enzimas de síntesis y receptores de la RvD1 y de la expresión y síntesis de marcadores proinflamatorios en cultivos primarios de astrocitos.

Efecto del tratamiento con reboxetina en el modelo murino P301S de la enfermedad de Alzheimer

- Analizar los efectos del tratamiento con reboxetina en el modelo murino de taupatía P301S sobre la:

- Memoria de trabajo espacial.
- Expresión de marcadores proinflamatorios.
- Reactividad glial.
- Acumulación de tau fosforilada.
- Pérdida neuronal.

Efecto del tratamiento con noradrenalina en células de microglía derivadas de iPSCs humanas

- Analizar los efectos de la noradrenalina sobre la respuesta inflamatoria producida por el tratamiento con LPS y ATP en las células de microglía derivadas de iPSCs humanas.
- Analizar los efectos de la noradrenalina sobre la respuesta fagocítica de células de microglía derivadas de iPSCs humanas.

MATERIAL Y MÉTODOS

5 MATERIAL Y MÉTODOS

Con el fin de alcanzar los objetivos anteriormente mencionados se utilizaron los materiales y métodos descritos a continuación.

5.1 MODELOS ANIMALES

Todos los protocolos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices estipuladas por el Comité de Bienestar Animal de la Universidad Complutense de Madrid, España (PROEX 174/18 y 052/17), de acuerdo con las leyes de la Unión Europea (2010/63/UE). Se hizo todo lo posible para minimizar el sufrimiento de los animales y reducir el número de animales utilizados.

En el apartad de Anexos se adjuntan los Certificados de los Cursos de Formación realizados por la autora de esta tesis doctoral: Cuidado, realización de procedimiento y sacrificio de roedores.

5.1.1 Modelos murinos

Se utilizaron ratones WT, 5xFAD, CCL2 KO y P301S obtenidos de *Jackson Laboratory* fondo C57BL/6, Bar Harbor, ME, USA. Todos los animales se alojaron en jaulas (3-4 ratones) bajo condiciones estándar de temperatura y humedad y un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas con libre acceso a agua y comida.

Modelo murino 5xFAD de la enfermedad de Alzheimer (modelo de amiloidosis)

Los ratones 5xFAD también conocidos como Tg6799, cepa B6;Cg-Tg (APP^{SwFILon}, PSEN1^{M146L*L286V}) 6799Vas/Mmjax, se mantuvieron durante más de 10 generaciones en estado hemizigótico sobre un fondo C57BL/6.

Los ratones 5xFAD se han desarrollado basándose en la hipótesis del A β y el descubrimiento de mutaciones presentes en la EA familiar. Este modelo es un modelo de ratón transgénico doble APP/PS1 ya que expresa 5 mutaciones que causan la sobreexpresión tanto de APP humana como de la PS1 humana. La expresión de APP humana se debe a tres mutaciones presentes en la EA familiar: Sueca (K670N, M671L), Florida (I716V) y London (V717I). La sobreexpresión de PS1 en humanos está causada por dos mutaciones presentes en la EA familiar: M146L y L286V. La expresión de ambos transgenes está bajo el control del promotor murino Thy-1 para impulsar la sobreexpresión en el SNC.

Debido a la presencia de estas mutaciones, los ratones 5xFAD expresan rasgos acelerados de EA como placas A β (específicamente se promueve la formación de A β 42 debido a las mutaciones Florida, London, M146L y L286V) y neurodegeneración. Por tanto, los ratones 5xFAD constituyen un modelo útil para el estudio de la neurodegeneración inducida por A β 42 y la formación de placas amiloides.

Los ratones 5xFAD comienzan a presentar placas amiloides a los dos meses de edad. Esta aparición temprana va acompañada de astrogliosis y microgliosis, así como de una

degeneración sináptica dependiente de la edad (Oakley et al., 2006). Los ratones 5xFAD también presentan deficiencias conductuales como reducción de la memoria de trabajo espacial (Oakley et al., 2006), alteraciones en el condicionamiento contextual del miedo, escaso reconocimiento de objetos nuevos o una menor interacción social (Kimura & Ohno, 2009).

En la Figura 31 se resume la progresión fisiopatológica del modelo murino 5xFAD.

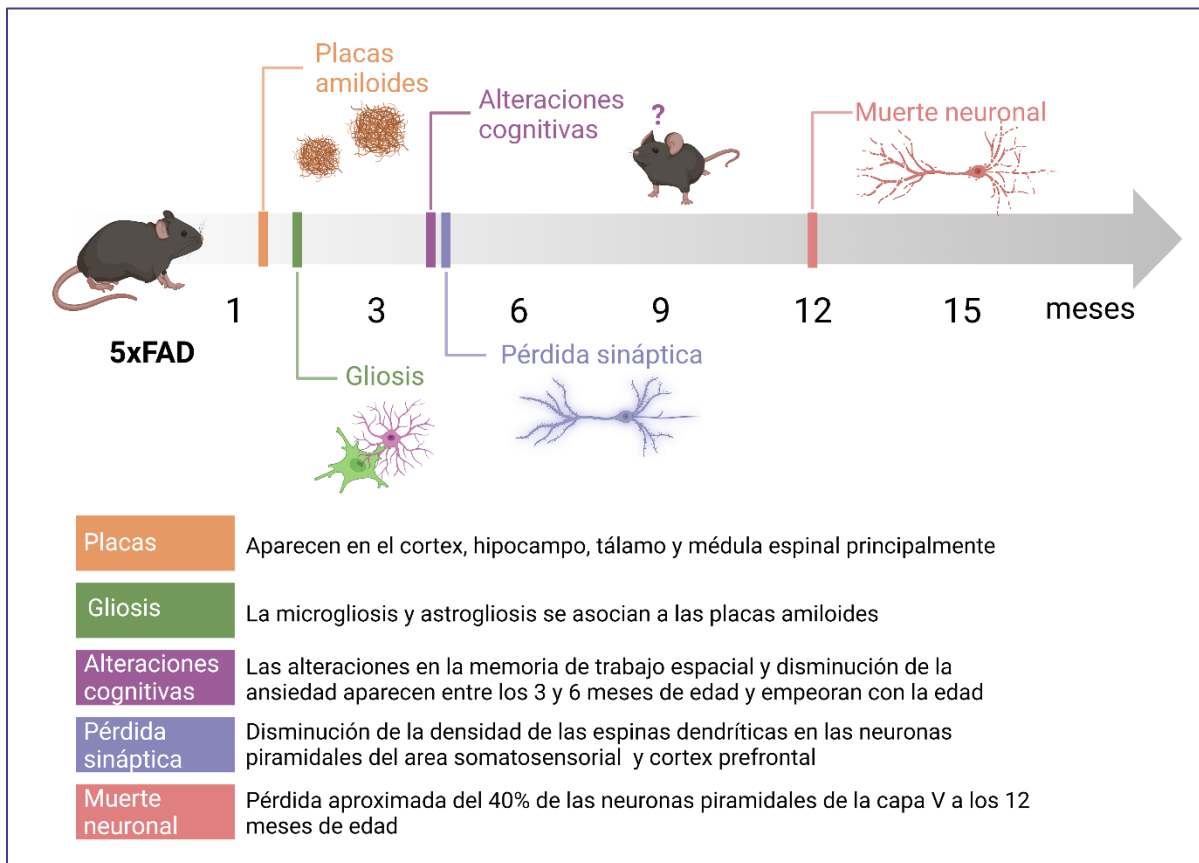


Figura 31. Progresión de las características fisiopatológicas del modelo murino 5xFAD de la enfermedad de Alzheimer (modelo de amiloidosis).

Modelo murino CCL2 KO

Los ratones CCL2 KO, también conocidos como ratones MCP-1^{-/-}, cepa B6.129S4-Ccl2^{tm1Roj/J}, tienen un casete neo que sustituye al exón 2 del gen de la quimioquina CCL2. Por lo tanto, la proteína CCL2 no es funcional en estos ratones transgénicos. Los ratones 5xFAD hemigóticos (5xFAD^{+/-}) se cruzaron con ratones CCL2 KO homocigóticos (CCL2^{-/-}). Los ratones 5xFAD^{+/-}/CCL2^{+/-} resultantes se cruzaron con ratones CCL2 KO para generar ratones 5xFAD^{+/-}/CCL2 KO.

Modelo murino P301S de la enfermedad de Alzheimer (modelo de taupatía)

Los ratones P301S, cepa B6;C3-Tg(Prnp-MAPT*P301S)PS19Vle/J, se mantuvieron durante más de 10 generaciones en estado hemigigótico sobre un fondo C57BL/6. Los machos P301S se cruzaron con hembras WT con el fin de mantener la línea. Estos ratones no pueden ser criados hasta alcanzar homocigosis ya que las hembras homocigóticas no se aparean.

Este tipo de ratones transgénicos se han desarrollado basándose en las lesiones neurofibrilares encontradas en los pacientes con EA y otras taupatías. Los ratones transgénicos P301S expresan la forma mutante P301S de la proteína humana tau, bajo la dirección del promotor de la proteína priónica de ratón (Prnp). Debido a esta mutación, los ratones P301S acumulan con la edad la proteína tau humana mutante hiperfosforilada e insoluble en el cerebro causando una disminución de su unión a los microtúbulos y la formación de NFTs. Los NFTs detectados en estos ratones son similares a los encontrados en pacientes con EA y otras tauopatías. De este modo, estos ratones son útiles para estudiar los NFTs, tauopatías neurodegenerativas y la EA.

Debido a esta mutación, sobre los tres meses de edad, los ratones transgénicos muestran una retracción de las extremidades cuando se les levanta la cola, lo que progresa hacia la debilidad de las extremidades. El análisis histológico revela una defectuosa translocación de las proteínas del retículo endoplásmico en las neuronas a esta edad, como consecuencia de la disminución de la unión de tau a los microtúbulos. A los cinco meses, comienzan a observarse NFTs en el neocórtex, la amígdala, el hipocampo, el tronco cerebral y la médula espinal, acompañado de una neuroinflamación y reactividad glial llevando a una degradación de la función sináptica significativa a los seis meses de edad. A los ocho meses, comienza la degeneración neuronal en el hipocampo y la atrofia cerebral, debido a la dilatación ventricular, y progresa hacia una degeneración neuronal significativa en el hipocampo a los nueve meses de edad. A los diez meses de edad, los ratones ya muestran una espalda encorvada y parálisis, seguida de incapacidad para alimentarse. La pérdida de neuronas se extiende a la amígdala, el neocórtex y el córtex entorrinal a los 12 meses de edad (revisado en Yokoyama et al., 2022).

En la [Figura 32](#) se resume la progresión de las características fisiopatológicas del modelo murino P301S.

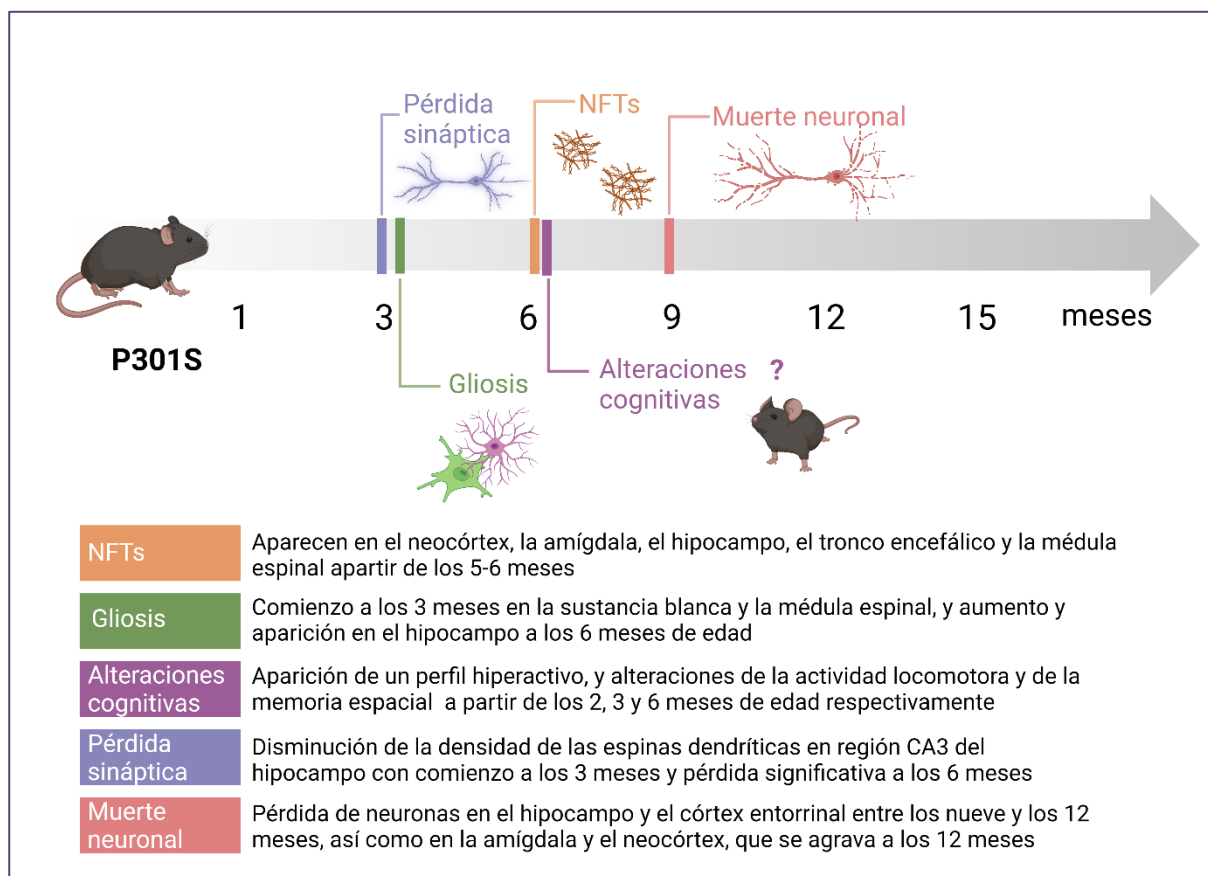


Figura 32. Progresión de las características fisiopatológicas del modelo murino P301S de la enfermedad de Alzheimer (modelo de tauopatía).

5.1.2 Ratas Wistar

Se han utilizado ratas Wistar (Harlan Iberian) hembras de entre 2 y 3 meses de edad y con pesos de 250-350 g embarazadas. Las crías de 1-2 días de edad se han utilizado para la obtención de cultivos primarios de células gliales.

5.2 GENOTIPADO

Para el mantenimiento de las líneas 5xFAD, CCL2 KO y P301S, así como para la determinación del genotipo de los ratones obtenidos como resultado del cruce entre ratones 5xFAD heterocigotos y CCL2 KO homocigotos, se tomaron cortes de la cola de ratón (< 2 mm) con el fin de obtener muestras de DNA. Las muestras de cola se homogenizaron mediante Tail Buffer [Tris 1M, EDTA 5 mM y Tween 10% en agua más dietil-pirocarbonado, (DEPC) libre de DNAsas y RNAsas, de Invitrogen®] a 55 °C durante 18 horas. Posteriormente, tras 10 minutos en incubación a 100 °C, se centrifugaron a 1300 rpm a temperatura ambiente durante 10 minutos con el fin de separar los restos celulares de los ácidos nucleicos.

Se recogieron los sobrenadantes y se analizaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, se mezclaron 2 µl de sobrenadante con 18 µl de la mezcla de: Máster mix (Biotools®, España) que contiene todos los componentes necesarios para llevar

a cabo la amplificación [DNA polimerasa, los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), MgCl₂, buffer de reacción y Taq polimerasa] junto con los respectivos *primers*, todo ello diluido en agua DEPC. Los ciclos a los cuales se sometieron las muestras de PCR fueron: 3 minutos a 95 °C, 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 61 °C y 1 minuto a 72 °C. Finalmente se someten a un ciclo de 2 minutos a 72 °C.

A continuación, 10 µl del producto de PCR junto con 1,2 µl del tampón de carga se cargaron en un gel de agarosa al 10% al que se le aplicó una corriente eléctrica de 100 V, con el fin de observar las bandas correspondientes a los genes amplificados. Se utilizó una solución de bromuro de etidio (E1510, Sigma®) para teñir el DNA en los geles al insertarse entre los pares de bases de la doble hélice de DNA. Bajo la luz UV de un transiluminador, se identificó la existencia o ausencia de bandas de los genes amplificados de cada animal.

Tabla 7. *Primers utilizados para el genotipado de los modelos animales.*

5xFAD		
APP		
Primer	Secuencia	Tipo
oIMR3610 APP	AGG ACT GAC CAC TCG ACC AG	Mutante Forward
oIMR3611 APP	CGG GGG TCT AGT TCT GCA T	Mutante Reverse
oIMR7338 APP cont	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT	Control positivo Forward
oIMR7339 APP cont	GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C	Control positivo Reverse
PS1		
Primer	Secuencia	Tipo
oIMR1644 PS1	AAT AGA GAA CGG CAG GAG CA	Mutante Forward
oIMR1645 PS1	GCC ATG AGG GCA CTA ATC AT	Mutante Reverse
oIMR7338	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT	Control positivo Forward
oIMR7339	GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C	Control positivo Reverse
CCL2 KO		
Primer	Secuencia	Tipo
oIMR7415	GCC AGA GGC CAC TTG TGT AG	Mutante Forward
oIMR9219	TGA CAG TCC CCA GAG TCA CA	WT Forward
oIMR9220	TCA TTG GGA TCA TCT TGC TG	Común Reverse
P301S		
Primer	Secuencia	Tipo
42640	AAA TTC CTC AGC AAC TGT GGT	Mutante Forward
42639	TTC TTG GAA CAC AAA CCA TTT C	WT Forward
42638	TTG AAG TTG GGT TAT CAA TTT GG	Común Reverse

5.3 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

Para estudiar los efectos de la NA en los modelos murinos anteriormente descritos, se decidió utilizar el fármaco Reboxetina. Este es un fármaco aprobado por la agencia estatal del medicamento para el tratamiento de diferentes enfermedades mentales tales como la depresión y el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH). Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de los transportadores de noradrenalina (NET) localizados a nivel presináptico y extrasináptico en las varicosidades noradrenérgicas (Figura 33). De este modo, la reboxetina potencia la acción de la NA sobre los receptores adrenérgicos.

En cuanto al mecanismo de administración de la reboxetina, se implantaron minibombas osmóticas Alzet® (modelo 2004 que suministran 0,25 µl/h durante 28 días) a los ratones cargadas con suero salino (vehículo) o con mesilato de reboxetina (ab120157, Abcam®) a una concentración de 50 mg/ml en suero salino. Las bombas se mantuvieron sumergidas en solución salina isosmolar a 37 °C durante aproximadamente 2 horas antes de implantarlas para iniciar un flujo constante suministrando una dosis aproximada de 10 mg/kg de peso corporal cada día durante 28 días. En el caso del primer experimento, los ratones WT, 5xFAD, CCL2 KO y 5xFAD/CCL2 KO fueron tratados a los 5 meses de edad. Para el experimento en el que se utilizaron ratones WT y P301S se inició el tratamiento a los 9 meses de edad. Para ello, los ratones fueron anestesiados mediante la inhalación de isoflurano (inducido en una cámara al 4% y mantenido al 2% mediante un cono nasal). A continuación, se realizó una pequeña incisión detrás del cuello, se implantaron las minibombas por vía subcutánea entre las escápulas y se cerró la incisión con suturas. A los 28 días después de la implantación de las bombas, se llevó a cabo la recogida de muestras.

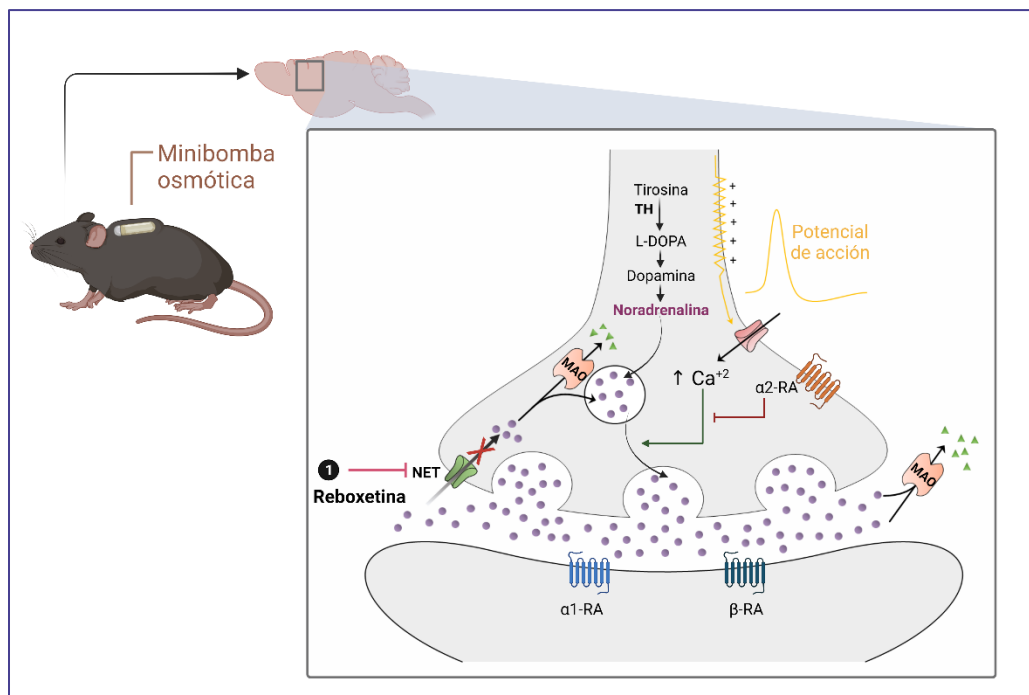


Figura 33. Vía de administración y mecanismo de acción de la reboxetina.

5.4 ESTUDIO COMPORTAMENTAL: LABERINTO EN Y

Se emplea el laberinto en Y como prueba de comportamiento para determinar la memoria espacial de trabajo.

La prueba se produce en un laberinto en forma de Y con tres brazos de plástico opacos grises en un ángulo de 120 ° entre sí, 35 cm de largo, 35 cm de ancho y 10 cm de largo (Figura 34). Los roedores presentan una disposición a explorar nuevos ambientes, de tal modo que prefieren investigar un nuevo brazo del laberinto en lugar de volver a uno que fue visitado con anterioridad. De este modo, esta prueba se utiliza para evaluar déficits en la memoria espacial de trabajo. Antes y después de la prueba, el laberinto se limpió con etanol al 75% para evitar pistas olfativas. El animal se introduce en el centro del laberinto y se le permite explorar libremente los tres brazos durante 8 minutos. Se puntuó una entrada en el brazo cuando el 85% o más del cuerpo del ratón estaba en el brazo. Todos los ensayos fueron grabados en vídeo, seguidos y analizados con el software de seguimiento ANY-maze™. Los parámetros determinados fueron: distancia total recorrida (m), velocidad (m/s), número de entradas en cada uno de los brazos, número de entradas totales, número de secuencias y el porcentaje de alternancia. El número de secuencias hace referencia a tríadas que contienen entradas en los tres brazos diferentes (A, B y C). El porcentaje de alternancia se determinó de la siguiente manera: número de secuencias/máximo de alternancias posibles (número total de brazos introducidos/3) × 100.

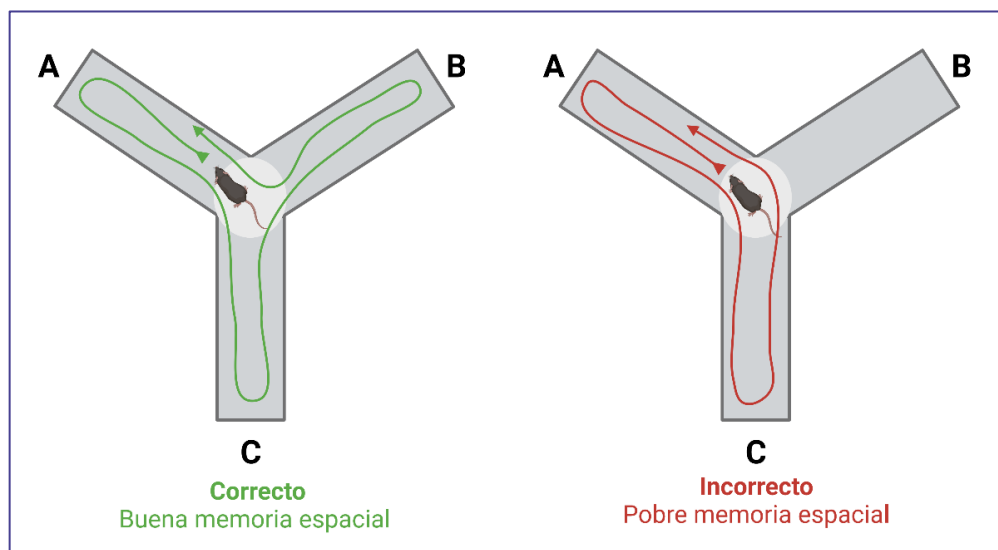


Figura 34. Prueba comportamental del laberinto en Y o Y maze.

5.5 CULTIVOS CELULARES

5.5.1 Cultivos primarios de astrocitos

Reactivos

Suero fetal bovino (FBS) (<10 EU de endotoxina por ml), medio basal de Eagle, medio neurobasal (NBM), DMEM, DMEM-F12 y B27 sin suplementos antioxidantes, obtenidos de Life Technologies® (Carlsbad, CA, EE. UU.). Como antibiótico, se utilizó una mezcla de 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina de Sigma® (St. Louis, MO, USA).

Protocolo

El protocolo utilizado para la obtención de cultivos primarios de astrocitos corticales de rata se divide en los siguientes pasos (Figura 35):

- **Paso 1:** Se partió de cortezas cerebrales de ratas Wistar (Harlan Ibérica), de 1 o 2 días de edad para la obtención de los cultivos. Estas fueron homogeneizadas haciéndolas pasar por agujas de 21G, en DMEM/F12 al 10% en FBS y con los antibióticos penicilina (100 IU/ml, Sigma®) y estreptomina (100 mg/ml, Sigma®) y se transfirieron a frascos de cultivo T-75 (Falcon® 75).
- **Paso 2:** Los frascos de cultivo T-75 se incubaron a 37 °C, en atmósfera humidificada (con 5% de CO₂).
- **Paso 3:** Tras 11-13 días, las células microgliales se separaron de la monocapa de astrocitos mediante agitación.
- **Paso 4:** Para la preparación de cultivos de astrocitos se llevó a cabo una tripsinización suave con Tryple® y se resuspendieron en DMEM/F12 al 10% FBS y con los antibióticos penicilina (100 IU/ml, Sigma®) y estreptomina (100 mg/ml, Sigma®). Se sembraron a una concentración de 1×10^6 células/ml, en placas de 24 pocillos (0,5 ml/pocillo). La pureza del cultivo de astrocitos, determinada mediante la tinción con GFAP, fue del 98%, con menos del 5% de células de microglía, determinadas mediante el marcador específico Mac-1.

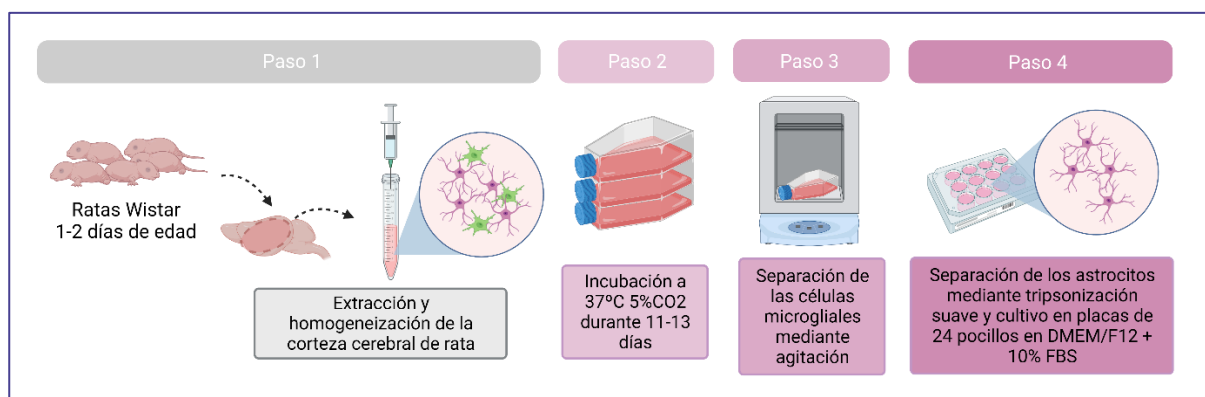


Figura 35. Protocolo gráfico de obtención de cultivos primarios de astrocitos corticales de rata.

Tratamientos

Se hicieron tratamientos con LPS (Sigma[®], Ref: L2630, CAS: 93572-42-0) y/o CCL2 (Peprtech[®], ca. no. 400-12). El LPS y CCL2 se disolvieron en agua MiliQ[®] a una concentración de 1 mg/ml y 10 µg/ml respectivamente. Las concentraciones finales utilizadas en el tratamiento se obtuvieron a partir de su dilución con medio de cultivo (DMEM/F-12).

Los cultivos primarios de astrocitos corticales de rata se mantuvieron en condiciones control o se trataron con CCL2 (100 ng/ml). Posteriormente, el medio se reemplazó por nuevo medio conteniendo LPS (0,1 g/ml) a todos los grupos excepto al grupo control.

Para el estudio del efecto de la RvD1, los cultivos de astrocitos se incubaron con vehículo (EtOH 0,037%), RvD1 (Cayman[®], CAS: 10012554 disuelta en EtOH 0,037%) a una concentración de 100 nM o RvD1 (100 nM) + CCL2 (100 ng/ml). Posteriormente, se sustituyó todo el medio en todos los pocillos, manteniendo RvD1 y CCL2 donde se utilizó para el pretratamiento y se añadió LPS (0,1 g/ml) a todos los grupos excepto al grupo control.

En la [Figura 36](#) se resume de manera gráfica los tratamientos celulares realizados.

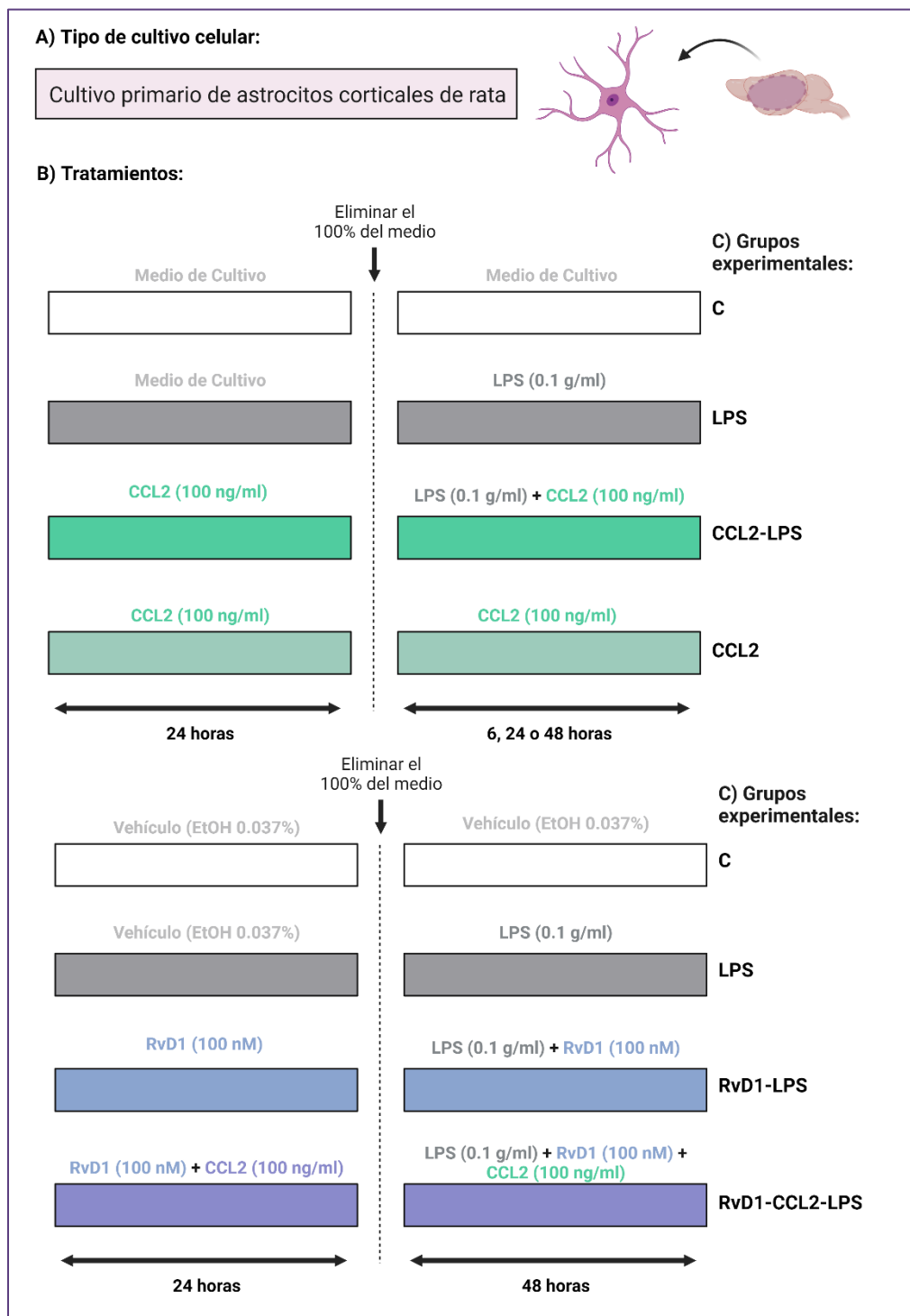


Figura 36. Protocolo gráfico de los tratamientos realizados a los cultivos primarios de astrocitos corticales de rata.

5.5.2 Cultivos de microglía derivada de iPSCs humanas

Los cultivos de microglía derivada de iPSCs humanas se han llevado a cabo en el laboratorio del Prof. Mancuso en el Centro Molecular de Neurología (*VIB Center of Molecular Neurology*) perteneciente a la Universidad de Amberes (Bélgica) como parte de la estancia internacional realizada mediante una beca otorgada por la Organización Europea de Biología Molecular (EMBO).

Reactivos

Los medios utilizados han sido: mTeSR1 (STEMCELL Technologies, Ref: 85850), X-VIVO 15 *serum-free hematopoietic cell medium* (Lonza, cat. no. BE02-060F) y DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, Ref:10565018).

Las citoquinas utilizadas para suplementar los medios han sido: BMP4 50 µg (PeproTech, cat. no. 125-05), FLT3 50 µg (PeproTech, cat. no. 300-19), GM-CSF 50 µg (PeproTech, cat. no. 300-03), IL3 50 µg (PeproTech, cat. no. 200-03), M-CSF (CSF1) 50 µg (PeproTech, cat. no. 300-25), SCF 50 µg (PeproTech, cat. no. 300-07), TPO 50 µg (PeproTech, cat. no. 300-18), VEGF165 50 µg (PeproTech, cat. no. 100-20).

Otros reactivos utilizados en el protocolo han sido: GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, cat. no. 35050061), Mercaptoethanol (50 mM; Thermo Fisher Scientific, cat. no. 31350010), RevitaCell Supplement (100×) (Thermo Fisher Scientific, cat. no. A2644501), Rock Inhibitor InSolution Y-27632–Calbiochem (Merck, cat. no. 688001), Accutase (Sigma-Aldrich, cat. no. A6964), penicilina y estreptomycin de (Sigma-Aldrich).

Las formulaciones de los medios de cultivo utilizado son las siguientes:

- **mTeSR1**
- **mTeSR1 + BVS:** Para preparar el medio mTeSR + BVS, se añade 50 ng/ml BMP4 humana, 50 ng/ml de VEGF humano y 20 ng/ml de SCF humano al medio mTeSR1.
- **Medio de diferenciación + SMIFT:** Para preparar el medio de diferenciación se utiliza medio X-VIVO 15 al cual se le añade 2 mM de GlutaMAX, una mezcla de 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin y 0,055 mM de 2-mercaptoetanol. El medio de diferenciación puede prepararse con antelación y conservarse a 4 °C. Para hacer medios de diferenciación + SMIFT, se añade 50 ng/ml de SCF humano, 50 ng/ml de M-CSF humano, 50 ng/ml de L3 humana, 50 ng/ml de FLT3 humana y 5 ng/ml de TPO humana al medio de diferenciación preparado anteriormente.
- **Medio de diferenciación + FMG:** Para la preparación del medio de diferenciación + FMG, se añade 50 ng/ml de FLT3 humano, 50 ng/ml de M-CSF humano y 25 ng/ml de GM-CSF humano al medio de diferenciación preparado anteriormente.
- **Medio TIC:** DMEM/F12 al cual se le añade L-glutamina (2mM), N-acetil-L-cisteína (5 µg/ml), Insulina (2000x), ApoT (100 µg/ml), sodio selenito (100 ng/ml). Las citoquinas que incluye el medio TIC son: colesterol (1,5 µg/ml), heparán sulfato (1 µl/ml), M-CSF (0,05 µg/ml), IL34 (0,05 µg/ml), TGFβ (0,025 µg/ml) y CX3CL1 (0,01 µg/ml).

Protocolo

Las células de microglía se obtuvieron a partir de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs Ephytelial-1, Sigma-Aldrich ®. Referencia: IPSC0028-1VL), usando el método de diferenciación desarrollado en el laboratorio del Prof. Mancuso (Fattorelli et al., 2021). En resumen, el protocolo sigue los siguientes 7 pasos:

- **Paso 1:** las células madre se descongelan y se siembran a una densidad de ~50.000 células/cm² para garantizar que crezcan y alcancen la confluencia necesaria para iniciar la diferenciación. Normalmente, se parte de un pocillo de una placa de seis pocillos con el fondo cubierto con Matrigel® que contiene 70-80% de células madre confluentes en el día 0. Hasta alcanzar el día 0 las células se mantienen en medio mTeSR1. El primer día el medio se suplementa con RevitaCell para inhibir la apoptosis celular, los siguientes días se usa medio mTeSR1 sin RevitaCell.
- **Paso 2:** Durante los días 0-3, inducimos la formación de cuerpos embrionarios (EBs) sembrando una suspensión celular de células madre en una placa de 96 pocillos de baja adherencia en U a una densidad de 10.000-15.000 células/pocillo en medio mTeSR1 + BVS. Se cambia el 75% del medio cada día eliminando cuidadosamente las células muertas.
- **Paso 3:** El día 4, los EBs se transfieren a una placa de seis pocillos con una P1000 y puntas de un diámetro mayor en medio de diferenciación + SMIFT. A partir del día 4, se realiza un cambio de medio el día 8.
- **Paso 4:** El día 11, se cambia el medio por medio de diferenciación + FMG con el fin de inducir la formación de progenitores microgliales (MPs) los cuales se recogerán del medio los días 18, 25 y 32.
- **Paso 5:** Para la recogida de los MPs, los EBs y el medio que contiene los MPs se pasan por un colador celular reversible estéril (37 µm) y se recogen en un tubo de 50 ml. En este paso sólo los MPs pasarán a través del filtro, mientras que los EBs permanecerán en la parte superior del colador. Los EBs se vuelven a recoger en nuevo medio de diferenciación + FMG y se transfieren a la placa de 6 pocillos utilizada anteriormente.
- **Paso 6:** Del medio recogido que contiene los MPs se coge una alícuota para determinar el número de MPs, posteriormente se centrifuga a 300 de fuerza centrífuga relativa (rcf) durante 5 min, y se resuspende el pellet en medio TIC para obtener la concentración celular deseada. A continuación, se siembran en una placa de 96 pocillos con fondo de cristal a una densidad de 20.000 células/pocillo. Cada dos días se realiza un cambio del 50% del medio.
- **Paso 7:** Finalmente, pasados 10 días se realizan los diferentes tratamientos (véase siguiente apartado) y la toma de muestras.

En la [Figura 37](#) se resume de manera gráfica el protocolo de diferenciación celular utilizado.

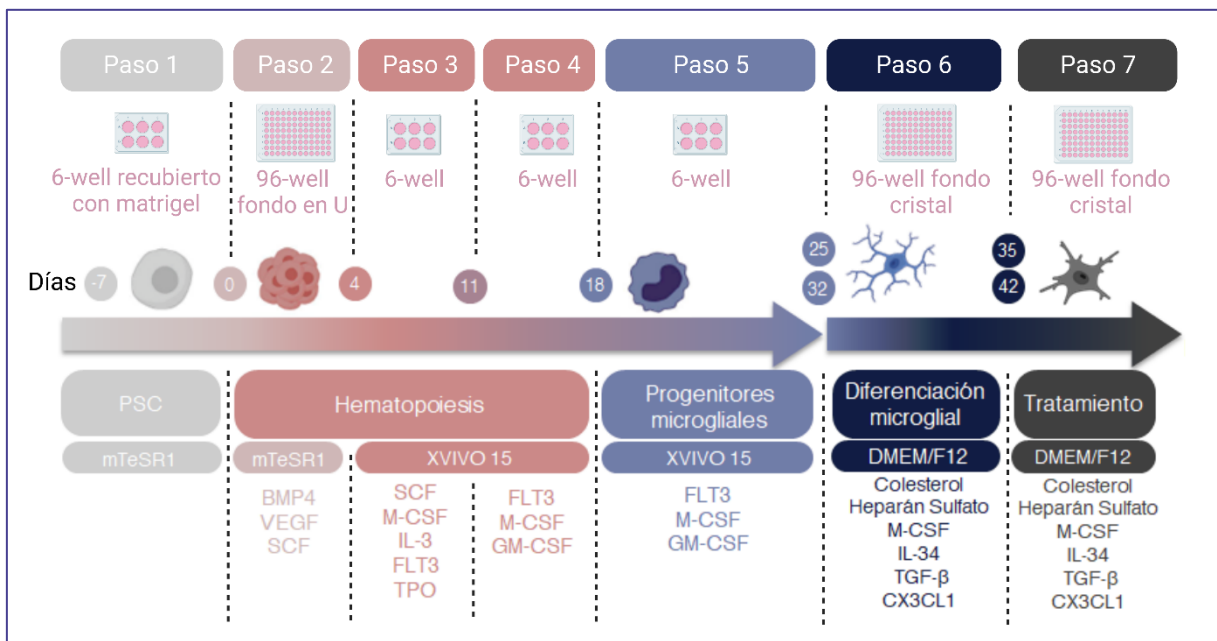


Figura 37. Resumen gráfico del protocolo de diferenciación microglial. Se indican las principales etapas de la diferenciación (PSC: célula madre pluripotencial, hematopoesis, obtención de progenitores microgliales y diferenciación microglial), junto con el tipo de placas, los medios de cultivo y los cócteles de citoquinas que se utilizan en cada paso. Figura adaptada (Fattorelli et al., 2021).

Tratamientos

Los reactivos utilizados en los tratamientos han sido los siguientes: NA (Sigma-Aldrich, Ref: A9512-25MG, CAS: 108341-18-0), LPS (Sigma-Aldrich, Ref: L4524, CAS: 93572-42-0), ATP (Sigma-Aldrich, CAS: 34369-07-8), A β 1-42 (HiLyte™ Fluor 488-labeled, Kaneka Eurogentec S.A, ca. no. AS-60479-01) y pHrodo (pHrodo™ Deep Red E. coli BioParticles™ conjugate for phagocytosis, Invitrogen™, ca. no. P35360).

Inducción de la respuesta inflamatoria

Las células de microglía derivadas de iPSCs humanas se trataron durante 18 horas con 5% de suero fetal bovino (FBS) o se mantuvieron en condiciones estándar. Posteriormente, las células se trataron con NA (10, 25 y 50 μ M) y/o LPS (200 ng/ml) con o sin 5% de FBS durante 3 h. Pasado este tiempo, se añadió NA (10, 25 y 50 μ M) y/o ATP (5 mM) con o sin 5% de FBS durante 1 h. Finalmente se recogió el medio de cultivo para el análisis de proteínas y el lisado celular para la extracción de RNA y el análisis de la expresión génica.

En la Figura 38 se resume de manera gráfica el tratamiento realizado.

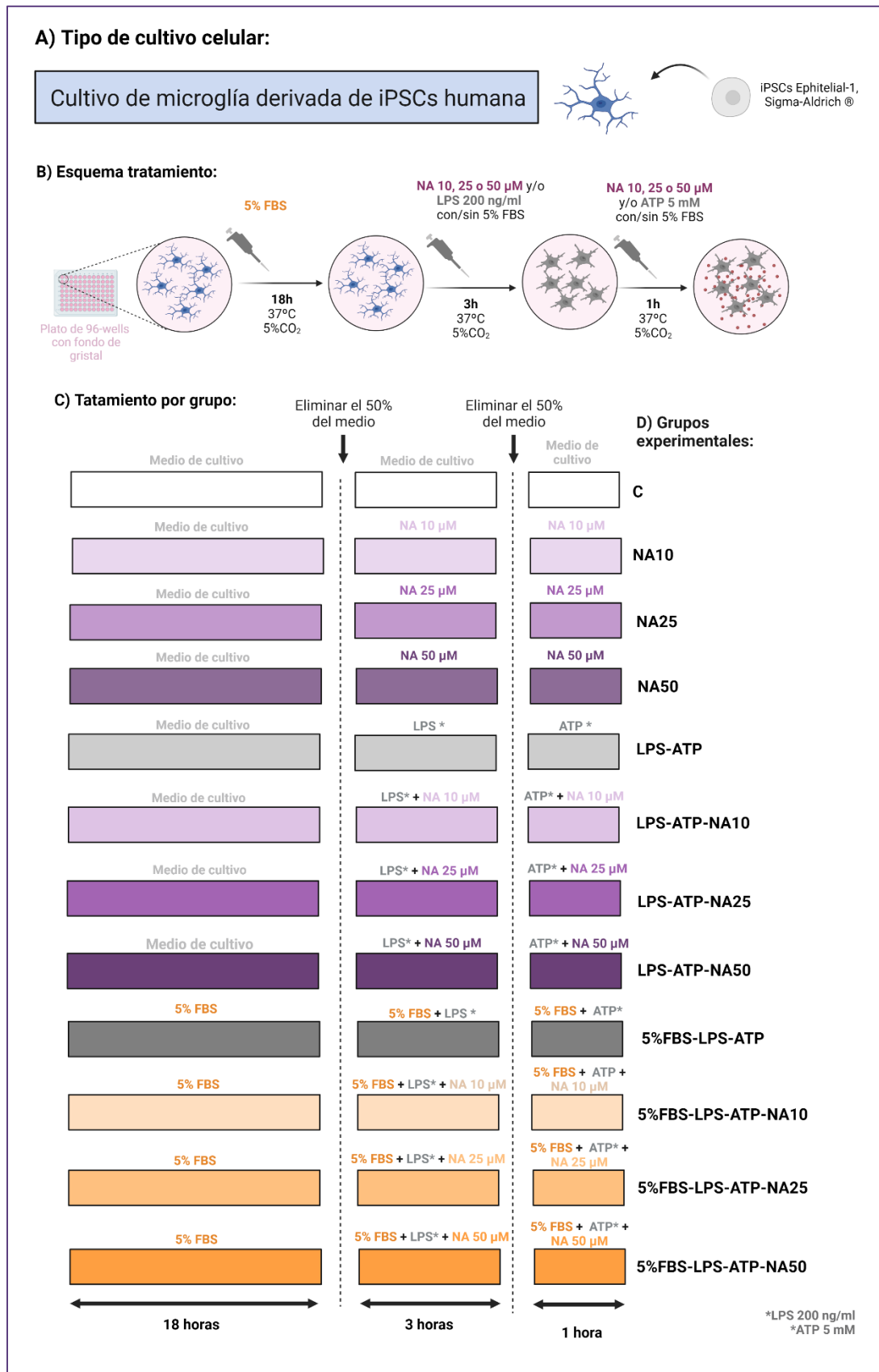


Figura 38. Inducción de la respuesta inflamatoria en cultivos de microglía derivados de iPSCs humanas. FBS: suero fetal bovino, NA: noradrenalina, LPS: lipopolisacárico,

Inducción de la capacidad fagocítica

Las células de microglía derivadas de iPSCs humanas se trataron con NA (10, 25 y 50 μM) y/o A β 1-42 (20 μM) durante 3 horas. Paralelamente, las células se trataron con NA (10, 25 y 50 μM) y/o pHrodo (50 $\mu\text{g/ml}$) durante 3 horas. El tratamiento se llevó a cabo en el interior del equipo Incucyte[®] dentro de la cámara de cultivo. Se adquirieron imágenes cada 20 minutos durante las 3 horas del tratamiento. Finalmente, se realizaron tres lavados con PBS con el fin de eliminar el exceso de partículas fluorescentes de A β 1-42 y pHrodo, tras los cuales se realizó una última imagen mediante el uso del equipo Incucyte[®].

En la [Figura 39](#) se resume de manera gráfica el protocolo utilizado.

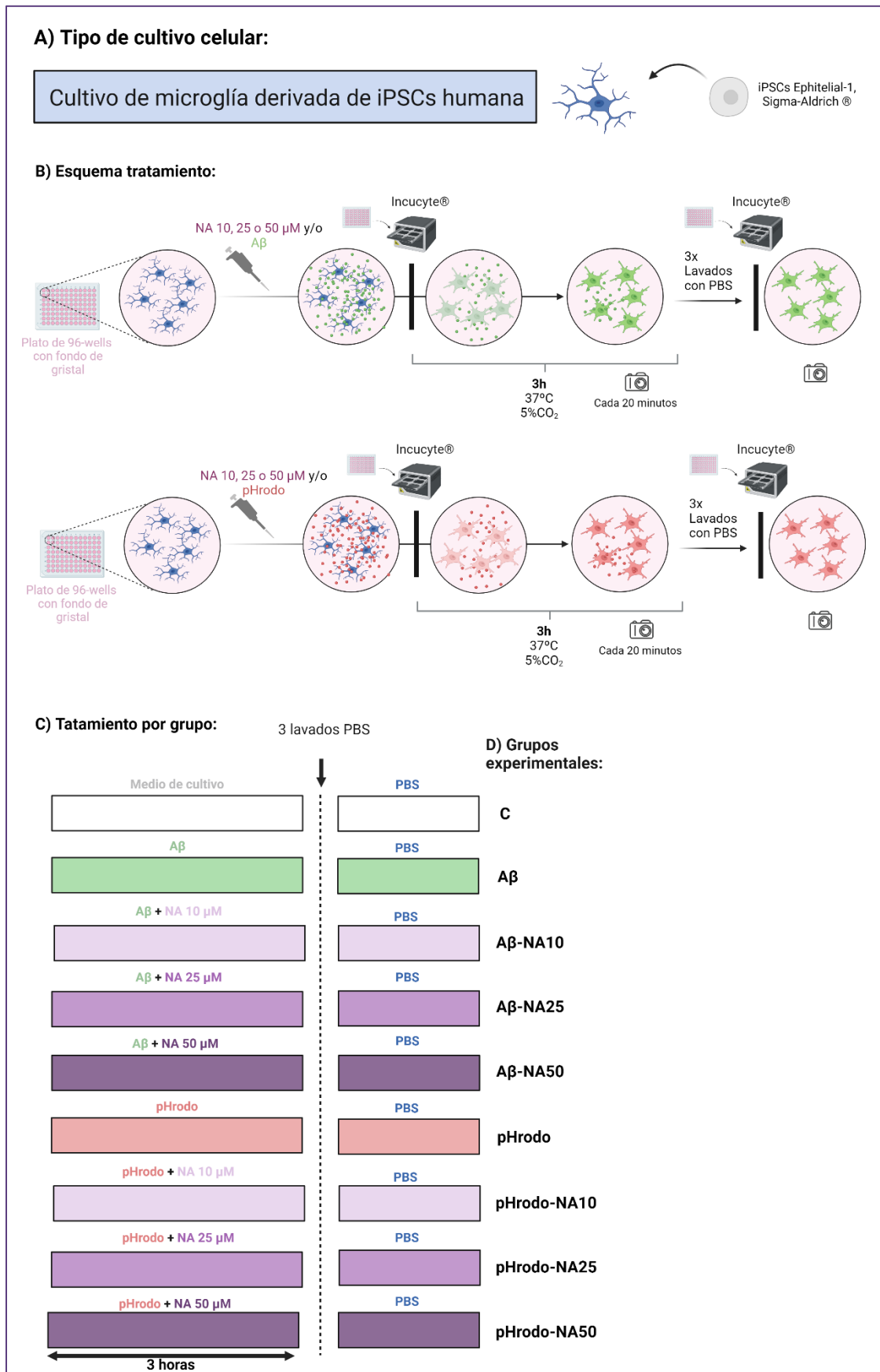


Figura 39. Inducción de la actividad fagocítica en cultivos de microglía derivados de iPSCs humanas.

5.6 RECOGIDA Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

5.6.1 Modelos murinos

Se administró a los animales anestesia terminal con pentobarbital sódico (250 mg/kg de inyección intraperitoneal de Vetoquinol[®], Madrid, España), y posteriormente se sometieron a perfusión transcardial con solución salina. A continuación, se extrajeron los cerebros de los cuales se aisló la corteza frontal y el hipocampo.

Procesamiento para el análisis de proteínas mediante WB

Se diseccionó el hemisferio izquierdo y se aisló la corteza frontal y el hipocampo. Las muestras obtenidas se congelaron y se mantuvieron a -80 °C. El tejido cerebral de ratón congelado se sometió a sonicación durante 10 segundos (sonicador digital, Branson[®]) en 350 µl de solución de homogeneización con mezcla de inhibidores de proteasa con mezcla completa de inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics[®], Alemania) a 4 °C. Los homogeneizados se centrifugaron a 12.000 × g durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se almacenaron a -80 °C para la cuantificación del contenido proteico y para futuros experimentos.

Para la cuantificación de los niveles de proteínas, se determinó en primer lugar el contenido proteico total mediante el método de Bradford[®]. El método de Bradford[®] es un ensayo espectroscópico basado en un desplazamiento de la absorbancia del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250. El colorante Coomassie tiene tres formas de coloración: aniónica (azul), neutra (verde) y catiónica (roja). Este colorante reacciona con las proteínas estabilizando su forma aniónica (azul). Sin embargo, si no hay proteínas en la solución, el colorante permanece de color marrón. Las longitudes de onda de absorción del colorante Coomassie van de 465 nm a 595 nm. La lectura del valor de absorbancia a 595 nm es proporcional a la concentración de proteínas en la muestra (Bradford, 1976).

Como estándar se utilizaron soluciones de proteínas de albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma[®]) que contenían de 1 a 100 ng/ml de proteína. Las soluciones de proteínas (tanto la muestra como el estándar) se añadieron a la solución de Bradford 1x (1:1). A continuación, se determinó la absorbancia con un espectrofotómetro (Synergy 2, Bio Tek, Alemania). La concentración de proteína de las muestras se calculó utilizando la curva estándar realizada a partir de las densidades ópticas de la proteína estándar. Finalmente, las muestras se llevaron a la concentración de 1 µg/µl y se les añadió el tampón Laemmli (BioRad[®], EE. UU.) con β-mercaptoetanol al 5% como agente desnaturizante y se calentaron a 90 °C durante 10 minutos para la desnaturalización de las proteínas y la adquisición de la carga negativa. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

Extracción de RNA

Muestras de hipocampo y de la corteza frontal se conservaron en 300 µl de Trizol[®] (Invitrogen[®]) y se congelaron a -80 °C hasta su uso. Posteriormente, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se homogenizaron mediante sonicación (sonicador digital, Branson). A continuación, se añadieron a cada tubo 60 µl de cloroformo (Sigma[®]) y se agitó durante 15 segundos, 3 minutos después se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 minutos

a 4 °C. Se descartó la fase orgánica y se añadieron a la fase acuosa 150 µl de 2-propanol (Sigma®) y 1 µl de glucógeno. A continuación, se agitó la mezcla en vórtex y se dejó toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó dos veces con 200 µl de etanol al 80% en agua DEPC (Invitrogen®). Se dejó evaporar el exceso de etanol y se dejó secar el pellet. Finalmente, los pellets obtenidos se resuspendieron en 50 µl de agua DEPC (Invitrogen®) y se almacenaron a -80 °C.

Procesamiento para el análisis inmunohistoquímico

Un hemisferio se fijó en paraformaldehído al 4% durante 24 horas. Posteriormente, se crioprotegió en sacarosa al 30% durante las 24 horas. Finalmente, se realizaron secciones coronales de 25 µm de grosor mediante el uso del microtomo Leica SM2000R y se guardaron en solución crioprotectora en placas de 24 pocillos a -40 °C hasta su procesamiento.

Procesamiento para el análisis por citometría de flujo

Cuando el hemisferio derecho no se utilizó para otra técnica bioquímica, se colocó en un medio DMEM/F-12 para la realización del protocolo de citometría de flujo la cual se llevó a cabo con el tejido en fresco.

5.6.2 Cultivos Celulares

Procesamiento para el análisis de proteínas mediante WB

En el caso de los cultivos primarios de astrocitos corticales de rata, se aspiró el medio de los pocillos y se lavaron las células con 500 µl de buffer fosfato salino (PBS) frío y autoclavado 1 vez. A continuación, se añadieron 200 µl de solución de homogeneización con mezcla de inhibidores de proteasa (Complete, Roche Diagnostics®, Alemania) y se dejaron 5 minutos en hielo. Las células se rasparon para desprenderlas del fondo de la placa y se homogeneizaron mecánicamente mediante puntas de pipeta y se colocaron en tubos de 1,5 ml. Las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante se almacenó a -80 °C hasta su uso posterior. Para la cuantificación de proteínas se utilizó el método de Bradford anteriormente explicado. Tras la medición de los niveles totales de proteína las muestras se llevaron a una concentración de 1 µg/µl y se les añadió el tampón Laemmli (BioRad®, EE. UU.) con β-mercaptoetanol al 5% como agente desnaturante y se calentaron a 90°C durante 10 minutos para la desnaturalización de las proteínas y la adquisición de la carga negativa. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

Procesamiento del medio de cultivo para el análisis de proteínas mediante ELISA

Tanto en el caso de los cultivos primarios de astrocitos corticales de rata como de las células de microglía derivadas de iPSCs humanas se recogió el medio de cultivo condicionado y se almacenó a -80 °C hasta su uso posterior.

Extracción de RNA

En el caso de los cultivos primarios de astrocitos corticales de rata, se eliminó el medio de cultivo y se añadieron 300 µl de reactivo Trizol® (Thermo Fisher Scientific®) por cada pocillo

de la placa de 24 pocillos. A continuación, se rasparon las células y la mezcla se recogió en tubos de 1,5 ml y se procesó de inmediato o congeló a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para la extracción del RNA las muestras descongelaron a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron a cada tubo 20 μl de cloroformo (Sigma[®]) por cada 100 μl de reactivo Trizol[®], se agitó durante 15 segundos y 3 minutos después se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se descartó la fase orgánica y se añadieron a la fase acuosa 50 μl de 2-propanol (Sigma[®]) y 1 μl de glucógeno. A continuación, se agitó la mezcla en vórtex y se dejó toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al día siguiente, las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó dos veces con 200 μl de etanol al 80% en agua DEPC (Invitrogen[®]). Se dejó evaporar el exceso de etanol y se dejó secar el pellet. Finalmente, los pellets obtenidos se resuspendieron en 50 μl de agua DEPC (Invitrogen[®]) y se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En el caso de las células de microglía derivadas de iPSCs humanas, se eliminó el medio de cultivo y se añadieron 100 μl de buffer RLT (Quiagen[®]) por cada pocillo de la placa de 96 pocillos y la mezcla se recogió en placas de 96 pocillos y se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para la extracción del RNA se utilizó el Kit de extracción RNeasy 96 QIAcube HT (Quiagen[®], ID: 74171) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.7 TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

5.7.1 Western Blot (WB)

Para la realización del WB se cargaron entre 15-25 μl (15-25 μg) de cada muestra en un gel de electroforesis de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 10% de 1,5 mm de espesor. El primer carril se utilizó para el marcador de peso molecular (Precision Plus Protein[™], BioRad, EE. UU.). La electroforesis se realizó a 120 V hasta la migración completa de las proteínas en un sistema Mini-Protean[®] Tetra Cell (BioRad, España). Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Trans-Blot[®] Midi Nitrocellulose (BioRad[®], EE. UU.) con un tamaño de poro de 0,2 μm . Se realizó una transferencia semiseca de 10 minutos con el sistema Trans-Blot[®] Turbo[™] (BioRad[®], España). A continuación, las membranas se bloquearon con leche desnatada o albúmina de suero bovino (PanReac, Alemania) al 5% en con una solución de Tween[®] 20 al 1% en tris buffer salino (TBS) durante una hora a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario específico durante toda la noche a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al día siguiente, tras tres lavados de 10 minutos con una solución de Tween[®] 20 al 1% en TBS, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios adecuados durante 1 hora. Finalmente, las membranas se lavaron de nuevo cuatro veces durante 5 minutos con TBS-Tween. Las bandas de proteínas reconocidas por los anticuerpos se revelaron con un kit de quimioluminiscencia ECL Plus[®] (Amersham, Suecia) y se visualizaron con el detector Odyssey[®] FC (Licor, Alemania). Las exposiciones se realizaron a diferentes tiempos para garantizar la correcta intensidad de las bandas, las cuales se cuantificaron por densitometría utilizando el software ImageJ Fiji[®] (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA). Como control de carga se utilizó la cuantificación de la proteína β -actina.

En la [Tabla 8](#) se recogen los anticuerpos y las concentraciones utilizadas.

Tabla 8. Listado de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en WB.

Proteína	Anticuerpo 1º	Dilución	Anticuerpo 2º	Dilución
COX2 (75 KDa)	SantaCruz (sc-1747)	1/1000 + 2,5% BSA	Sigma (A5420, Anti Goat)	1/10000
β-amiloide (87 KDa)	Abcam (ab2539)	1/2000	SantaCruz (sc-2004, Anti Rabbit)	1/2000
GFAP (50 KDa)	Abcam (ab4678)	1/2000	Abcam (ab 97135 Anti Chiken)	1/4000
Anexina V (30 KDa)	Cell Signallin (8555)	1/1000	SantaCruz (SC2004, Anti Rabbit)	1/2000
Neurofilamento H no fosforilado (180-200 KDa)	Merk (NE1023)	1/1000	SantaCruz (sc-516102, Anti Mouse)	1/10000
IL1β (31 KDa)	Abcam (ab9722)	1/500 + 5% BSA	SantaCruz (sc-2357, Anti Rabbit)	1/2000 + 2% BSA
NOS2 (130 KDa)	SantaCruz (sc-650)	1/750 + 2% BSA	SantaCruz (sc-2357, Anti Rabbit)	1/2000 + 2% BSA
β-actina (42 KDa)	Sigma (A5441)	1/15000	SantaCruz (sc-516102, Anti Mouse)	1/10000

5.7.2 ELISA

Los niveles de aquellas proteínas que necesitaban una detección de alta sensibilidad se cuantificaron mediante ELISA (ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas). Se utilizaron kits comerciales específicos para cada proteína y especie según las instrucciones del fabricante. Todas las pruebas se normalizaron con la concentración total de proteínas (determinada por el ensayo de Bradford). Los kits utilizados han sido: IL-1 beta Rat ELISA Kit (Invitrogen®, cat. no. BMS630), TNF alpha Rat ELISA Kit (Invitrogen®, cat. no. KRC3011), Rat MIP-1 alpha ELISA Kit (CCL3) (Abcam®, ab213916), IL-1 beta Human ELISA Kit (Invitrogen®, ca. no. KHC0011). La lectura de las absorbancias se realizó con el lector de microplacas Synergy 2 (BioTek®, EE. UU.).

5.7.3 Ensayo de Griess para la determinación de nitritos

Para la determinación de los nitritos en el medio de cultivo, se siguió el método descrito por Peter Griess en 1858 conocido como “ensayo Griess”. En una placa de 96 pocillos se realizaron duplicados con 100 μ l de muestra (medio de cultivo condicionado) o estándar de nitrito de sodio para la recta patrón a los que se añadieron 50 ml de N-1-(Naftil)-etil-enediamina (Neda) al 0,1% (p/v) y 50 ml de sulfanilamida al 1% (p/v). La lectura se realizó en el lector de microplacas Synergy 2 (BioTek[®], EE. UU.) a 540 nm y se extrapolaron las concentraciones de nitritos según la recta patrón, normalizándolas con la cantidad total de proteína cuantificada mediante el método de Bradford.

5.7.4 RT-qPCR

Para medir la expresión de varios genes se utilizó el procedimiento de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de transcripción inversa (RT-PCR). Combina la transcripción inversa del RNA en DNA complementario (cDNA) y la posterior amplificación de los genes objetivo mediante PCR. Esta técnica se lleva a cabo en dos etapas independientes:

- Transcripción reversa (RT), donde el mRNA se convierte en cDNA.
- PCR en tiempo real o PCR semicuantitativa (qPCR).

Transcripción reversa (RT)

En el caso de las muestras de tejido cerebral y de cultivos primarios de astrocitos corticales de rata, se determinó la concentración y la pureza del RNA empleando un espectrofotómetro NanoDrop[®] 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc). La pureza del RNA se determinó mediante la relación de absorción a 260 nm, 230 nm y 280 nm. Las muestras con un valor 260/280 entre 1,7 y 2,2 y un valor 260/230 en el rango de 1,8 y 2,2 se consideraron puras. A continuación, las muestras se diluyeron con agua DEPC (Invitrogen[®]) en función de la concentración de ARN medida hasta alcanzar una concentración de 1 μ g de RNA en un volumen final de 10 μ l. A estas alícuotas se añadieron 10 μ l de la siguiente mezcla de reactivos: Tampón 5x RT (Thermo Fisher Scientific[®]), trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTP) (25 mM) (Invitrogen[®]), Cebadores aleatorios (Invitrogen[®]), Inhibidor de RNAasa (Invitrogen[®]), agua DEPC (Invitrogen[®]) y superScript[®] Transcriptasa inversa (Thermo Fisher Scientific[®]). La mezcla se sometió 10 minutos a 25 °C, 30 minutos a 50 °C y 5 minutos a 85 °C utilizando el termociclador My Cycler[™] (BIO-RAD, EE. UU.). Por último, se añadió agua DEPC (Invitrogen[®]) y el cDNA se almacenó a -80 °C.

En el caso de las muestras de cultivos de células de microglía derivadas de iPSCs humanas, la RT se realizó inmediatamente después de la extracción de RNA. Para ello, se utilizó el kit comercial *High capacity cDNA reverse transcription Kit* (Applied Biosystems[™], cat. no. 4368814) empleando las instrucciones del fabricante. En resumen, 10 μ l 2x RT máster mix (10X RT Buffer, 25X dNTP Mix 10mM, 10X RT Random primers, MultiScribe[™] Reverse transcriptase, RNase Inhibitor, Nuclease-free H₂O) se pipetearon en una placa de 96 pocillos. A continuación, se añadieron 10 μ l de la muestra pipeteando arriba y abajo dos veces para mezclar. Las placas se sellaron y centrifugaron brevemente. Finalmente, la mezcla se sometió 10 minutos a 25 °C, 120 minutos a 37 °C y 5 minutos a 85 °C utilizando el termociclador de 96 pocillos Veriti[™] de Applied Biosystems[™].

qPCR

En el caso de las muestras de tejido cerebral y de cultivos primarios de astrocitos corticales de rata, los niveles de mRNA se estimaron mediante qPCR semicuantitativa a tiempo real en un Corbett Rotor Gene 6000 (QIAGEN®). La cuantificación se realiza controlando la reacción de amplificación mediante la emisión de fluorescencia del fluoróforo SYBRGreen®. Se mezclaron para cada muestra 2 µl del cDNA obtenido de la RT con 18 µl de Quantimix Easy Master Mix (Biotools B&M Labs, España), agua DEPC (Invitrogen®) y el par de *primers* específicos de la secuencia a amplificar. Las condiciones de la PCR fueron de al menos 35 ciclos de amplificación como sigue: desnaturalización del cDNA a 95 °C durante 10 segundos, unión de los *primers* a 60 °C durante 15 segundos, extensión a 72 °C durante 30 segundos, seguida de 5 min a 72 °C. Las concentraciones relativas de mRNA se realizaron desde el punto de despegue (Ct) de la PCR utilizando el software comercial incorporado y se normalizaron con los niveles con GAPDH.

Los *primers* se diseñaron mediante el uso del programa Primer3 (Untergasser et al., 2012). Se comprobó la especificidad por el gen diana mediante la realización de una PCR *in sillico* disponible en USCS GenomeBrowser y un alineamiento de secuencias Blast (NCBI) frente al cDNA y al DNA genómico (gDNA). Los *primers* seleccionados han sido aquellos capaces de hibridar únicamente con la secuencia diana.

En la [Tabla 9](#) se recogen los *primers* utilizados.

Tabla 9. Lista de secuencias de *primers*.

Primers de ratón		
Gen	Forward	Reverse
IL1β	TGGAGAGTGTGGATCCCAAGCAAT	TGCTTGTGAGGTGCTGATGTACCA
MIP-1α	ACTGACCTGGAAGTGAATGCCTGA	ATGTGGCTACTTGGCAGCAAACAG
TNFα	CTGGCCAATGGCATGGATCTCAA	AGCCTTGTCCCTTGAAGAGAA CCT
GFAP	AAGGTCTATTCTGGCTGCACAGT	AGCTTGGAGAGCAACAGCTAGTCA
NOS2	AGCACATTTGGCAATGGAGACTGC	AGCAAAGGCACAGAACTGAGG GTA
COX2	ATGAGTGGTAGCCAGCAAAGCCTA	TACTGAGTACCAGGCCAGCACAAA
mPGES1	CCTAGGCTTCAGCCTCACAC	CAGCCTAATGTTTCAGCGACA
CCL2	AGCAGGTGTCCCAAAGAAGCTGTA	AAAGGTGCTGAAGACCTTAGGGCA
FPR2	CTGGGCTCAAAGTGAAGA	CGTAAAGGACGGCTGGAATTA
15-LOX	GGGACAATGGACACCGTTATTA	CCAGGTACTGCTGACTACAAAG
5-LOX	CTGGTAGCCCATGTGAGGTT	GCACAGGGAGGAATAGGTCA
BDNF	AGTGGAGCCGAACAACTGA	CCGCCTTCATGCAACCGAA
NGF	AGCTTTCTATACTGGCCGCA	GCTGTGTCAAGGGAATGCTG
S100B	GAGGACTCCAGCAGCAAAGG	CACCACTTCTGCTCCTTG
EAAT1	TTGTCCGGCCTCCTCATTAC	GTGATGCGTTTGTCCACACC
EAAT2	ATCACTGCTCTGGGAAGTGC	ACGAATCTGGTCACACGCTT
TREM2	ACCAGTGTCAGAGTCTCCGA	GAATGGAGGTGGGTGGGAAG
P2RY12	TCACAGAGGGCTTTGGGAAC	GGGGAGAAGGTGGTATTGGC
TMEM19	GTGTCTAACAGGCCCCAGAA	AGCCACGTGGTATCAAGGAG
CD68		GACTCAGACACCTCAGCTTTAG

GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
<i>Primers de rata</i>		
Gen	Forward	Reverse
15-LOX	CTCCACTACAAGACCGACAAAG	GTGCATTAGGAACCCAGTAGAA
5-LOX	CTGGTAGCCCATGTGAGGTT	GCACAGGGAGGAATAGGTCA
FPR2	CGCTGTCAAGATCCACAGAA	CTCCAAACTGGAAGGCAGAG
GPR32	CCTTTCTGGTTCTCACCTTCTT	GTGATGGCCTGTCTCTCTTTC
GPR18	TTCATCATGATCGGGTGCTA	CAGGGGCTGTAGCTGTTCTC
CMKLR1	ATCACGGCCTGTTACCTCAC	AGTCCCAGGCTGAAGACAGA
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGA	GGCATGGACTGTGGTCATGAG

5.7.5 Inmunohistoquímica (IHC)

Protocolo

Para el análisis inmunohistoquímico de las muestras de cerebro de los diferentes modelos murinos, se lavaron los cortes con PBS^{+/+} durante 5 minutos y se bloquearon en PBS^{+/+} con un 10% de suero de caballo o de cabra junto con un 0,2% de Triton X-100 a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes a 4 °C durante 18 horas. A continuación, las secciones se lavaron tres veces durante 5 minutos con PBS^{+/+} y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes. A continuación, las muestras se lavaron tres veces, durante 5 minutos cada una, con PBS^{+/+}. La autofluorescencia se neutralizó con NH₄Cl en PBS^{+/+} (50 mM) durante 10 minutos. Finalmente, tras lavar las secciones con PBS^{+/+} durante 3 minutos, se montaron en portaobjetos y se cubrieron con el medio de montaje histológico Fluoroshied™ (Sigma®) con DAPI. Alternativamente, se utilizó medio de montaje Fluoroshied™ (Sigma®) sin DAPI. En esta ocasión, tras la incubación con NH₄Cl y el lavado con PBS^{+/+} se incubó con DAPI (1:1000) durante 4 minutos y posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS^{+/+} antes de proceder al montaje de las preparaciones. En el caso de la tinción con GFAP (ab7260), los lavados se realizaron con PBS^{+/+} junto con un 0.1% de Triton X-100, y previamente a la incubación con el anticuerpo primario se incubaron los cortes durante 5 minutos con PBS^{+/+} con Triton X-100 al 5%, con el fin de proporcionar una mayor permeabilidad del tejido y penetración del anticuerpo en la muestra. Como control negativo se realizó el protocolo descrito previamente, pero sin añadir el anticuerpo primario durante la incubación.

En la [Tabla 10](#) se recogen los anticuerpos y las concentraciones utilizadas.

Tabla 10. Listado de anticuerpos primarios y secundarios utilizados en IHC.

Proteína	Anticuerpo 1º	Dilución	Anticuerpo 2º	Dilución
β-amiloide	Abcam (ab2539)	1/200	Abcam (ab96898 Goat Anti Rabbit Dylight 650)	1/500
GFAP	Abcam (ab4674)	1/1000	Abcam (ab goat Anti Chiken FITC)	1/500
GFAP	Abcam (ab7260)	1/1000	ThermoFisher (A31572 Donkey Anti Rabbit 555)	1/500
Anexina V	Cell Signalling (8555)	1/1000	Abcam (ab96898 Goat Anti Rabbit Dylight 650)	1/500
NeuN	Merk (ABN78A4 Alexa 488)	1/400	-	-
CX3CR1	R&D System (AF5825)	1/100	ThermoFisher (A11055 Donkey Anti Goat 488)	1/500
Iba-1	FUJIFILM Wako (019-19741)	1/1000	ThermoFisher (A21206 Donkey Anti Rabbit 488)	1/500
AT8	ThermoFisher (MN1020)	1/500	Abcam (ab97239 Goat Anti Mouse 488)	1/500
Neurofilamento H no fosforilado	Merk (NE1023)	1/1000	Abcam (ab97239 Goat Anti Mouse 488)	1/1000

Adquisición y análisis de imágenes

Para la adquisición de las imágenes de las preparaciones histológicas obtenidas se utilizó un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse Ti-S equipado con una cámara digital y el software de imágenes NIS-Elements®. Las imágenes de microscopía confocal se adquirieron en el servicio de la Unidad de Citometría y Microscopía de Fluorescencia (CCMF) de la Universidad Complutense de Madrid (UCM). Para la tinción de SMI32 se utilizó el sistema confocal Olympus FV1200, con tres detectores confocales, dos de ellos espectrales, y con uno de luz transmitida, 7 líneas de láser (405, 458, 488, 515, 559, 594, 635). Para las tinciones de Iba-1, GFAP, AT8 y NeuN se utilizó el microscopio confocal de barrido láser TCS SP8 con sistema de superresolución hyvolution, equipado con 4 detectores de fluorescencia, dos de ellos, detectores HyD de alta sensibilidad, y 4 láseres (405, 488, 552, 638). Para el análisis de las imágenes se utilizó el software ImageJ Fiji® (National Institutes of Health, Bethesda, MA, EE. UU.).

Índice de transformación o Transformation Index (TI)

Para determinar el índice de transformación (TI) de la microglía, cada célula se trazó utilizando el software de análisis ImageJ Fiji® (National Institutes of Health, Bethesda, MA, EE. UU.), y se midió el perímetro y el área de cada célula de microglía. El TI se calculó mediante la siguiente ecuación: $\text{perímetro}^2 / (4\pi \times \text{área}^2)$ (Fujita et al., 1996). Se analizaron dos cortes por ratón por cada área del hipocampo: CA3, CA1 y giro dentado (DG), y la corteza frontal. En cada uno de los cortes/imágenes se analizaron 5 células de microglía. De tal modo que se

analizaron 10 células de microglía por región y por animal. Los valores se expresan en valores >1, con un valor de TI más cercano a 1 que representa una forma circular, el equivalente a una célula de microglía con una morfología más ameboide y con menos ramificaciones. Los valores de TI más altos representan formas más complejas con una mayor relación perímetro/área, el equivalente a células de microglía con más ramificaciones y más extensas y con cuerpos celulares más pequeños.

5.7.6 Citometría de flujo (FC)

Los ratones fueron perfundidos transcardialmente con NaCl 0,9%, y el hipocampo derecho se colocó en 1 ml de medio libre de suero (SFM: DMEM/F12 con 1% de antibióticos). Las muestras se picaron con una cuchilla y se transfirieron a un tubo con 1,5 ml de medio de disociación enzimática [SFM con colagenasa D (1 mg/ml), dispasa II (10 mg/ml), HEPES (50 mM) y NaCl (150 mM) y DNase I (10 U/ml)]. Las muestras se incubaron durante 20 minutos a 37 °C en un baño de agua, invirtiendo cada tubo cada 5 minutos. Tras la disociación enzimática se añadieron 2,5 ml de medio de neutralización [DMEM/F12 con 10% de suero fetal bovino (FBS)] a cada muestra para detener la reacción de disociación y se homogeneizaron las muestras haciéndolas pasar por sucesivas puntas de pipeta más pequeñas hasta alcanzar el tamaño P10. Tras la homogeneización se centrifugaron durante 5 minutos a 250 x g a temperatura ambiente. El pellet se resuspendió en 5 ml de DPBS en frío y se pasó por un colador (40 µm) a un tubo de 50 ml. La suspensión se centrifugó a 250 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se resuspendieron en un gradiente de Percoll® (17-0591-01, GE Healthcare) para separar las células de la mielina y los restos mediante centrifugación de densidad. Las muestras se resuspendieron en 1,5 ml de 35% de SIP (Stock Isotonic Percoll, compuesto por nueve partes de Percoll y una parte de DPBS 10x). A continuación, sobre esta capa, se pipetearon lentamente 1,5 ml de DPBS 1x. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 900 x g durante 20 minutos a 18 °C sin freno ni aceleración para que los distintos componentes se separaran según su densidad. La mielina y los restos permanecen entre la solución de DPBS 1x y las capas de SIP al 37%, mientras que las células permanecen bajo la capa de SIP al 37%. De esta manera, la mielina y los *debrits* se eliminaron mediante aspiración. A continuación, cada tubo se llenó hasta 10 ml con DPBS 1x y se centrifugó a 900 x g durante 6 minutos a 10 °C. El pellet se resuspendió en 200 µl de solución de bloqueo [FACS (PBS 1X + 5%BSA) + anticuerpo anti-mouse CD16/32 (BioLegend®, TruStain FcX™, ref: 101320)] y se incubó durante 10 minutos a 4 °C. Posteriormente, la muestra se dividió en dos tubos (100 µl), añadiendo a uno de los tubos los anticuerpos ACSA-2-PE (Miltenyi Biotec®, Ref: 130-123-284 Lot:5220408143) y GLAST(ACSA-1)-APC (Miltenyi Biotec®, Ref: 130-123-641 Lot:5220408172), ambos una dilución de 1/50. Al otro tubo se le añadieron los anticuerpos CD11b-APC (eBioscience™, Ref: 17-0112-82. Lot: 4339583), CD45-FITC (BioLegend®, Ref: 147709 Lot: B358271) y TREM2-PE (R&D Systems®, Ref: FAB17291P Lot: AADX0821101) a las diluciones de 1/100, 1/200 y 1/20 respectivamente. Las muestras se incubaron durante 35 minutos a 4 °C protegidas de la luz. Posteriormente, las muestras se lavaron con 3 ml de FACS y se centrifugaron a 900 x g durante 6 min a 10 °C. Tras eliminar el sobrenadante, se añadieron 200 µl de FACS y 100 µl de DAPI como marcador de muerte celular. Las células se adquirieron en un citómetro de flujo CytoFLEX® equipado con 3 láseres de la Unidad Transversal de Citometría de Flujo del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC). Se utilizó un panel

previamente configurado para asignar un voltaje específico a las poblaciones negativas y positivas de cada anticuerpo, así como para evitar la mayor superposición de señales de los espectros de emisión. Para ello, analizamos previamente los controles negativos y positivos de cada anticuerpo por separado, así como combinados. El solapamiento de señal entre los canales de los espectros de emisión se corrigió matemáticamente mediante compensación en el software de análisis CytExpert®.

Los datos obtenidos se analizaron mediante el software de análisis FlowJo®. Para la estrategia de *gating* se representó en primer lugar un *dot plot* FSC-H (eje x) vs. SSC-H (eje y) donde se seleccionó la población celular de interés según el tamaño y la granularidad (complejidad) evitando aquellos eventos con un alto valor de SSC-H y bajos valores de FSC-H correspondientes a *debrits* celulares y agregados. De la población seleccionada se representó el *dot plot* de FSC-A (eje x) vs. FSC-H (eje y) para eliminar los dobletes y seleccionar los singletes. De los singletes seleccionados se representó un *dot plot* de SSC-H (eje x) frente a DAPI-H (eje y) con el fin de eliminar las células muertas del análisis (DAPI positivas) y evitar falsos positivos debido a la unión inespecífica de las células muertas con los anticuerpos. Finalmente, de las células vivas se seleccionaron las poblaciones de interés según los anticuerpos utilizados para cada caso. En el caso de los astrocitos, se representó un *dot plot* de ACSA-2-H (eje x) frente a SSC-H (eje y). De la población ACSA-2⁺ se representaron los histogramas para ACSA-2-H y se determinaron las medias para cada muestra. Para la determinación de la población de microglía se representó el *dot plot* de CD11b-H (eje x) frente a CD45-H (eje y), y se determinó la población de microglía como aquella CD11b⁺/CD45⁺. De esta población se representó el histograma para TREM2-H y se determinaron las medias para cada muestra.

5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cada muestra se analizó por duplicado o triplicado, y los resultados obtenidos se han expresado como la media \pm SEM (error estándar de la media). El programa estadístico utilizado en los estudios fue el GraphPad Prism7® (para los resultados de los apartados 6.1 y 6.2) y GraphPad Prism9® (para los resultados de los apartados 6.3 y 6.4). Previo al análisis estadístico, los *outliers* se identificaron mediante el método de ROUT.

Para el análisis estadístico de los estudios con más de dos grupos experimentales y de más de una variable independiente, se realizó un análisis de la varianza o ANOVA de dos vías, tomando como variables independientes el genotipo y el tratamiento, seguido de un *post hoc* de Tukey. En el caso de los estudios con más de un grupo experimental, pero con una sola variable, se realizó un análisis de la varianza, ANOVA de una vía, seguido de un *post hoc* de Tukey. Finalmente, en aquellos casos donde se compararon dos grupos experimentales se utilizó un análisis de *t student*. En todos los casos se consideró un valor de $p < 0,05$ significativo.

RESULTADOS

6.1 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON REBOXETINA Y DE LA SUPRESIÓN DE CCL2 EN EL MODELO MURINO 5XFAD DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

6.2 EFECTO DE LA QUIMIOQUINA CCL2 EN LA RESOLUCIÓN DE LA INFLAMACIÓN

6.3 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON REBOXETINA EN EL MODELO MURINO P301S DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

6.4 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON NORADRENALINA EN CÉLULAS DE MICROGLÍA DERIVADAS DE IPSCS HUMANAS

6 RESULTADOS

6.1 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON REBOXETINA Y DE LA SUPRESIÓN DE CCL2 EN EL MODELO MURINO 5XFAD DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Debido al papel antiinflamatorio y neuroprotector que presenta la NA, el uso de fármacos que potencien su acción cerebral podría ser una buena estrategia terapéutica con el fin de disminuir la patología de la EA. En este primer apartado hemos analizado si la NA ejerce sus efectos antiinflamatorios y neuroprotectores en el modelo murino 5xFAD de la EA (modelo de amiloidosis) (Figura 31).

Por otro lado, estudios *in vitro* realizados por el grupo de investigación donde se realizó esta tesis doctoral determinaron que la NA ejerce una acción neuroprotectora contra la excitotoxicidad a través de la producción astrocítica de la quimioquina CCL2 (Madrigal et al., 2009). Sin embargo, la quimioquina CCL2 parece jugar un papel dual, siendo neuroprotectora a bajas concentraciones, pero considerándose un mediador de la inflamación a altas concentraciones (Sokolova et al., 2009). Así, el bloqueo de sus acciones, mediante el uso de alteraciones genéticas u otros medios, han demostrado reducir el daño neuronal producido por diferentes causas (B. D. Semple, T. Kossmann, et al., 2010). Sin embargo, debido a sus efectos neuroprotectores, la supresión completa de la actividad de CCL2 puede tener consecuencias deletéreas. Esto se debe posiblemente a su relevante papel como mediador de un proceso crítico como es la respuesta inmune y también a su implicación en otros procesos en distintas partes del organismo (Deshmane et al., 2009). Por tanto, según la información existente, el mantenimiento de unas concentraciones de CCL2 homeostáticas parece ser necesario para el mantenimiento de una respuesta inflamatoria adecuada y de la homeostasis tisular. En este sentido, estudios *in vitro* realizados por el grupo de investigación donde se realizó esta tesis doctoral determinaron que la NA disminuye la liberación masiva de CCL2 resultante de la exposición astroglial a un estímulo proinflamatorio (Hinojosa et al., 2013).

En base a ello, decidimos cruzar ratones 5xFAD con ratones CCL2KO obteniendo ratones 5xFAD/CCL2KO, con el fin de determinar el efecto de la supresión de CCL2 en ratones 5xFAD, así como determinar si el efecto de la reboxetina en ratones 5xFAD se mantiene o pierde en ratones 5xFAD/CCL2KO y comprobar la posible implicación de CCL2 en las acciones de la NA.

Para ello, tratamos ratones con el fármaco reboxetina (Rbx), un antidepresivo que actúa como inhibidor de la recaptación de NA, potenciando así el efecto de la NA en el SNC. Además, dado el doble papel protector/deletéreo que juega CCL2 en el SNC, hemos considerado relevante explorar el impacto de la supresión a largo plazo de la actividad de CCL2 en la corteza cerebral, analizando ratones CCL2KO envejecidos.

Antes y después del tratamiento los animales se sometieron a la prueba comportamental del laberinto en Y o Y *maze* con el fin de cuantificar las alteraciones en la memoria de trabajo espacial. Tras la última prueba comportamental, se procedió a la recogida de muestras de

corteza frontal y el análisis bioquímico de las mismas. En las muestras de corteza frontal se analizó: el grado de inflamación, el grado de activación glial, el acúmulo de placas amiloides, el daño axonal y la apoptosis celular. En la [Figura 40](#) se muestra el protocolo experimental utilizado.

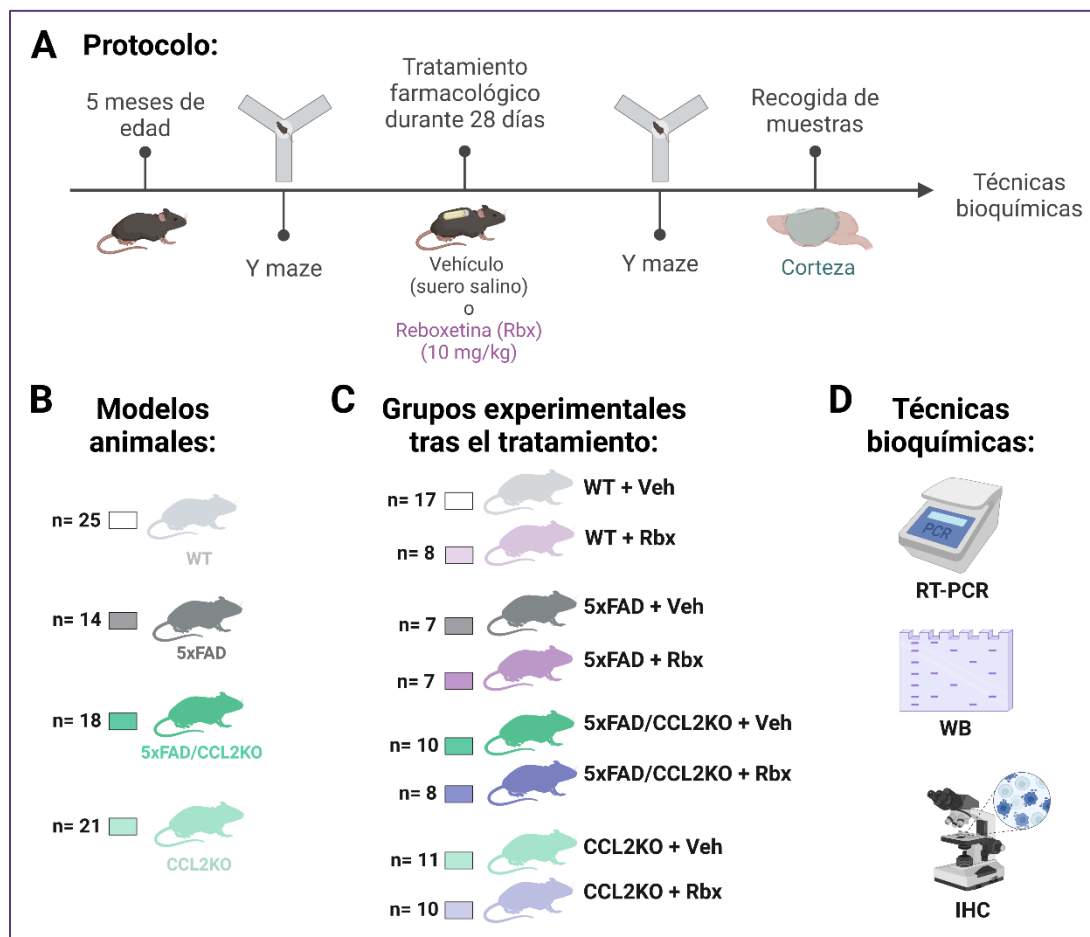


Figura 40. Protocolo experimental utilizado. Todos los animales utilizados son machos. Las muestras de corteza corresponden a la corteza frontal.

Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo x tratamiento) seguido de un *post hoc* de Tukey. En las gráficas se decidió representar exclusivamente los resultados estadísticos tras las comparaciones múltiples las cuales son las comentadas en el texto para una mejor comprensión e interpretación de los datos obtenidos.

La eliminación de CCL2 reduce las alteraciones en la memoria de trabajo espacial presente en los ratones 5xFAD

Mediante el uso del laberinto en Y o *Y maze* se evaluó la memoria de trabajo espacial. Se registró el número total de entradas de los ratones en los brazos durante 8 minutos y se calculó el porcentaje de alternancia espontánea como se indica en la sección de material y métodos.

Antes de iniciar el tratamiento, el número total de entradas en los brazos no se diferenció significativamente entre los diferentes grupos experimentales (WT, 5xFAD, 5xFAD/CCL2 KO y CCL2KO) (Figura 41 B), lo que indica que todos los ratones tuvieron un comportamiento exploratorio similar. En lo relativo al porcentaje de alternancia espontánea, se observó una reducción significativa en los ratones 5xFAD en comparación con los ratones WT (Figura 41 A). Mientras que los ratones 5xFAD/CCL2KO lograron mayores valores de alternancia espontánea que los ratones 5xFAD que expresaban CCL2, no observándose diferencias significativas en los valores de alternancia espontánea entre los ratones 5xFAD/CCL2KO y los ratones WT. Lo que nos indica que la supresión genética de CCL2 es capaz de revertir las alteraciones de la memoria de trabajo espacial presentes en los ratones 5xFAD. Finalmente, tras el tratamiento con reboxetina, no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos (Figura 41 C, D).

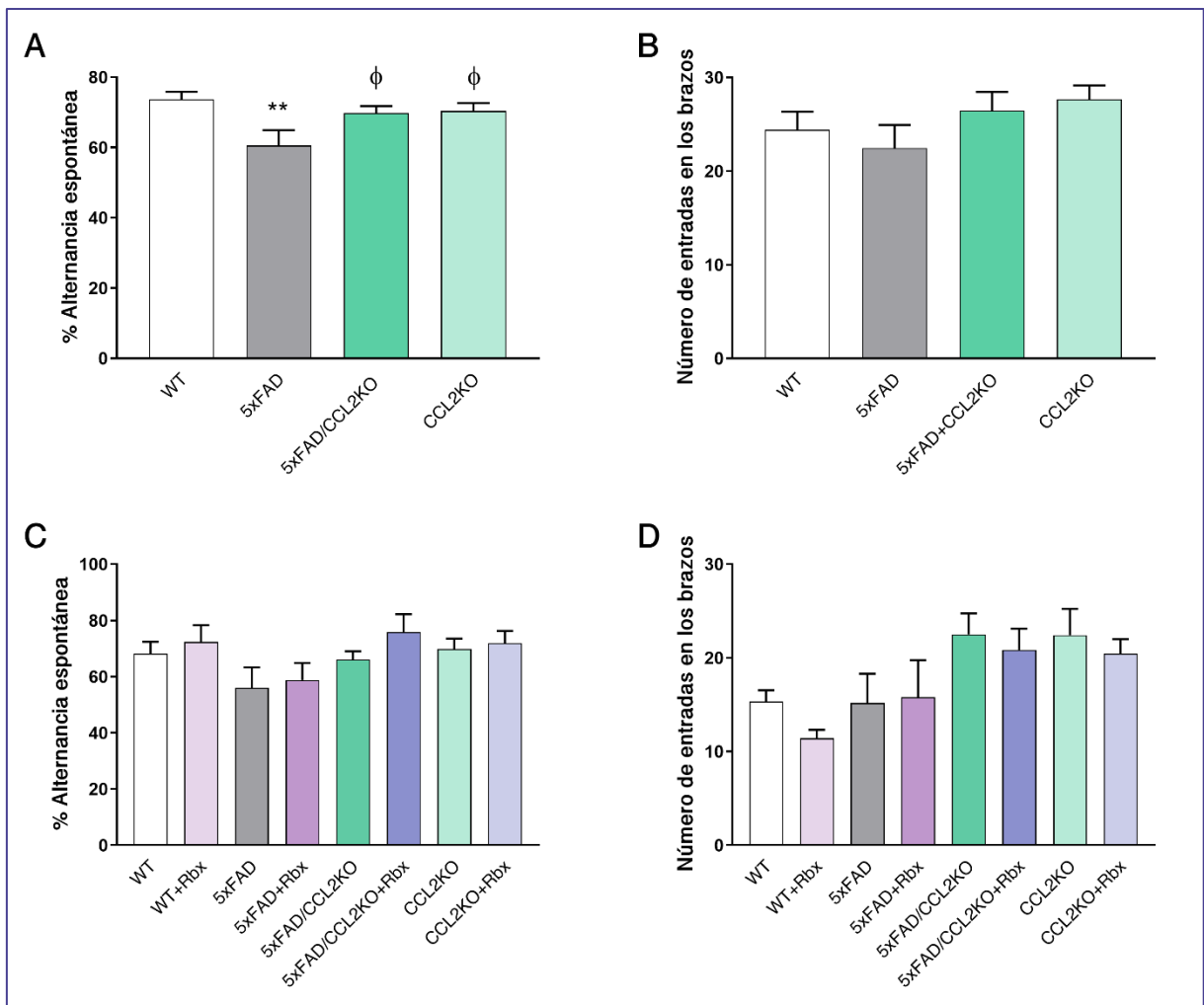


Figura 41. Prueba comportamental del laberinto en Y: Los déficits de memoria espacial en 5xFAD se reducen por la supresión genética de CCL2. **A)** Determinación del % de alternancia espontánea. **B)** Determinación del número total de entradas en los brazos. Los datos corresponden a las medias \pm SEM de $n \geq 18$ réplicas por grupo en las gráficas A y B. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguido de un post hoc de Tukey. ** $p < 0,01$ vs. WT; $\phi p < 0,05$ vs. 5xFAD. **C)** Determinación del % de alternancia espontánea evaluada en ratones. **D)** Determinación del número total de entradas en los

brazos. Los datos corresponden a las medias \pm SEM de $n \geq 9$ réplicas por grupo en las gráficas C y D. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo x tratamiento).

El tratamiento con reboxetina y la supresión genética de CCL2 reducen la expresión de marcadores proinflamatorios

Con el fin de determinar el grado de neuroinflamación, se cuantificaron los niveles de mRNA de diferentes mediadores de la respuesta inflamatoria mediante RT-PCR.

El aumento de la expresión de IL1 β y MIP-1 α en la corteza frontal de ratones 5xFAD en comparación con ratones WT confirman la existencia de un estado neuroinflamatorio en estos ratones (Figura 42 A, B). El tratamiento con reboxetina en los ratones 5xFAD redujo los niveles de expresión de IL1 β y MIP-1 α , confirmando el efecto antiinflamatorio de la NA. Además, el tratamiento con reboxetina también redujo la expresión de MIP-1 α en los ratones 5xFAD/CCL2KO (Figura 42 B). Por lo tanto, podemos concluir que este efecto de la reboxetina es independiente, al menos en parte, de la actividad de CCL2. Por otro lado, la supresión genética de CCL2 en los ratones 5xFAD (ratones 5xFAD/CCL2KO) redujo la expresión de IL1 β y MIP-1 α en comparación con ratones 5xFAD. Esto indica que CCL2 contribuye al mantenimiento de la respuesta inflamatoria cortical característica de los ratones 5xFAD. Mientras que los ratones CCL2KO presentan un incremento en la expresión de IL1 β comparado con los ratones WT, el cual fue evitado por el tratamiento con reboxetina (Figura 42 A). Finalmente, el análisis de la expresión de CCL2 en las muestras WT y 5xFAD demuestra que el tratamiento con reboxetina induce la expresión de CCL2 en los ratones WT, sin tener ningún efecto en los ratones 5xFAD (Figura 42 C).

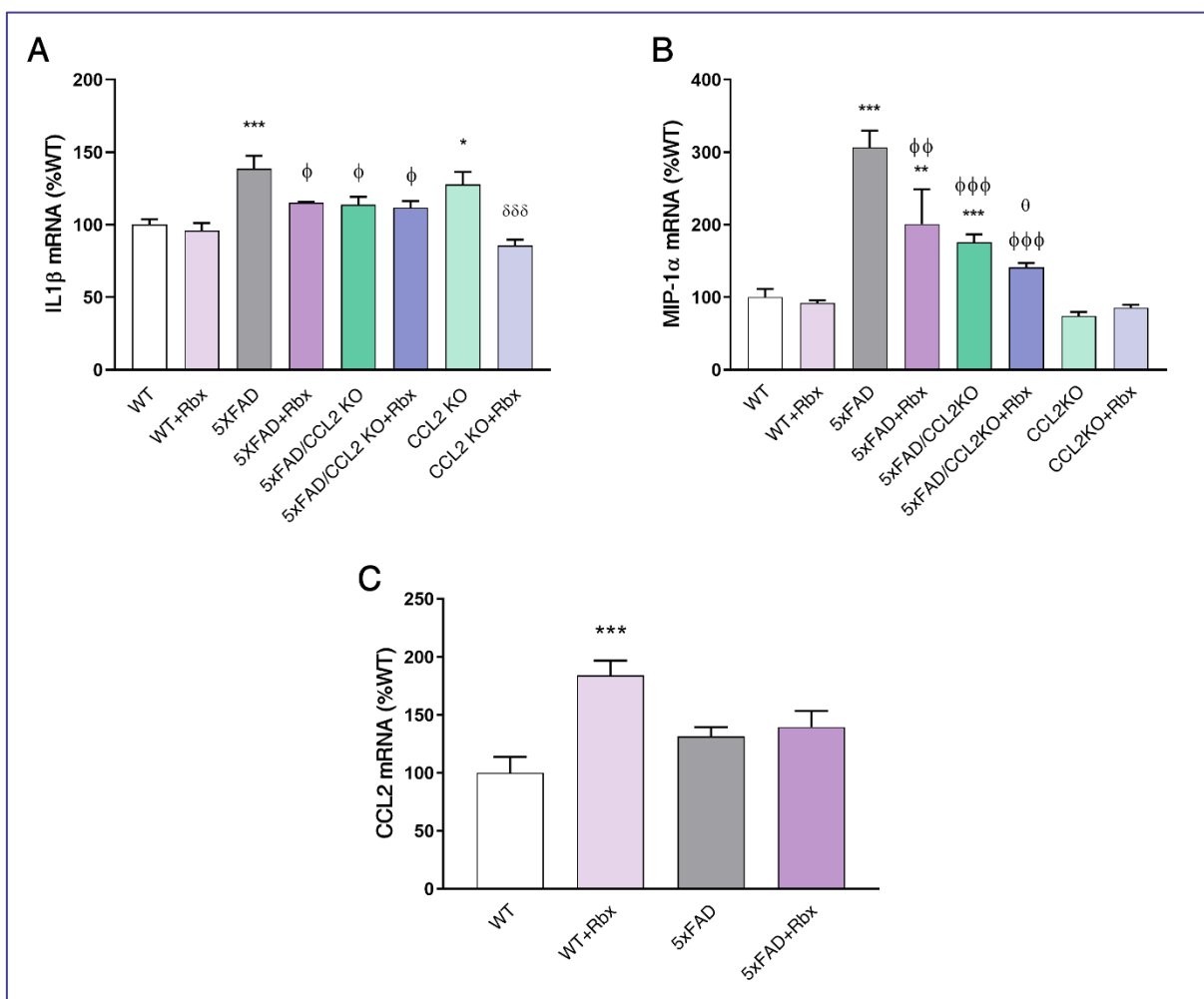


Figura 42. Regulación de la expresión de IL1β y MIP-1α por el tratamiento con reboxetina y la supresión genética de CCL2. Se analizaron los niveles de mRNA de IL1β, MIP-1α y CCL2 en muestras de corteza frontal de ratones WT, 5xFAD, 5xFAD/CCL2KO y CCL2KO tratados con vehículo o reboxetina (Rbx). Los datos corresponden a las medias ± SEM de n ≥ 6 réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo x tratamiento) seguido de un post hoc de Tukey. ***p < 0,001, **p < 0,01, *p < 0,05 vs. WT; φφφp < 0,001, φφp < 0,01, φp < 0,05 vs. 5xFAD; δδδp < 0,001 vs. CCL2KO; θp < 0,05 vs. 5xFAD/ CCL2KO.

El tratamiento con reboxetina y la supresión genética de CCL2 reducen la expresión de COX2 y mPGES1

Dado el relevante papel de la COX2 en la progresión de la EA (Woodling et al., 2016), se analizó la expresión de COX2 y de la prostaglandina sintasa-1 microsomal (mPGES1). Ambas enzimas están implicadas en la biosíntesis de la prostaglandina E2 (PGE2), un lípido implicado en la respuesta inflamatoria.

Los ratones 5xFAD presentan mayores niveles de expresión de COX2 y mPGES1 en la corteza frontal en comparación con ratones WT (Figura 43 A, B), mientras que el tratamiento con reboxetina eleva la expresión de COX2 en los animales WT, pero la disminuye en los ratones 5xFAD confirmando nuevamente su efecto antiinflamatorio (Figura 43 A). Por otro lado, la supresión genética de CCL2 en los ratones 5xFAD reduce los niveles de expresión de

COX2 y mPGES1, mientras que el tratamiento con reboxetina en animales 5xFAD/CCL2KO no presentó ningún efecto (Figura 43 A, B).

Finalmente, el análisis de los niveles proteicos de COX2 mediante el uso de WB no nos permitió observar diferencias estadísticamente significativas en contraposición a lo observado mediante la técnica de RT-PCR (Figura 43 C).

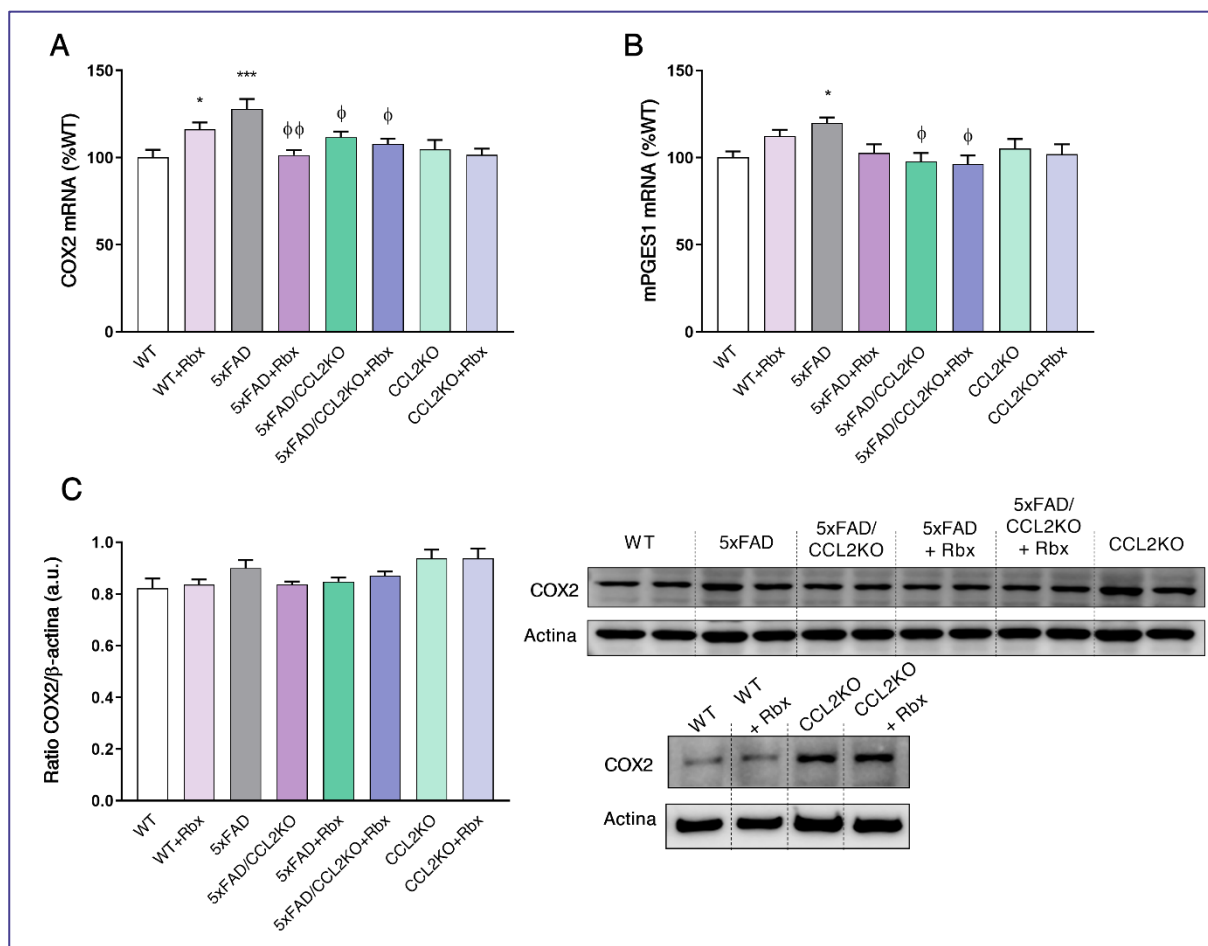


Figura 43. Regulación de la expresión y síntesis de COX2 y mPGES1. Muestras de corteza prefrontal de ratones WT, 5xFAD, 5xFAD/CCL2KO y CCL2KO tratados con vehículo o reboxetina (Rbx). **A-B)** Determinación de los niveles de mRNA de COX2 y de mPGES1. **C)** Determinación de los niveles de proteína de COX2 y β -actina. Los geles mostrados son representativos de tres experimentos separados. Análisis densitométrico de las bandas. UA: unidades arbitrarias relativas a WT. Los datos corresponden a las medias \pm SEM de $n \geq 5$ réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo x tratamiento) seguido de un post hoc de Tukey. *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$ vs. WT; $\phi\phi p < 0,01$, $\phi p < 0,05$ vs. 5xFAD.

El tratamiento con reboxetina y la supresión genética de CCL2 no afectan a la distribución de las células de microglía

Dado que la microglía es uno de los principales tipos celulares mediadores de la respuesta neuroinflamatoria, analizamos si el tratamiento con reboxetina y la supresión genética de

CCL2 tienen algún efecto en cuanto a la distribución de la microglía en la corteza frontal. Para ello, utilizamos un anticuerpo dirigido contra CX3CR1, el receptor de fractalquina o CX3CL1, que es expresado casi exclusivamente por la microglía dentro del SNC y utilizado como marcador de este tipo celular en el parénquima cerebral (Cardona et al., 2006).

Como se muestra en la **Figura 44**, los ratones 5xFAD presentan áreas con grupos de células CX3CR1-positivas con una morfología más reactiva en comparación con los ratones WT. Aunque el tratamiento con reboxetina parece reducir la densidad de la microglía en los ratones 5xFAD incluso en ausencia de CCL2, no se pudieron detectar diferencias significativas mediante la cuantificación del área ocupada por las células CX3CR1-positivas. Por otro lado, la supresión genética de CCL2 en los ratones 5xFAD no condujo a ningún cambio significativo en cuanto a la distribución de la microglía en comparación con los ratones 5xFAD.

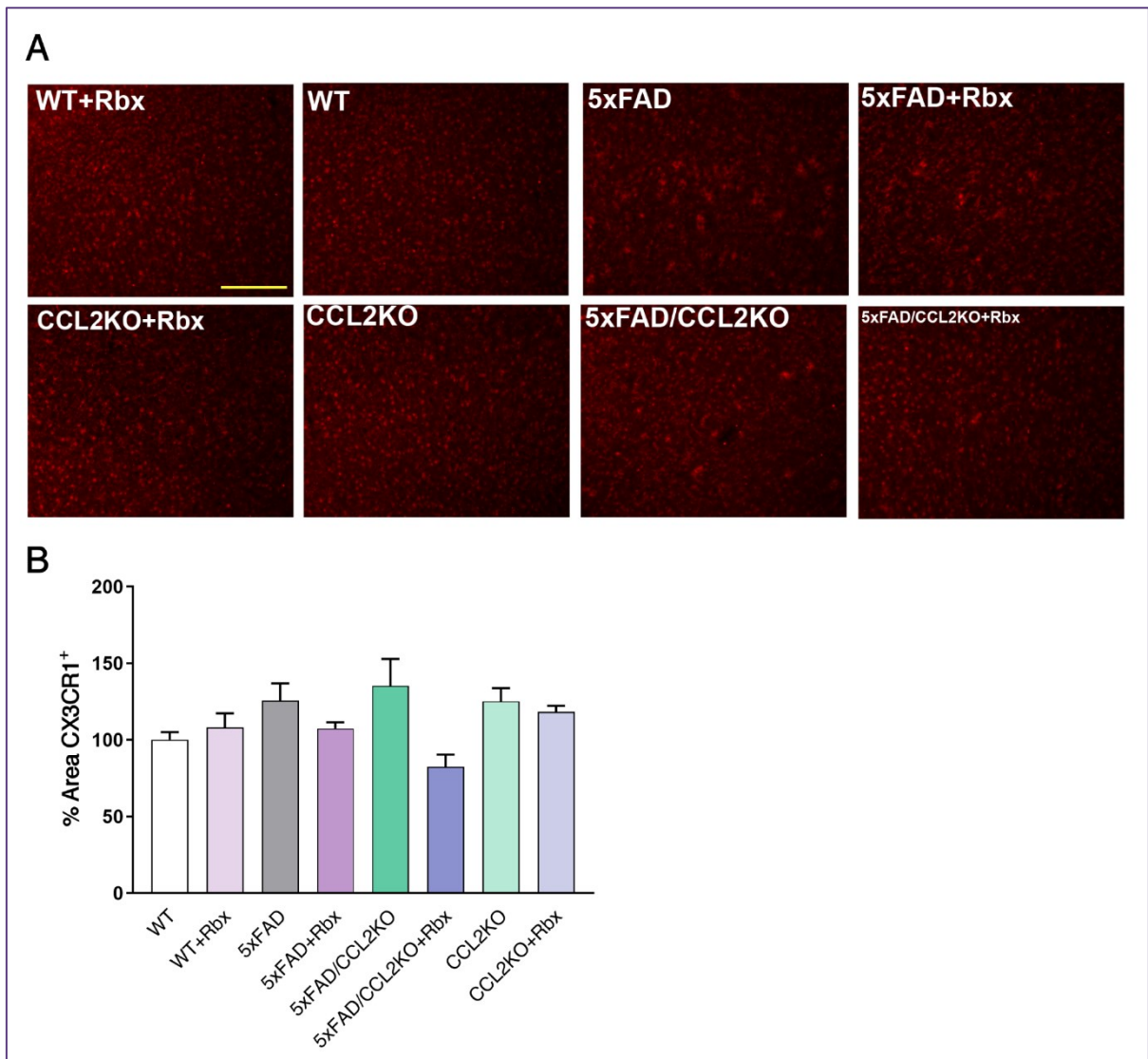


Figura 44. Distribución de la microglía en la corteza frontal. **A)** Imágenes representativas de la corteza frontal (área somatosensorial primaria) de secciones coronales preparadas a partir de ratones WT, 5xFAD, 5xFAD/CCL2KO y CCL2KO tratados con vehículo o reboxetina (Rbx) teñidas para CX3CR1 (rojo). Las barras de escala corresponden a 100 μ m. **B)** Análisis cuantitativo del área ocupada por las

células CX3CR1-positivas. Los datos corresponden a las medias \pm SEM de $n \geq 5$ réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo x tratamiento).

El tratamiento con reboxetina y la supresión genética de CCL2 reducen la expresión y síntesis de GFAP en astrocitos

Dado que otro tipo de células gliales que participan en la fisiopatología de la EA son los astrocitos (Chun & Lee, 2018), analizamos la expresión y síntesis de GFAP, marcador específico de este tipo celular.

Nuestros resultados confirman el aumento en la expresión y síntesis de GFAP en los ratones 5xFAD en comparación con los ratones WT (Figura 45). El tratamiento con reboxetina no ejerció ningún efecto en los niveles de expresión y síntesis de GFAP medidos mediante RT-RT-PCR y WB respectivamente. Sin embargo, la supresión genética de CCL2 provocó una gran reducción de la expresión (Figura 45 A) y la síntesis de GFAP (Figura 45 B) en los ratones 5xFAD. Por otro lado, los ratones CCL2KO presentaron una mayor expresión y niveles de GFAP evaluados mediante RT-PCR y WB respectivamente en comparación con los ratones WT (Figura 45 A, B).

La presencia de GFAP también se analizó mediante inmunohistoquímica de la corteza frontal. Estos estudios nos permitieron confirmar la presencia de astrogliosis en los animales 5xFAD en comparación con ratones WT (Figura 45 C, D). En este caso, el tratamiento con reboxetina disminuyó el área ocupada por astrocitos (área GFAP⁺), indicándonos que la reboxetina es capaz de disminuir el grado de astrogliosis en los ratones 5xFAD (Figura 45 C, D). La supresión de CCL2 en los ratones 5xFAD disminuyó también el área ocupada por células GFAP⁺, en consonancia con el efecto antiinflamatorio de la supresión de CCL2 previamente observado (Figura 45 C, D). El tratamiento con reboxetina en animales 5xFAD/CCL2KO no permitió observar diferencias en el marcaje de GFAP. Finalmente, los ratones CCL2KO presentaron un ligero aumento en la tinción de GFAP, aunque, al contrario de lo observado por PCR y WB, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

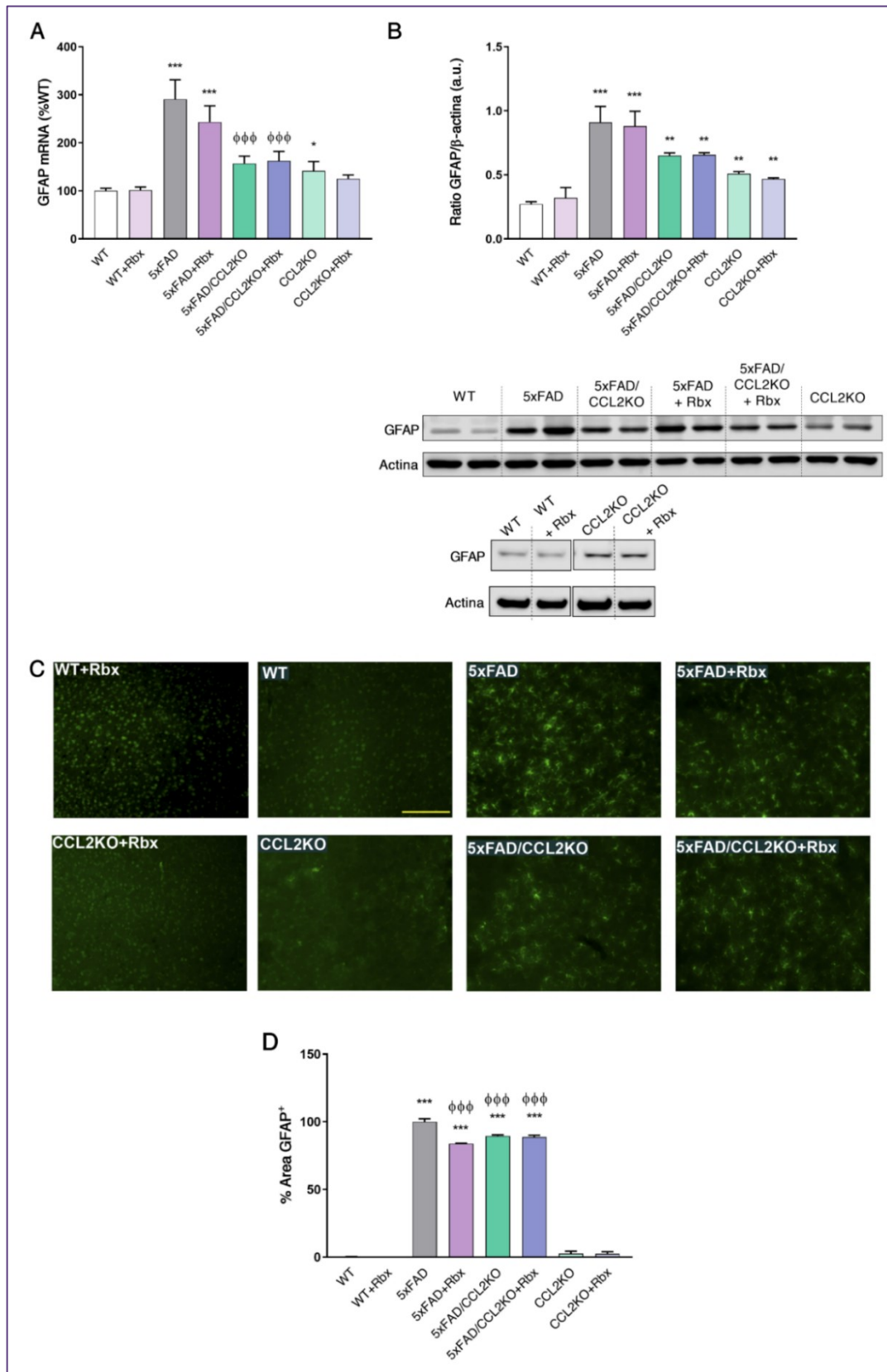


Figura 45. El tratamiento con reboxetina y la supresión genética de CCL2 reducen la expresión y la síntesis de GFAP. Muestras de corteza prefrontal de ratones WT, 5xFAD, 5xFAD/CCL2KO y CCL2KO tratados con vehículo o reboxetina (Rbx). **A)** Determinación de los niveles de mRNA de GFAP. **B)**

*Determinación de los niveles proteicos de GFAP y β -actina. Los geles mostrados son representativos de tres experimentos separados. La gráfica representa el análisis densitométrico de las bandas. UA: unidades arbitrarias relativas a WT. C) Imágenes representativas de la corteza frontal (área somatosensorial primaria) de secciones coronales teñidas para GFAP (verde). La barra de escala corresponde a 100 μ m. D) Determinación del área GFAP⁺ en la corteza frontal. Los datos corresponden a las medias \pm SEM de $n \geq 5$ réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo \times tratamiento) seguido de un post hoc de Tukey. En las gráficas se representan las comparaciones múltiples entre los diferentes grupos. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ vs. WT; $\phi\phi\phi p < 0,001$ vs. 5xFAD.*

El tratamiento con reboxetina y la supresión genética de CCL2 reducen la acumulación de oligómeros y placas de A β

Se ha demostrado que la NA juega un papel relevante en la acumulación de A β , característica patológica de la EA (Kalinin et al., 2007), y que CCL2 también parece modular la formación de placas de A β y la fagocitosis de estos agregados por parte de las células gliales (Naert & Rivest, 2013). En base a esto, hemos analizado si el tratamiento con reboxetina y la supresión genética de CCL2, además de los efectos antiinflamatorios observados, pueden modificar la acumulación de A β en ratones 5xFAD.

La inmunohistoquímica de A β muestra la presencia de placas amiloides en ratones 5xFAD ausentes en los ratones WT (Figura 46). Los ratones 5xFAD tratados con reboxetina presentan una menor densidad de placas amiloides (Figura 46 C). Por otro lado, los ratones 5xFAD/CCL2KO presentaban un número aún menor de placas, pero el tratamiento con reboxetina no afectó a la formación de placas en estos ratones (Figura 46 C). Por lo que este efecto podría ser dependiente de la presencia de CCL2 o simplemente no observarse efecto al verse ya disminuido el número de placas por la mera ausencia de CCL2.

Como complemento se utilizó una técnica alternativa, basada en el uso de Fluoro-Jade C desarrollada durante la presente tesis doctoral (Gutierrez et al., 2018), como método de tinción de las placas de A β . El Fluoro-Jade C, al ser una molécula química de menor tamaño que los anticuerpos, es capaz de penetrar mejor en las placas proporcionando una mejor tinción de estas. De este modo, el Fluoro-Jade C nos permitió detectar con mayor precisión las placas amiloides y utilizar un aumento menor del microscopio con el fin de analizar un área mayor. Las imágenes obtenidas y el recuento de placas confirmaron los resultados obtenidos por la inmunohistoquímica realizada mediante el uso de un anticuerpo anti- β -amiloide (Figura 46 B, D, E).

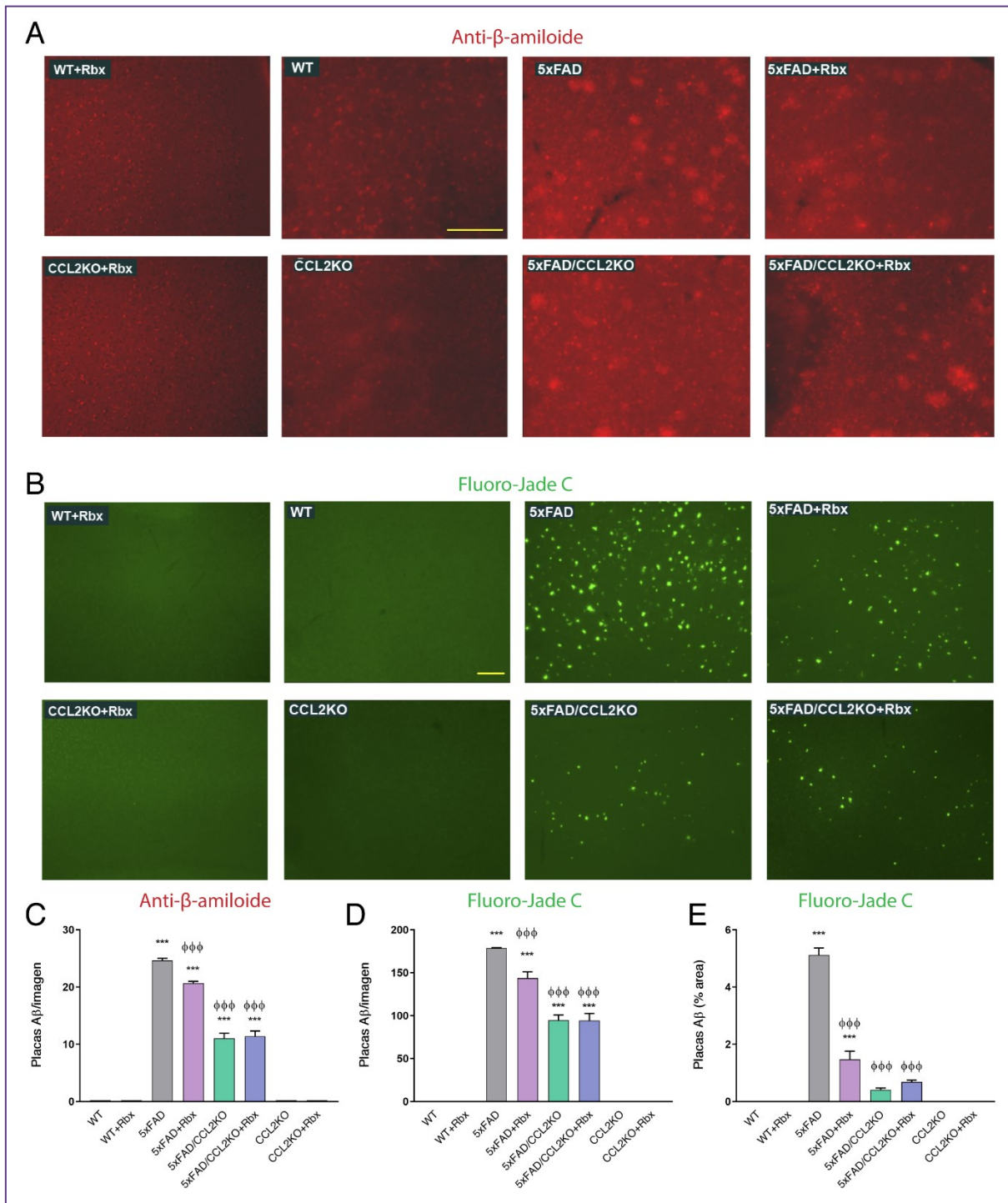


Figura 46. Regulación de la acumulación de β amiloide ($A\beta$). Imágenes representativas de la corteza frontal (área somatosensorial primaria) de secciones coronales preparadas a partir de ratones WT, 5xFAD, 5xFAD/CCL2KO y CCL2KO tratados con vehículo o reboxetina (Rbx) teñidas para **A**) $A\beta$ (rojo) mediante el uso del anticuerpo anti- β -amiloide y **B**) Tinción de placas amiloides mediante el uso del compuesto Fluoro-Jade C (verde). Las barras de escala corresponden a 100 μ m. **C**) Determinación del número de placas $A\beta$ por campo obtenidas mediante el marcaje con el anticuerpo anti- β -amiloide. **D**) Determinación del número de placas $A\beta$ por campo obtenidas mediante el marcaje con Fluoro-Jade C. **E**) Determinación del porcentaje del área total ocupada por placas $A\beta$ teñidas mediante el marcaje con Fluoro-Jade C. Los datos corresponden a las medias \pm SEM de $n \geq 5$ réplicas por grupo. Los datos

se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo x tratamiento) seguido de un post hoc de Tukey. *** $p < 0,001$ vs. WT; $\phi\phi\phi p < 0,001$ vs. 5xFAD.

Además, para comparar la concentración de A β en los homogeneizados tisulares, se utilizó la técnica de WB. El marcaje con un anticuerpo específico dirigido contra los residuos 1-14 de A β dio lugar a la presencia de diferentes bandas correspondientes a diferentes oligómeros de A β . Dos de las bandas, de aproximadamente 50 y 60 kDa fueron las de mayor intensidad. La banda inferior al peso molecular de 50 kDa presentó una intensidad similar para todas las muestras (Figura 47 A). En cambio, se pudieron observar claras diferencias para la banda entre 50 y 75 kDa, correspondiente a 60 kDa (Figura 47 B, C). La relevancia de los agregados de A β de este tamaño en la EA ha sido descrita previamente (Barghorn et al., 2005). La comparación de estas bandas revela que el tratamiento con reboxetina no solo afecta al número total de placas amiloides, sino que también reduce la acumulación de esta forma de agregados de A β (Figura 47 B, C). Mientras que la supresión genética de CCL2 en los ratones 5xFAD no pareció disminuir significativamente la concentración de estos oligómeros. Pero el tratamiento con reboxetina provocó una gran reducción de esta forma de A β en los ratones 5xFAD/CCL2KO, sugiriendo que este efecto de la reboxetina es independiente de la presencia de CCL2.

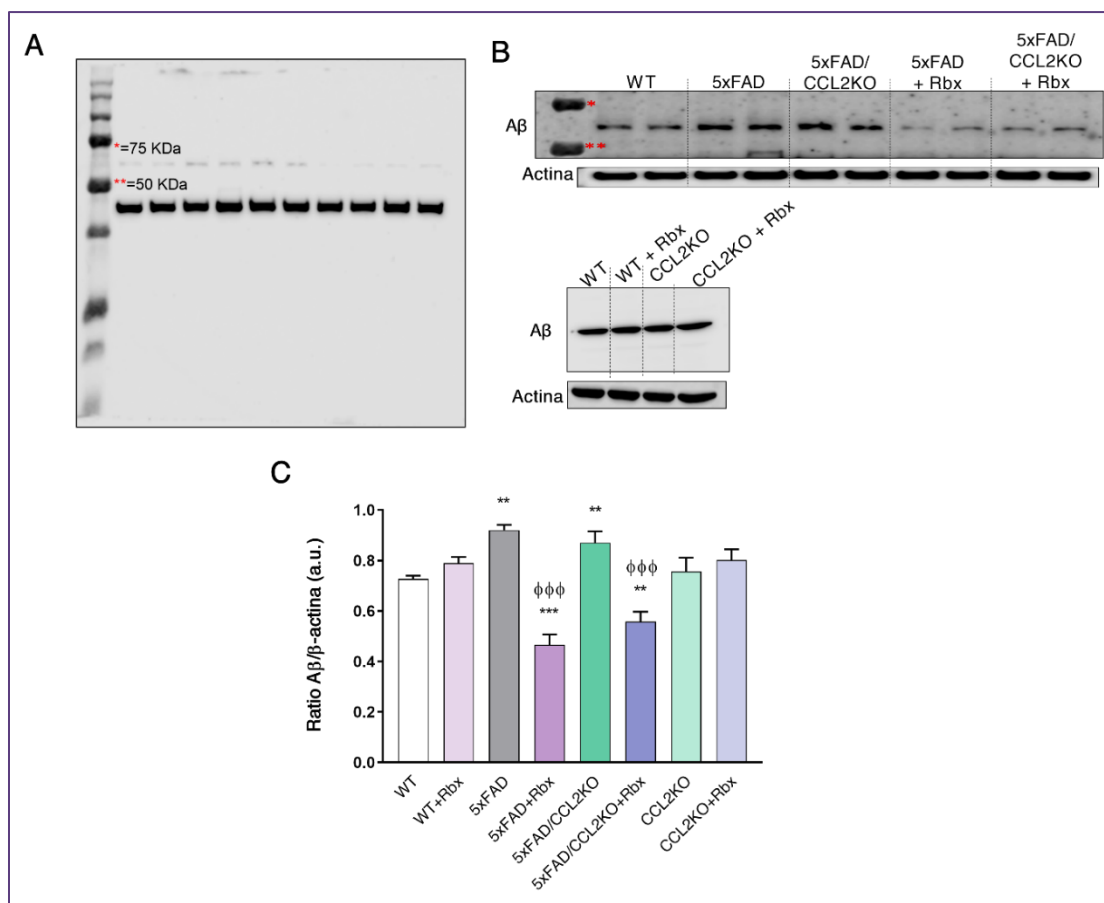


Figura 47. Regulación de la acumulación de A β . Muestras de corteza prefrontal de ratones WT, 5xFAD, 5xFAD/CCL2KO y CCL2KO tratados con vehículo o reboxetina (Rbx). **A)** Imagen representativa de toda la membrana de WB. **B)** Determinación de los niveles de A β y β -actina. Los gels mostrados son representativos de tres experimentos separados. **C)** Análisis densitométrico de las bandas. UA:

unidades arbitrarias relativas a WT. Los datos corresponden a las medias \pm SEM de $n \geq 5$ réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo x tratamiento) seguido de un post hoc de Tukey. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ vs. WT; $\phi\phi\phi p < 0,001$ vs. 5xFAD.

El tratamiento con reboxetina y la supresión genética de CCL2 reducen el daño axonal

La inflamación crónica junto con la reactividad de las células gliales, así como la acumulación de A β se consideran los principales agentes causantes del daño axonal y degeneración neuronal en la EA (Craft et al., 2006). Por lo tanto, se analizó a continuación la presencia de daño axonal.

En primer lugar, se realizaron análisis inmunohistoquímicos para comparar la concentración del neurofilamento H no fosforilado (SMI32) en la corteza frontal ya que nos proporciona un índice indirecto de daño axonal (Fowler et al., 2003; Gilgun-Sherki et al., 2003; Kalinin et al., 2006). La intensa tinción de SMI32 en las proyecciones axonales en la corteza cerebral de los ratones 5xFAD confirma la presencia de daño axonal en estos ratones (Figura 48 A, B). Además, de acuerdo con las observaciones anteriores, la administración de reboxetina disminuyó el daño axonal en los ratones 5xFAD. Una protección similar fue proporcionada por la eliminación genética de CCL2 en los animales 5xFAD. Mientras que el tratamiento con reboxetina en ratones 5xFAD/CCL2KO no ejerció ningún efecto. Lo que nuevamente puede sugerir que este efecto sea dependiente de CCL2 o que el propio efecto que presenta la supresión genética de CCL2 en los ratones 5xFAD no permite detectar el efecto de la reboxetina.

Finalmente, la detección del marcaje de neurofilamento H no fosforilado (SMI32) en homogeneizados de la corteza frontal mediante WB confirmó la existencia de las diferencias observadas por inmunohistoquímica (Figura 49).

Ambas técnicas demuestran también un aumento considerable de la señal proporcionada por las muestras CCL2KO en comparación con los ratones WT. Indicándonos que la supresión de CCL2 en ausencia de otras alteraciones produce daño neuronal.

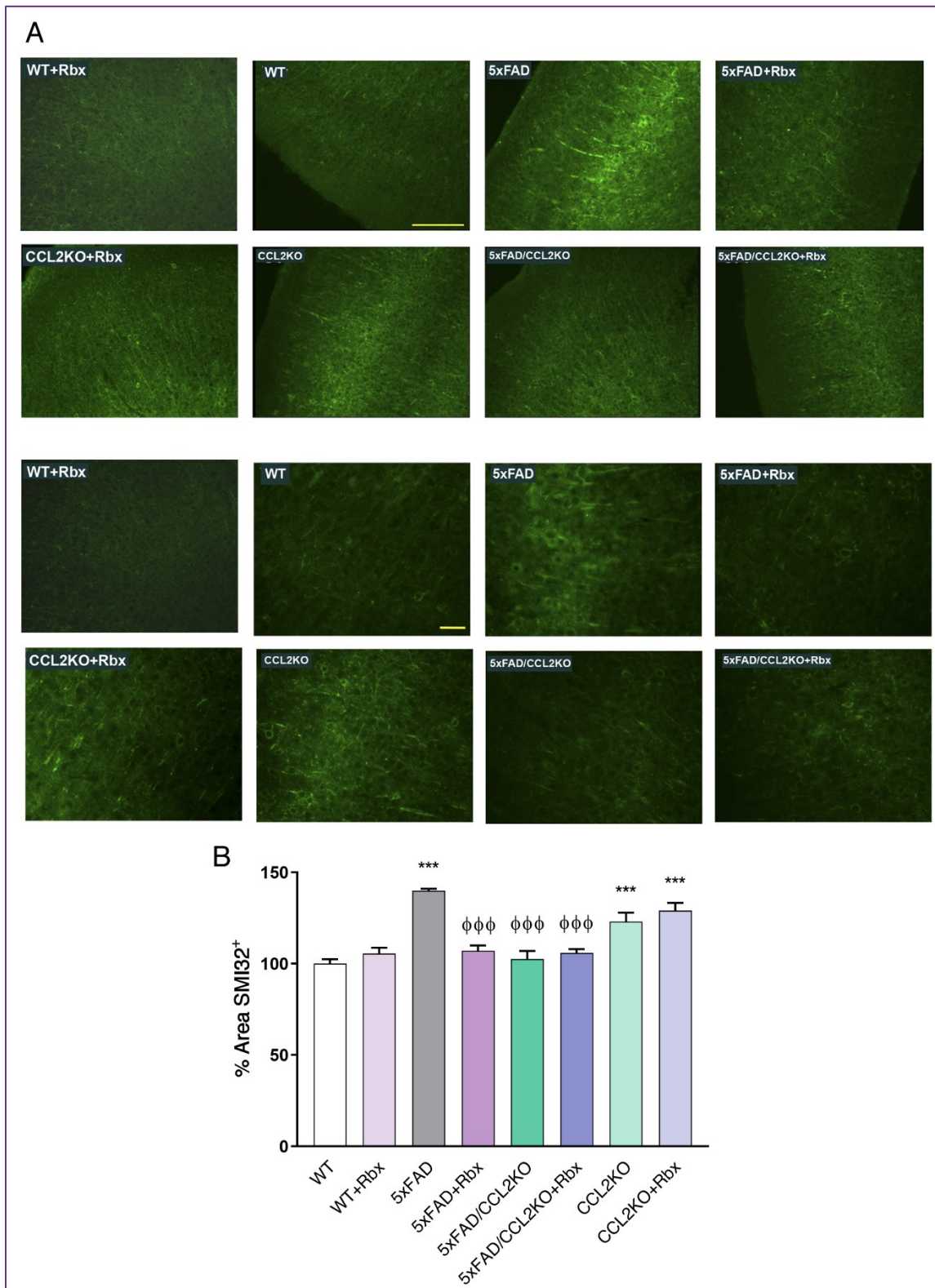


Figura 48. El tratamiento con reboxetina y la supresión genética de CCL2 reducen el daño axonal. **A)** Imágenes representativas de la corteza frontal (área somatosensorial primaria) de secciones coronales preparadas a partir de ratones WT, 5xFAD, 5xFAD/CCL2KO y CCL2KO tratados con vehículo o reboxetina (Rbx) y teñidos con anticuerpo anti-neurofilamento H no fosforilado (SMI32 verde). La barra de escala corresponde a 100 μ m (panel superior) y 25 μ m (panel inferior). **B)** Análisis cuantitativo del % de área positiva para SMI32. Los datos corresponden a las medias \pm SEM de $n \geq 5$ réplicas por

grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo x tratamiento) seguido de un post hoc de Tukey. *** $p < 0,001$ vs. WT; $\phi\phi\phi p < 0,001$ vs. 5xFAD.

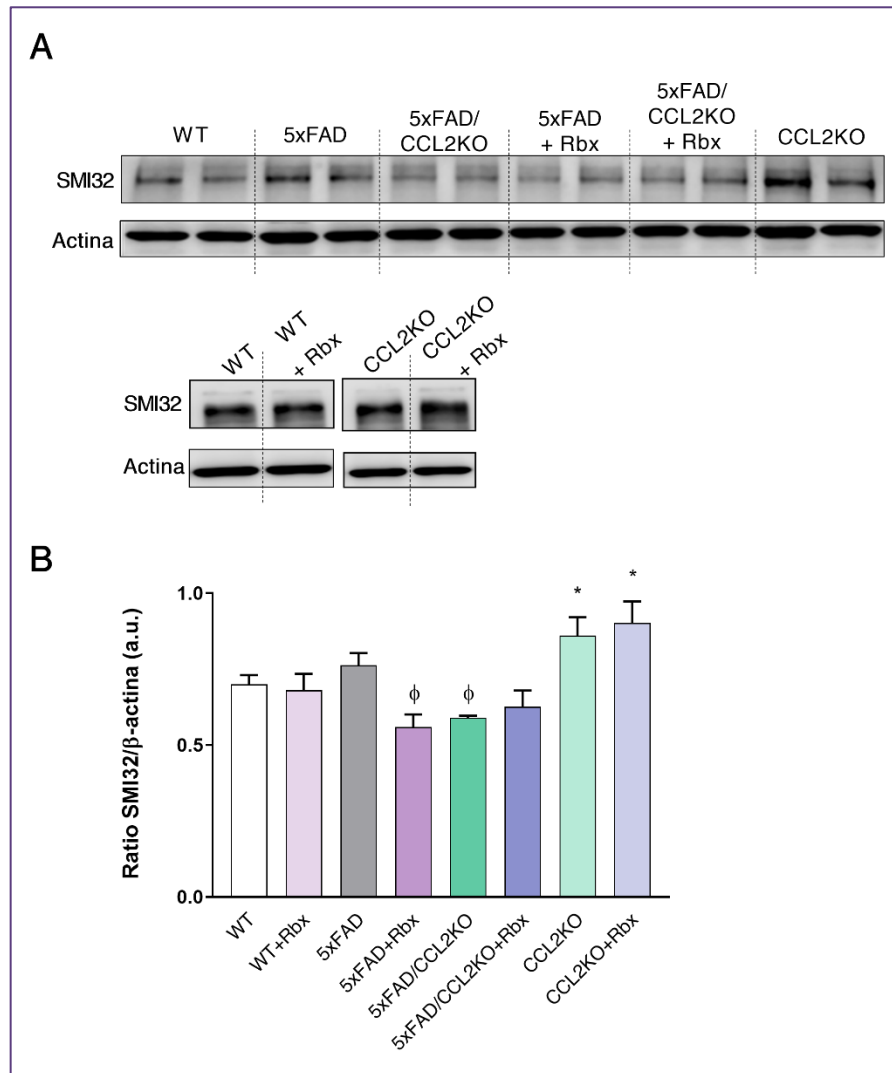


Figura 49. El tratamiento con reboxetina y la supresión genética de CCL2 reducen los niveles totales del neurofilamento H no fosforilado. **A)** Determinación de los niveles de proteicos del neurofilamento H no fosforilado (marcado con SMI32) y β -actina en muestras de corteza cerebral de ratones WT, 5xFAD, 5xFAD/CCL2KO y CCL2KO tratados con vehículo o reboxetina (Rbx). Los geles mostrados son representativos de tres experimentos separados. **B)** Análisis densimétrico de las bandas. UA: unidades arbitrarias relativas a WT. Los datos corresponden a las medias \pm SEM de $n \geq 5$ réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo x tratamiento) seguido de un post hoc de Tukey. * $p < 0,05$ vs. WT; $\phi p < 0,05$ vs. 5xFAD.

El tratamiento con reboxetina y la supresión genética de CCL2 reducen la apoptosis celular

Con el fin de determinar si la neuroinflamación y la acumulación de A β observadas se traducen en una pérdida de células, analizamos los niveles del marcador de apoptosis anexina V mediante estudios de inmunohistoquímica y WB.

Los ratones 5xFAD presentan mayores niveles de anexina V, indicando un aumento en la apoptosis celular en estos ratones en comparación con ratones WT (Figura 50, Figura 51). El tratamiento con reboxetina redujo la síntesis de anexina V en ratones 5xFAD, indicando la existencia de un menor grado de apoptosis en la corteza cerebral (Figura 50, Figura 51). La supresión genética de CCL2 en ratones 5xFAD también condujo a una reducción de anexina V en comparación con ratones 5xFAD. Mientras que el tratamiento con reboxetina en estos ratones, incrementó los niveles de anexina V, aunque estos datos no se confirman mediante WB. Por otro lado, los ratones CCL2KO muestran una mayor síntesis de anexina V en comparación a los animales WT indicándonos nuevamente el efecto deletéreo de la supresión de CCL2 en ratones WT.

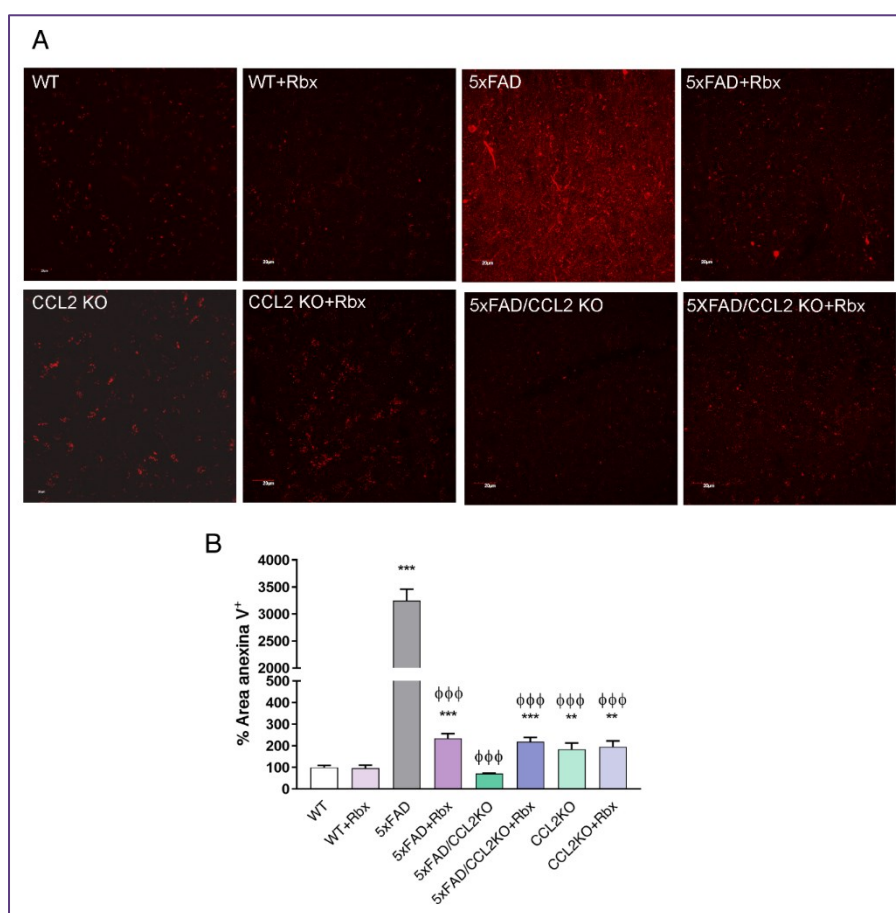


Figura 50. El tratamiento con reboxetina y la supresión genética de CCL2 reducen la apoptosis celular en la corteza cerebral de 5xFAD. **A)** Imágenes de microscopía confocal representativas de la corteza frontal (área somatosensorial primaria) de secciones coronales preparadas a partir de ratones WT, 5xFAD, 5xFAD/CCL2KO y CCL2KO tratados con vehículo o reboxetina (Rbx) y teñidos para anexina V (rojo). La barra de escala corresponde a 20 μ m. **B)** Determinación del % del área positiva para anexina V. Los datos corresponden a las medias \pm SEM de $n \geq 5$ réplicas por grupo. Los datos se analizaron

mediante un ANOVA de dos vías (genotipo x tratamiento) seguido de un post hoc de Tukey. $***p < 0,001$, $**p < 0,01$ vs. WT; $φφφp < 0,001$ vs. 5xFAD.

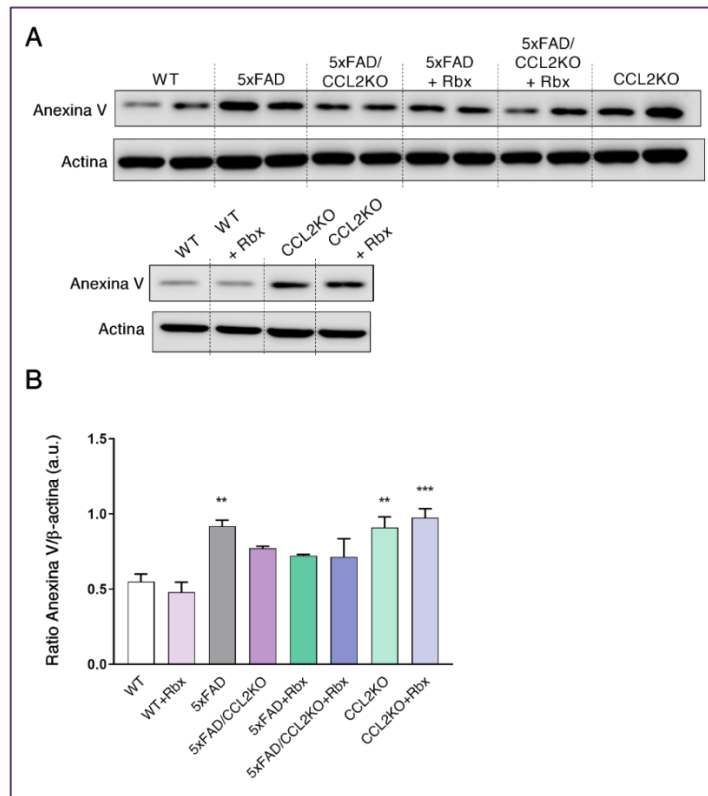


Figura 51. La supresión genética de CCL2 aumenta la apoptosis celular en la corteza cerebral de ratones WT. **A)** Determinación de los niveles proteicos de anexina V y β-actina en muestras de corteza cerebral de ratones WT, 5xFAD, 5xFAD/CCL2KO y CCL2KO tratados con vehículo o reboxetina (Rbx). Los geles mostrados son representativos de tres experimentos separados. **B)** Análisis densitométrico de las bandas. UA: unidades arbitrarias relativas a WT. Los datos corresponden a las medias ± SEM de $n \geq 5$ réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo x tratamiento) seguido de un post hoc de Tukey. $***p < 0,001$, $**p < 0,01$ vs. WT.

El paralelismo encontrado entre los niveles de SMI32 y anexina V en los ratones CCL2KO, nos sugirió que algunas de las células apoptóticas detectadas podrían ser neuronas. Por lo tanto, se realizó una inmunotinción doble en las muestras obtenidas de ratones 5xFAD y CCL2KO para la anexina V y NeuN (marcador neuronal específico). La colocalización detectada confirmó que las células neuronales estaban incluidas entre las que sufrían apoptosis (Figura 52).

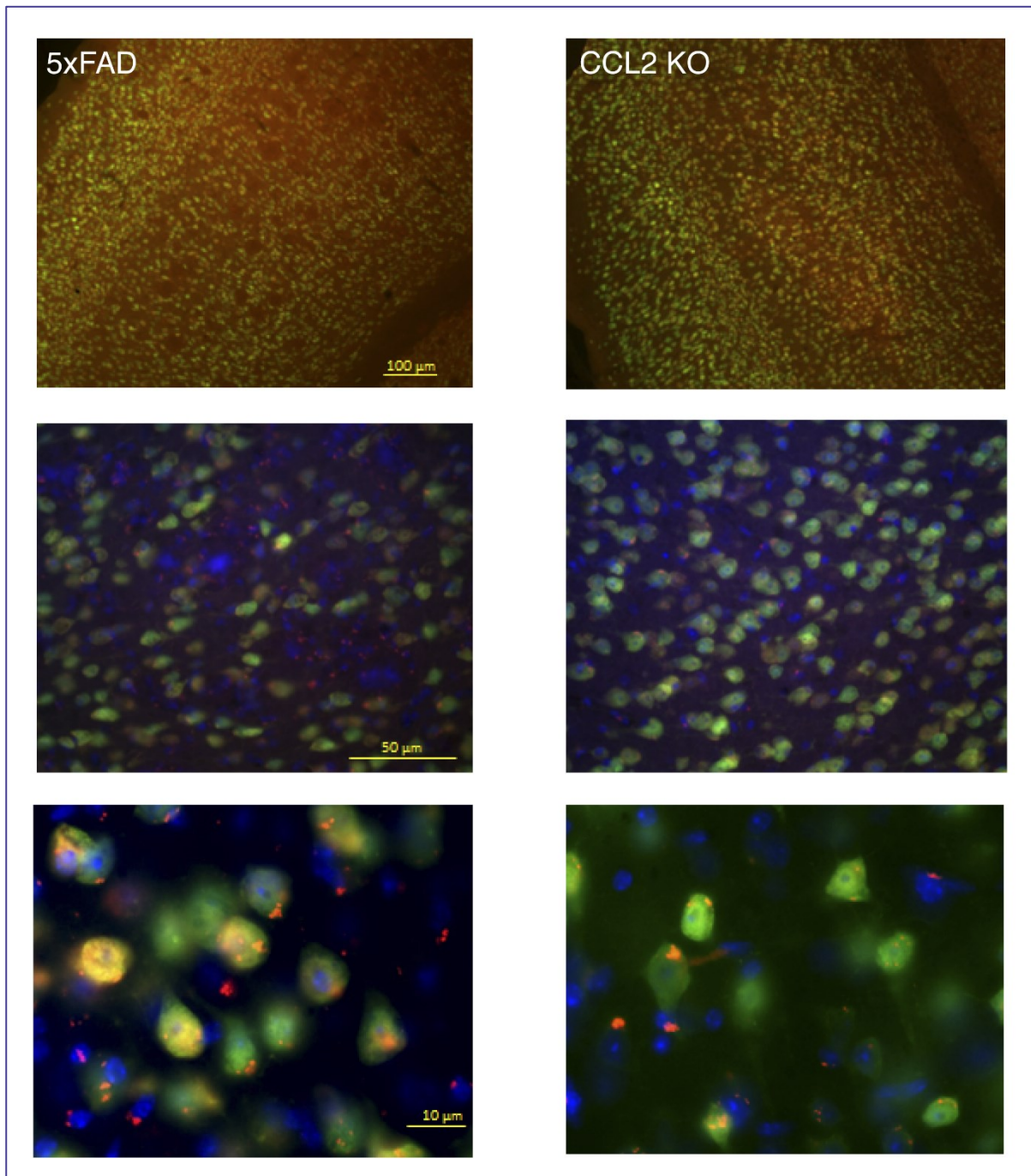


Figura 52. Identificación de células dañadas con un marcador neuronal. Imágenes representativas de la corteza frontal (área somatosensorial primaria) de secciones coronales preparadas a partir de ratones 5xFAD y CCL2KO tratados con vehículo y teñidos para anexina V (rojo), NeuN (verde) y DAPI (azul). Las imágenes mostradas son representativas de tres experimentos separados.

6.2 EFECTO DE LA QUIMIOQUINA CCL2 EN LA RESOLUCIÓN DE LA INFLAMACIÓN

La falta de control adecuado de las respuestas inflamatorias dentro del SNC contribuye en gran medida al daño característico de muchas enfermedades neurodegenerativas como la EA (Kinney et al., 2018). Entre los diferentes mediadores responsables de la propagación de las señales inflamatorias, las quimioquinas constituyen uno de los grupos más relevantes. Múltiples estudios indican que la sobreexpresión de CCL2 contribuye a la progresión de los procesos inflamatorios y a la neurodegeneración asociada a ellos (Madrigal & Caso, 2014). De acuerdo con esto, tras haber observado cómo la supresión genética de CCL2 en ratones 5xFAD presentó un efecto protector disminuyendo la inflamación y reactividad astrocítica, así como el acúmulo de placas amiloides, el daño axonal y la apoptosis celular, hipotetizamos que la quimioquina CCL2, presente en animales 5xFAD, podría estar favoreciendo la cronificación de la inflamación y por este motivo su delección genética en ratones 5xFAD presenta el efecto antiinflamatorio y neuroprotector observado. Sin embargo, otros estudios han demostrado que la delección genética del receptor de CCL2, CCR2, facilita la progresión de la neurodegeneración en diferentes modelos de ratón de la EA (El Khoury et al., 2007; Naert & Rivest, 2011). Por lo tanto, la regulación por CCL2 de la neuroinflamación en el SNC parece ser un proceso complejo.

En base a esto, decidimos analizar si la acumulación de CCL2 modifica los procesos implicados en la resolución de la inflamación en las células gliales, que parecen jugar un papel clave en la progresión de la EA (Whittington et al., 2017), favoreciendo así la cronificación de la inflamación. Para ello, nos centramos en el estudio de la regulación por parte de CCL2 de la vía de la resolvina D1 (RvD1) (Figura 53), que se sabe que desempeña un papel clave en la resolución de la inflamación dentro del SNC y en la progresión de los trastornos neurodegenerativos, principalmente la EA (Miyazawa et al., 2020).

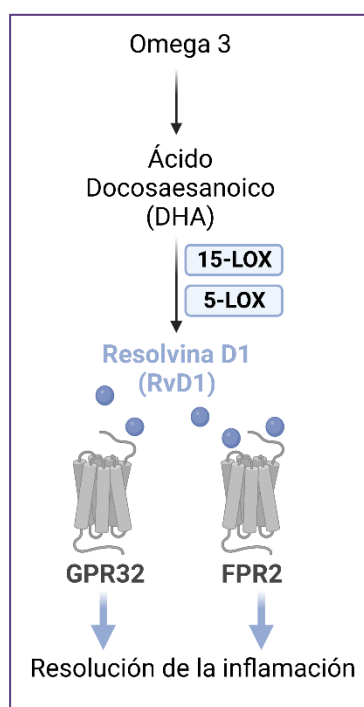


Figura 53. Vía de la resolvina D1 (RvD1).

La eliminación de CCL2 aumenta la expresión de FPR2, 15-LOX y 5-LOX en ratones 5xFAD

Los estudios de expresión genética nos permitieron cuantificar la expresión del receptor FPR2, principal receptor de la RvD1 (Schmitz Nunes et al., 2020), en muestras de corteza frontal. Mientras que el homólogo del gen GPR32 humano se encontró en rata, este solo está presente en ratón como un pseudogen, lo que explica que no se haya determinado su expresión en estas muestras.

En cuanto a la expresión de FPR2, no encontramos diferencias entre ratones WT y 5xFAD. Sin embargo, la expresión de FPR2 aumentó en los ratones CCL2KO y 5xFAD/CCL2KO (Figura 54 A).

Además de FPR2, también analizamos la expresión de araquidonato 15-lipoxigenasa (15-LOX) y araquidonato 5-lipoxigenasa (5-LOX), enzimas responsables de la producción de metabolitos lipídicos, entre los que se encuentra la RvD1 (Li et al., 2020). De este modo, observamos que la supresión genética de CCL2 en los ratones 5xFAD aumenta la expresión de 15-LOX y 5-LOX (Figura 54 B, C). Sin embargo, la expresión de estas enzimas no aumentó en los ratones CCL2KO. Por lo tanto, la posible regulación de la expresión de 15-LOX y 5-LOX por parte de CCL2 puede que solo tenga lugar en presencia de estímulos inflamatorios como los presentes en los cerebros de los ratones 5xFAD.

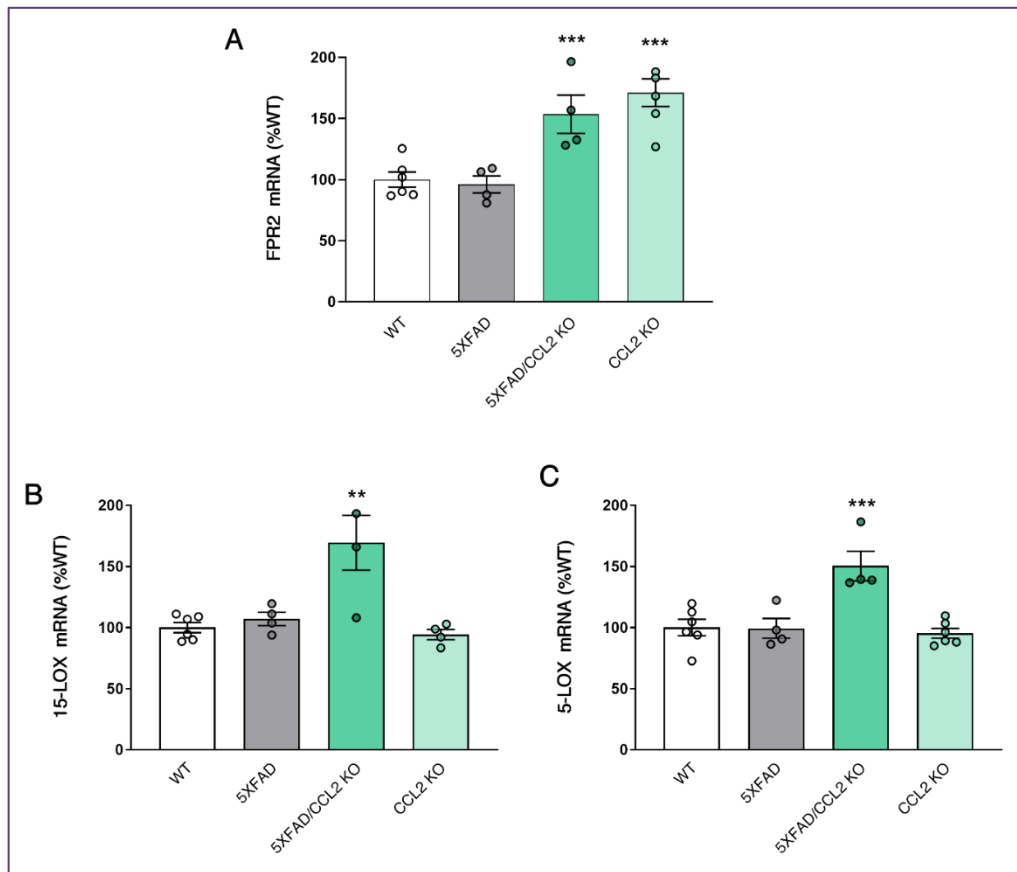


Figura 54. La supresión genética de CCL2 en los ratones 5xFAD aumenta la expresión del receptor y enzimas de síntesis de la RvD1. Se analizó los niveles de mRNA de FPR2, 15-LOX y 5-LOX en muestras de corteza frontal de ratones WT, 5xFAD, CCL2-KO y 5xFAD/CCL2-KO. Los datos corresponden a las medias SEM de $n < 3$ réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguido de un post hoc de Tukey. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ vs. WT.

CCL2 previene la expresión de enzimas y receptores de la resolvina D1 (RvD1)

La mayor expresión del receptor, FPR2, y enzimas de síntesis, 15-LOX y 5-LOX, de la RvD1 observada en la corteza frontal de los ratones 5xFAD/CCL2KO indica que la actividad de la quimioquina CCL2 puede inhibir su producción. Para confirmar el efecto regulador de CCL2 sobre la expresión de FPR2, 15-LOX y 5-LOX, analizamos la expresión de estas proteínas *in vitro*. Para estos estudios, decidimos utilizar astrocitos ya que, aunque diferentes tipos de células participan en la respuesta inflamatoria dentro de la corteza cerebral, los astrocitos son la principal fuente de CCL2 en el cerebro (Glabiniski et al., 1996) y sobre los que hemos observado que la supresión genética de CCL2 ejerce un mayor efecto (Figura 45). Esto nos permitió analizar cómo los astrocitos aislados responden a un aumento transitorio de la concentración de CCL2 en su entorno. Para ello utilizamos cultivos primarios de astrocitos de rata obtenidos según el protocolo descrito en el apartado de material y métodos (Figura 35), los cuales se sometieron a los tratamientos descritos anteriormente (Figura 36). En resumen, los astrocitos fueron tratados durante 24 horas en condiciones control o con la quimioquina CCL2 (100 ng/ml), posteriormente se eliminó el medio de cultivo y se añadió LPS (0,1 g/ml) y/o CCL2 (100 ng/ml) durante 6 y 24 horas. Finalmente, se eliminó el medio de cultivo y se

recogieron los lisados celulares para la extracción de RNA y determinación de la expresión génica mediante RT-PCR. De este modo se obtuvieron cuatro grupos experimentales, a saber: C, LPS, CCL2-LPS y CCL2 (Figura 55).

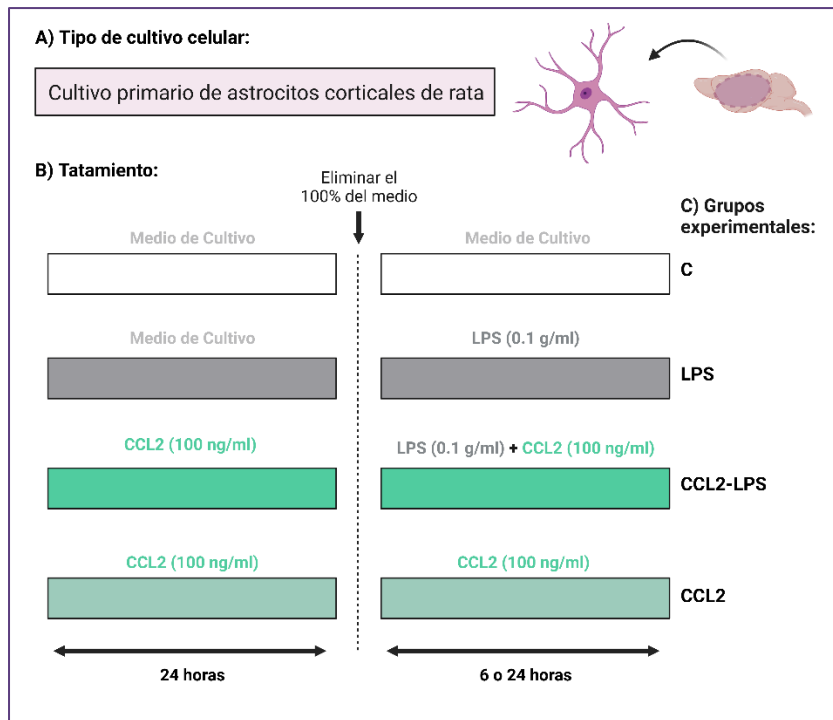


Figura 55. Resumen gráfico del tratamiento utilizado en cultivos primarios de astrocitos corticales de rata. N= 6 por grupo (C, LPS, CCL2-LPS, CCL2).

El tratamiento con LPS incrementó la expresión de FPR2, GPR32, 15-LOX y 5-LOX tras 6 horas de tratamiento. Sin embargo, el pretratamiento de los astrocitos con CCL2 durante 24 horas impidió el efecto del LPS sobre la expresión de todas las lipoxigenasas y receptores analizados (Figura 56 A, B, C, D), confirmando así la acción inhibitoria de CCL2 sobre la expresión astrogliar de estos mediadores. Finalmente, a las 24 horas tras el tratamiento con LPS se pierde el efecto inductor del LPS sobre la expresión de estos genes, y la quimioquina CCL2 deja de tener el efecto anteriormente mostrado (Figura 56 E, F, G, H).

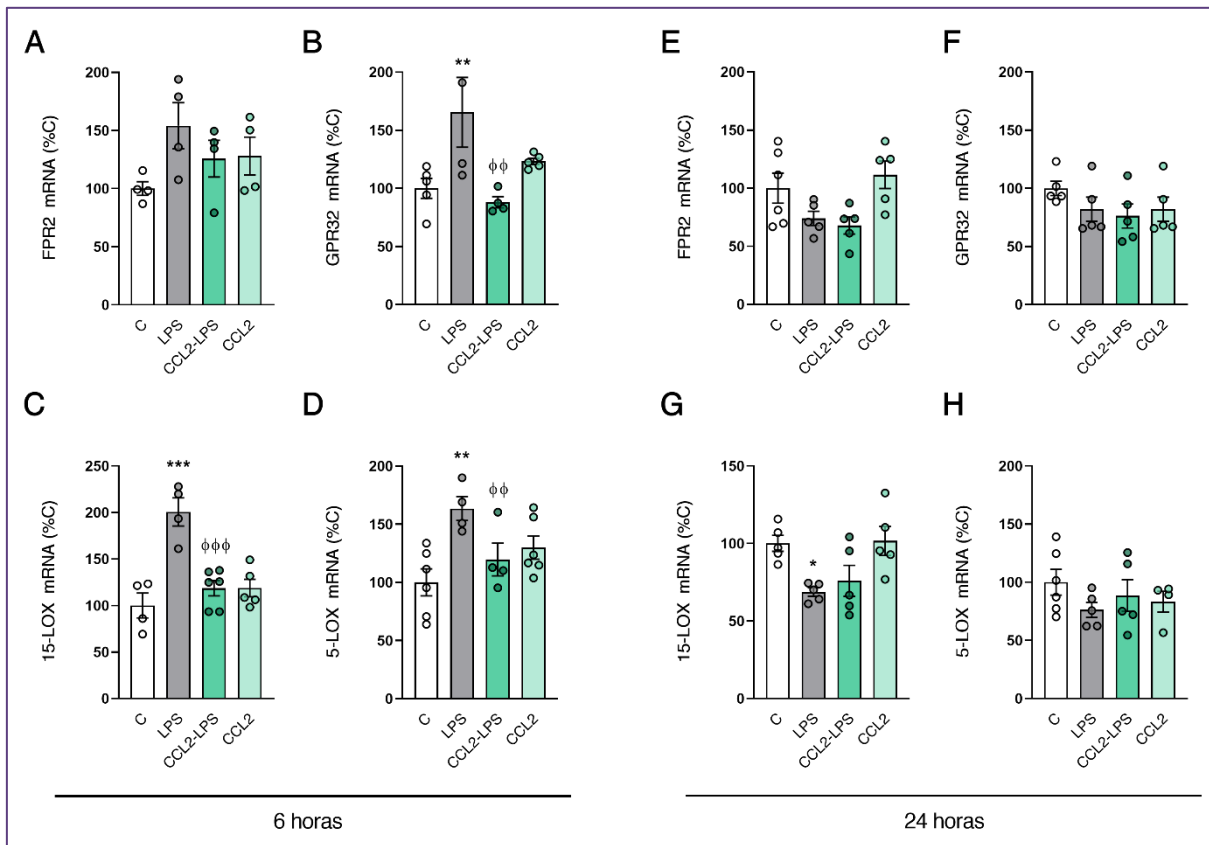


Figura 56. CCL2 impide la expresión de marcadores pro-resolución a las 6 horas tras el tratamiento con LPS. Cultivos de astrocitos primarios de rata se incubaron con o sin CCL2 (100 ng/ml), 24 horas después, se sustituyó todo el medio en todos los pocillos, manteniendo CCL2 donde se utilizó para el pretratamiento y añadiendo LPS (0,1 g/ml) a los grupos indicados. 6 y 24 horas después se determinó los niveles de mRNA de FPR2, GPR32, 15-LOX y 5-LOX. Los datos corresponden a las medias SEM de $n = 6$ réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguido de un post hoc de Tukey. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ vs. C; φφφ $p < 0,001$, φφ $p < 0,01$ vs. LPS.

CCL2 potencia la producción de marcadores inflamatorios inducidos por LPS en astrocitos

Según nuestros resultados, la inhibición por CCL2 de la expresión de las lipoxigenasas y receptores analizados podría prolongar la resolución de la respuesta inflamatoria y mantener la producción de agentes inflamatorios y neurotóxicos. Para confirmarlo, realizamos el mismo tratamiento a los astrocitos primarios de rata que el indicado anteriormente, pero esta vez el LPS se dejó durante 48 horas con el fin de analizar la acumulación de diferentes marcadores proinflamatorios tanto en el medio de cultivo como en el interior celular (Figura 57).

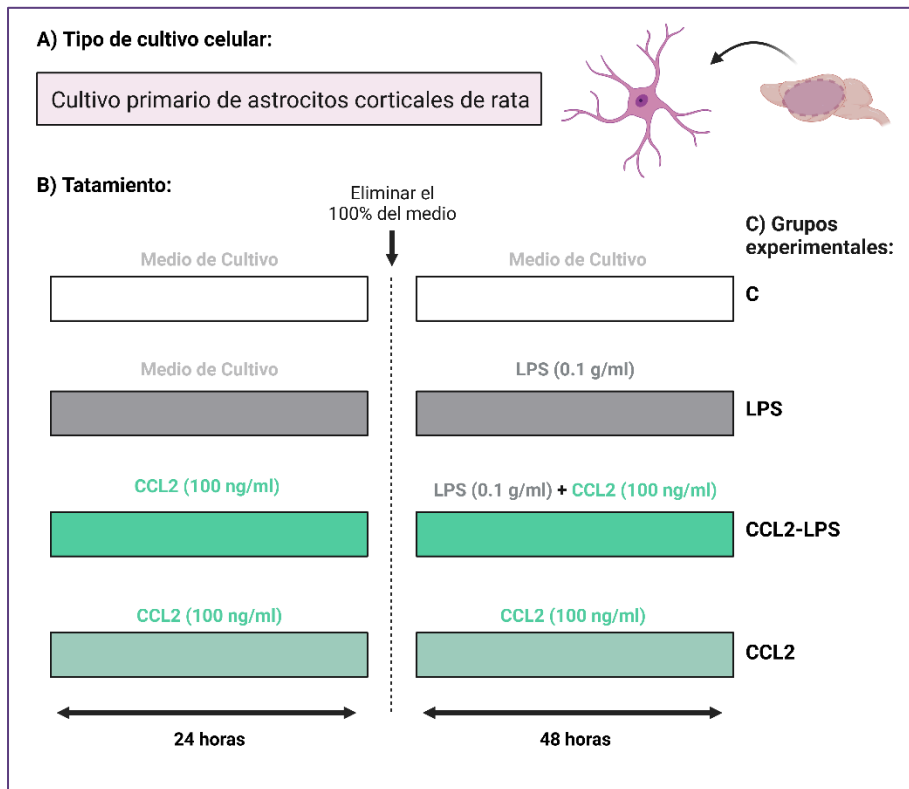


Figura 57. Resumen gráfico del tratamiento utilizado en cultivos primarios de astrocitos corticales de rata. N= 6 por grupo (C, LPS, CCL2-LPS, CCL2).

En primer lugar, analizamos la producción de IL1 β por su papel como mediador responsable de la propagación de señales proinflamatorias y del daño neuronal. El tratamiento con LPS incrementa la expresión de IL1 β (Figura 58 A) y el pretratamiento con CCL2 potencia el efecto del LPS aumentando la expresión de IL1 β . El empleo de las técnicas de ELISA y WB nos permitió detectar aumentos de IL1 β secretada y acumulada en el interior celular respectivamente. Así, el pretratamiento con CCL2 incrementó la concentración de IL1 β liberada al medio de cultivo (Figura 58 B) y acumulada en el interior celular (Figura 58 C).

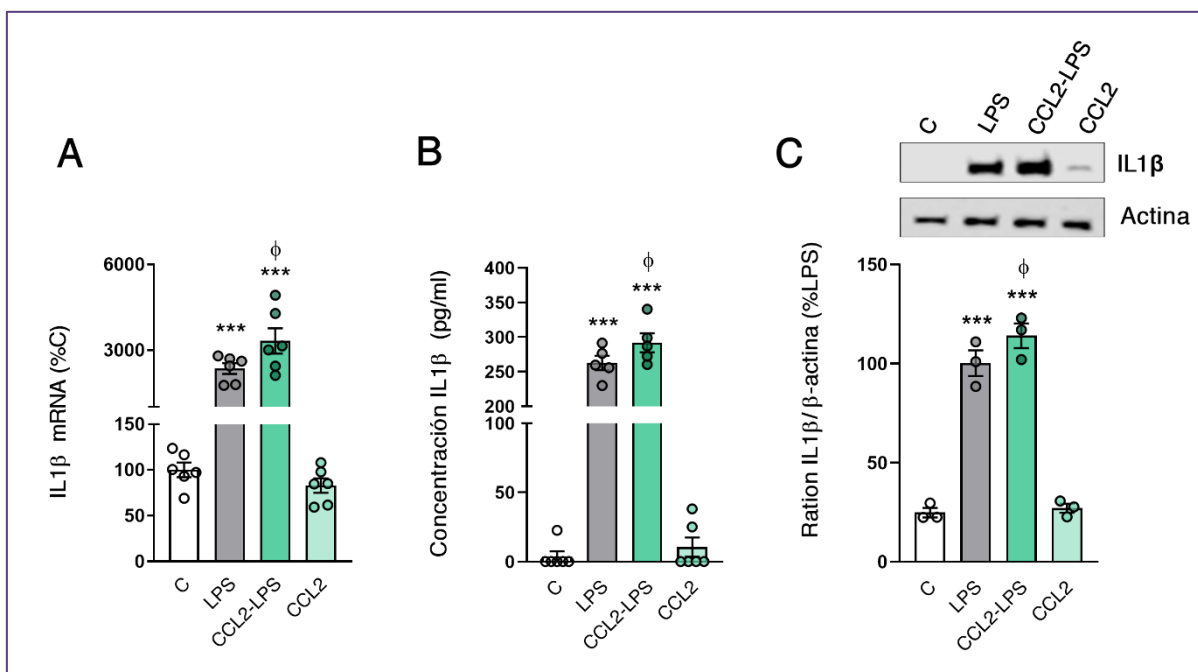


Figura 58. CCL2 induce la producción de IL1β. Cultivos de astrocitos primarios de rata se incubaron con o sin CCL2 (100 ng/ml), 24 horas después, se sustituyó todo el medio en todos los pocillos, manteniendo CCL2 donde se utilizó para el pretratamiento y añadiendo LPS (0,1 g/ml) a los grupos indicados que se trataron durante 48 horas. **A)** Determinación de los niveles de mRNA de IL1β. **B)** Determinación de la concentración de IL1β en el medio de cultivo. **C)** Determinación de los niveles de IL1β en lisados citosólicos. La gráfica muestra el análisis densitométrico de las bandas en % frente al grupo LPS. Los gels mostrados son representativos de experimentos realizados en tres preparaciones separadas de astrocitos. IL1β: 31 KDa (proteína precursora), Actina/β-actina: 42 KDa. Los datos representados corresponden a las medias ± SEM de n = 6 réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguido de un post hoc de Tukey. *** p < 0,001 vs. C; ϕ p < 0,05 vs. LPS.

Además de IL1β, analizamos la expresión de otros marcadores de activación astrocítica y neuroinflamación como el TNFα, MIP-1α y NOS2. De forma similar a lo que encontramos en el caso de la IL1β, la expresión de estos marcadores fue inducida por el LPS y el pretratamiento con CCL2 también potenció el efecto del LPS (Figura 59).

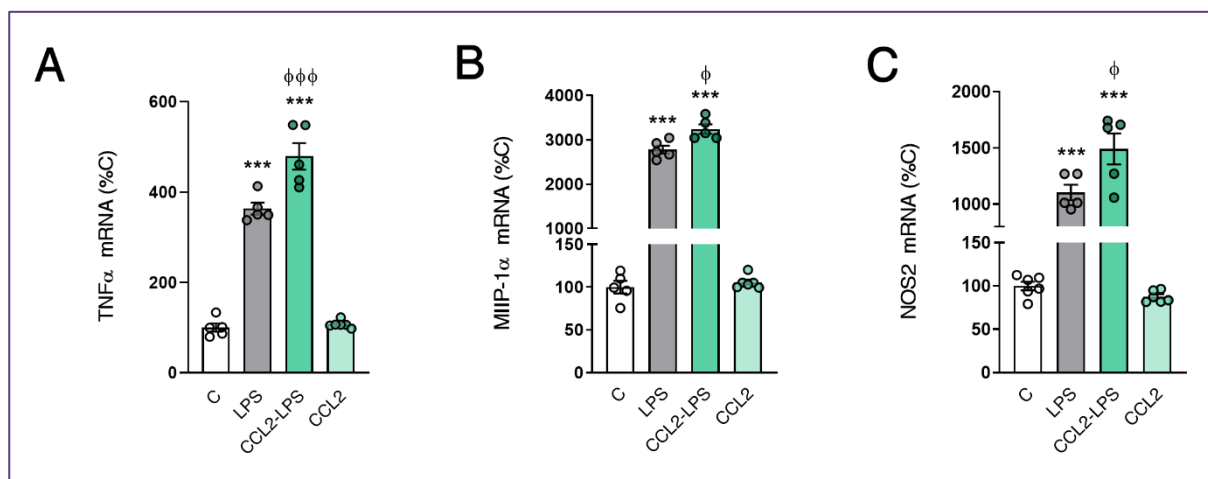


Figura 59. CCL2 induce la producción de marcadores proinflamatorios. Cultivos de astrocitos primarios de rata se incubaron con o sin CCL2 (100 ng/ml), 24 horas después, se sustituyó todo el medio en todos los pocillos, manteniendo CCL2 donde se utilizó para el pretratamiento y añadiendo LPS (0,1 g/ml) a los grupos indicados que se trataron durante 48 horas. Posteriormente se determinó los niveles de mRNA de TNF α , MIP-1 α y NOS2. Los datos corresponden a las medias \pm SEM de $n = 6$ réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguido de un post hoc de Tukey. *** $p < 0,001$ vs. C, $\phi\phi\phi p < 0,001$; $\phi p < 0,05$ vs. LPS.

Para determinar si el incremento en la expresión de estos marcadores proinflamatorios se traducía en un aumento de los niveles proteicos, se analizó la liberación de TNF α y MIP-1 α al medio de cultivo mediante ELISA, la síntesis de la enzima NOS2 mediante WB y la liberación de nitritos al medio de cultivo mediante el ensayo de Griess a las 48 horas tras el tratamiento con LPS (Figura 60).

El tratamiento con LPS indujo la liberación del TNF α y MIP-1 α al medio extracelular (Figura 60 A, B). Sin embargo, el pretratamiento con CCL2 no incrementó la liberación de dichos marcadores inflamatorios. Por otro lado, el tratamiento con LPS incrementó la síntesis de la enzima NOS2, y aunque la presencia de CCL2 parece incrementar su síntesis, los datos no son significativos (Figura 60 C). Finalmente, el aumento de la enzima NOS2 se tradujo en un aumento en la liberación de nitritos al medio celular tras el tratamiento con LPS, sin embargo, la presencia de CCL2 no incrementó los niveles de nitritos medidos en el medio celular (Figura 60 D).

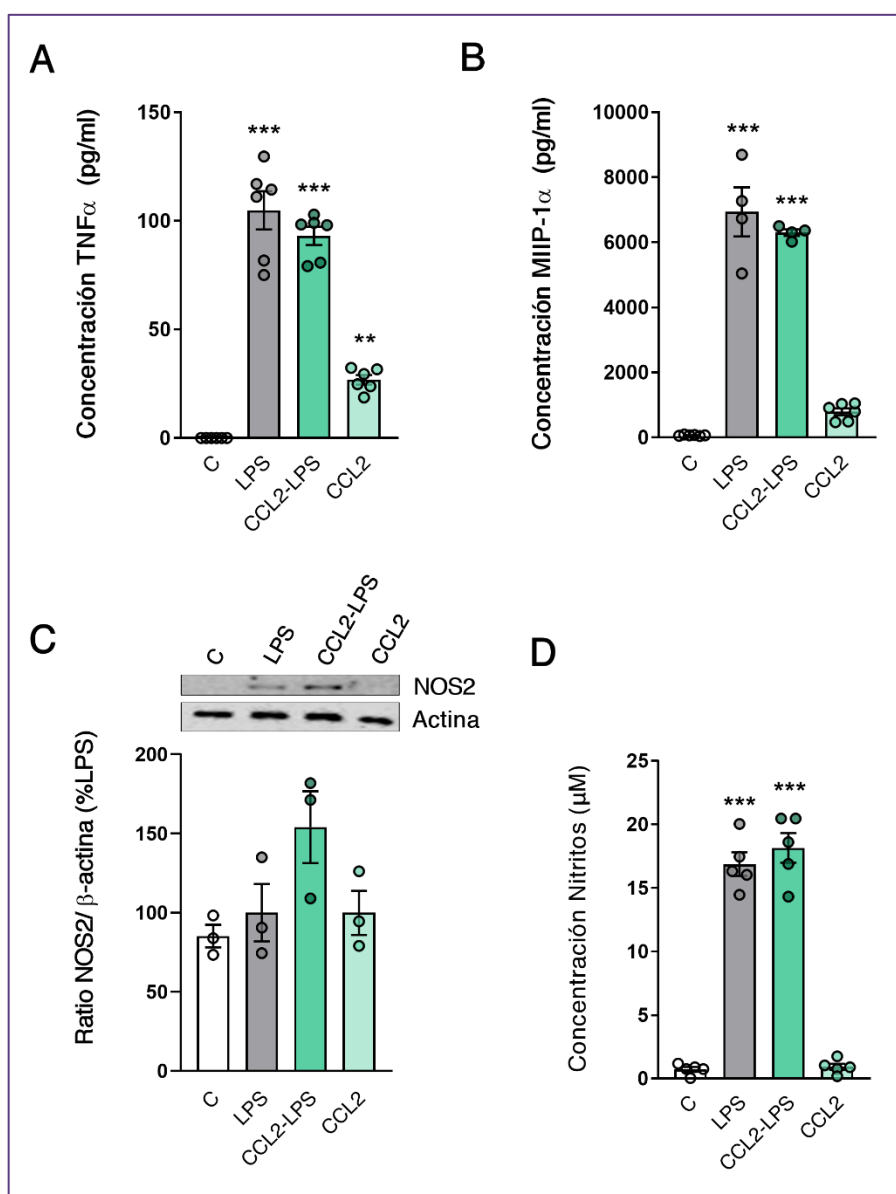


Figura 60. CCL2 no afecta a los niveles proteicos de los marcadores proinflamatorios analizados. Cultivos de astrocitos primarios de rata se incubaron con o sin CCL2 (100 ng/ml), 24 horas después, se sustituyó todo el medio en todos los pocillos, manteniendo CCL2 donde se utilizó para el pretratamiento y añadiendo LPS (0,1 g/ml) a los grupos indicados que se trataron durante 48 horas. **A-B)** Determinación de los niveles de mRNA de TNF α y MIP-1 α . **C)** Determinación de los niveles proteicos de NOS2 en extractos citosólicos. La gráfica muestra el análisis densitométrico de las bandas en % frente al grupo LPS. Los gels mostrados son representativos de experimentos realizados en tres preparaciones separadas de astrocitos. NOS2: 130 KDa, Actina/ β -actina: 42 KDa. **D)** Determinación de los niveles de nitritos en el medio de cultivo. Los datos corresponden a las medias \pm SEM de $n \geq 3$ réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguido de un post hoc de Tukey. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ vs. C.

CCL2 inhibe la reducción en la expresión de la IL1 β inducida por la RvD1

Para determinar si la elevación de los niveles de IL1 β por parte de CCL2 se debía a la inhibición de los receptores FPR2 y GPR32, analizamos el efecto de RvD1, ligando específico para estos receptores. Para ello, los cultivos primarios de astrocitos se trataron con vehículo (EtOH al 0,037%) o RvD1 (100 nM disuelta en EtOH al 0,037%) con o sin CCL2 (100 ng/ml) durante 24 horas. Posteriormente, se sustituyó todo el medio en todos pocillos, manteniendo RvD1 y CCL2 donde se utilizó para el pretratamiento y añadiendo LPS (0,1 g/ml) a todos los grupos excepto al de control. 48 horas después, se aisló el RNA y se determinaron los niveles de mRNA de IL1 β mediante RT-PCR. De este modo se obtuvieron cuatro grupos experimentales, a saber: C, LPS, RvD1-LPS y RvD1-CCL2-LPS (Figura 61).

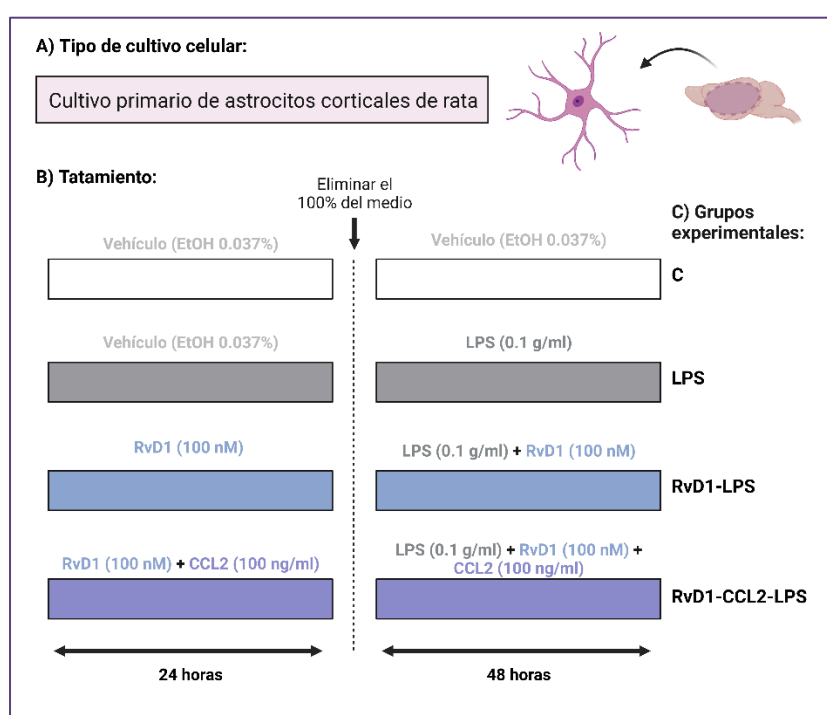


Figura 61. Resumen gráfico del tratamiento utilizado en cultivos primarios de astrocitos corticales de rata. N=6 por grupo (C, LPS, RvD1-LPS, RvD1-CCL2-LPS).

Observamos que el tratamiento con RvD1 fue capaz de disminuir la expresión de IL1 β y que la presencia de CCL2 bloqueaba dicho efecto (Figura 62 A). Sin embargo, el tratamiento con RvD1 no consiguió disminuir la liberación de la IL1 β al medio celular (Figura 62 B).

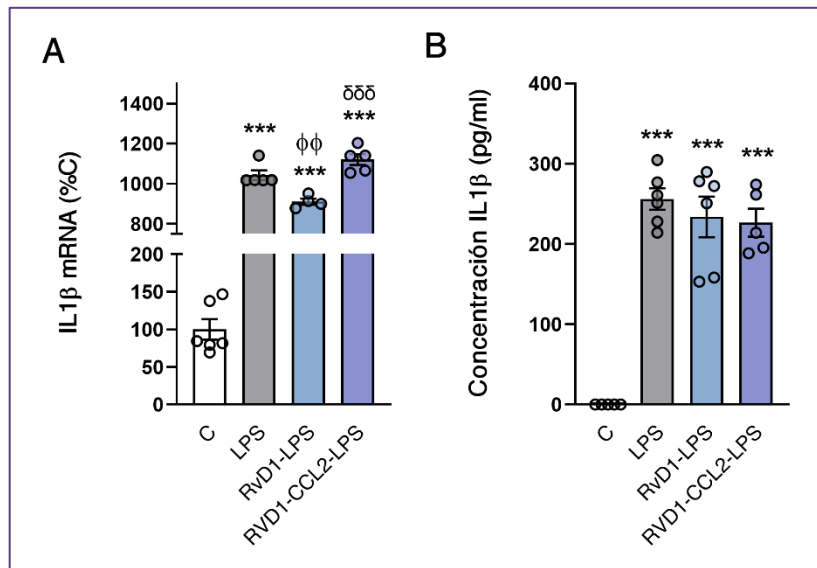


Figura 62. CCL2 inhibe los efectos de la RvD1 sobre la expresión de IL1β. Cultivos de astrocitos primarios de rata se incubaron con vehículo (EtOH 0,037%), CCL2 (100 ng/ml) o RvD1 (100 nM) + CCL2 (100 ng/ml); 24 horas después, se sustituyó todo el medio en todos los pocillos, manteniendo CCL2 y RvD1 donde se utilizó para el pretratamiento y añadiendo LPS (0,1 g/ml) a los grupos indicados que se trataron durante 48 horas. **A)** Determinación de los niveles de mRNA de IL1β. **B)** Determinación de los niveles de IL1β en el medio de cultivo. Los datos corresponden a las medias ± SEM de n = 6 réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguido de un post hoc de Tukey. *** p < 0,001 vs. C. φφ p < 0,01 vs. LPS, δδδ p < 0,001 vs. LPS-RvD1.

6.3 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON REBOXETINA EN EL MODELO MURINO P301S DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La EA se caracteriza por los depósitos de A β y NFTs. Tras observar el papel antiinflamatorio y neuroprotector del tratamiento con reboxetina en ratones 5xFAD (modelo de amiloidosis), nuestro siguiente objetivo fue analizar el efecto de la reboxetina en un modelo murino de taupatía de la EA. Para ello, se utilizó el modelo murino P301S (Figura 32) debido a su extenso uso en investigación para modelizar la acumulación de NFTs típica de la EA. El tratamiento farmacológico se realizó a los 9 meses de edad, puesto que es cuando existe pérdida neuronal, reproduciendo así las alteraciones características de una etapa avanzada de la EA. Para ello se trataron los animales durante 28 días con una minibomba osmótica cargada con vehículo o reboxetina. Después del tratamiento los animales se sometieron a la prueba comportamental del laberinto en Y o *Y maze* con el fin de comprobar las alteraciones en la memoria de trabajo espacial. Dieciocho horas después de la prueba comportamental se procedió a la recogida de muestras de corteza frontal e hipocampo y al análisis bioquímico de las mismas. En las muestras se analizó: el grado de inflamación, el grado de reactividad glial, el acúmulo de formas fosforiladas de tau, el daño axonal y la pérdida neuronal. En la Figura 63 se resume el protocolo experimental utilizado en este apartado.

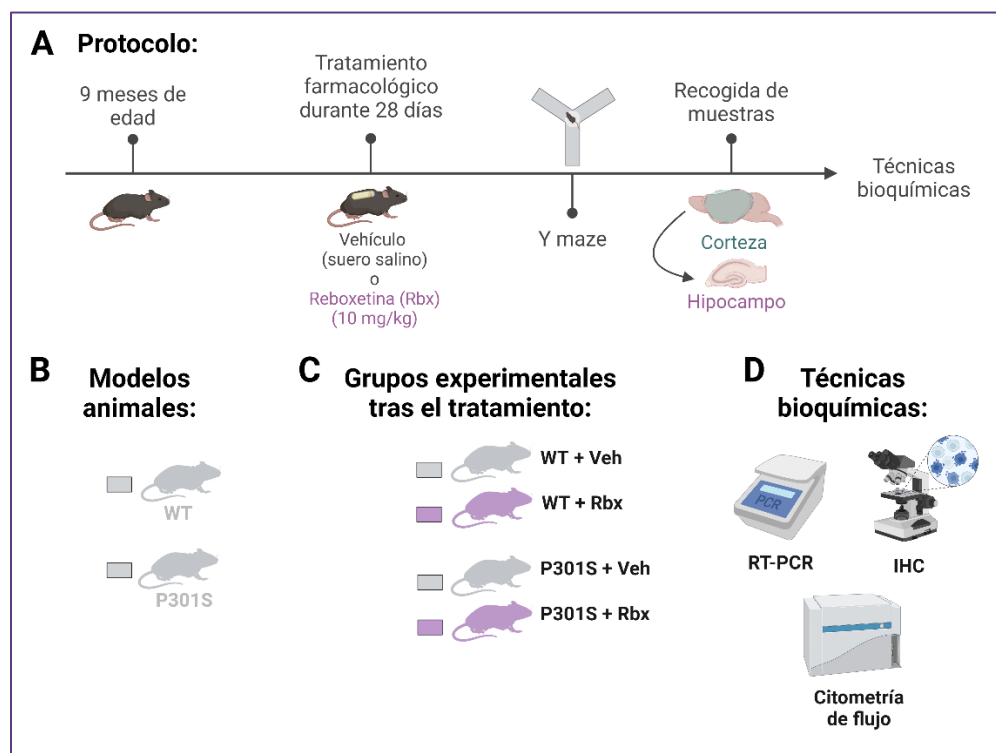


Figura 63. Protocolo experimental utilizado. Todos los animales utilizados en este estudio son machos.

Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo x tratamiento) seguido de un *post hoc* de Tukey lo que nos permitió examinar la influencia del genotipo y del tratamiento. En las gráficas se representan los resultados estadísticos tras las comparaciones múltiples para una mejor comprensión e interpretación de los datos obtenidos.

El tratamiento con reboxetina no afecta a la memoria de trabajo espacial

En primer lugar, mediante el uso del laberinto en Y o Y maze se evaluó la velocidad y la distancia total, así como la memoria de trabajo espacial a través de la determinación del porcentaje de alternancia espontánea.

Los datos obtenidos nos muestran que parte de los ratones pertenecientes al grupo P301S presentan un comportamiento de tipo hiperactivo que se pudo evaluar mediante la velocidad y la distancia total recorrida, mientras que otros ratones del mismo grupo experimental presentaron unos valores muy bajos en cuanto a la velocidad y distancia total recorrida como consecuencia de problemas motores característicos de este modelo animal (Figura 64 A, B). De modo que, observamos una gran heterogeneidad en el grupo de animales P301S en lo referente a la prueba comportamental del laberinto en Y. El comportamiento de tipo hiperactivo y las deficiencias motoras impidieron la evaluación de la memoria espacial de trabajo en este grupo de ratones (Figura 64 C, D). Finalmente, el tratamiento con reboxetina no mostró ningún efecto significativo sobre el comportamiento de los animales P301S.

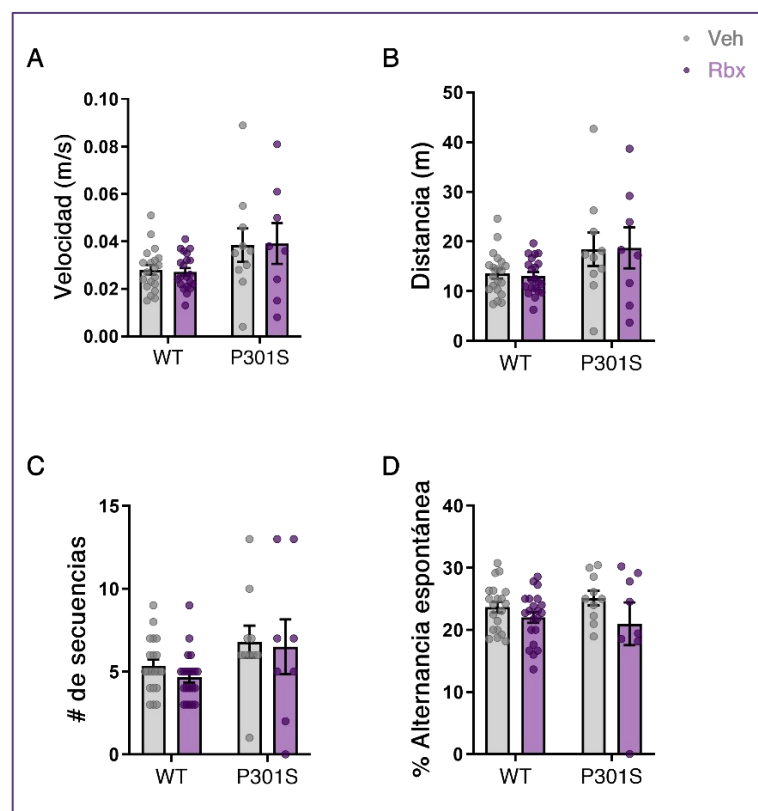


Figura 64. Los ratones P301S presentan una gran variabilidad en el comportamiento mostrado durante la prueba comportamental del laberinto en Y. Se determinó el grado de alteración en la memoria espacial mediante el laberinto en Y en ratones WT y P301S tratados con vehículo (Veh) o reboxetina

(Rbx). Mediante el software ANYmaze[®] se determinó la velocidad (m/s), la distancia (m), el número total de secuencias y el % de alternancia espontánea. Los datos corresponden a las medias \pm SEM de $n \geq 8$ réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo x tratamiento).

El tratamiento con reboxetina no afecta a la expresión de marcadores proinflamatorios

Teniendo en cuenta el papel que juega la noradrenalina en el control de la respuesta inflamatoria, en primer lugar, se determinó el grado de neuroinflamación existente en los ratones P301S y el posible efecto del tratamiento con reboxetina. Para ello, se determinaron los niveles de mRNA de diferentes mediadores de la respuesta inflamatoria mediante RT-PCR en muestras de hipocampo y de corteza frontal.

En las muestras de hipocampo, observamos un efecto del genotipo sobre la expresión de diferentes marcadores inflamatorios, observando un aumento de la expresión de IL1 β , MIP-1 α , CCL2 y NOS2 (Figura 65 A, B, C, H), y una disminución de la expresión de CX3CL1 y la IL6 (Figura 65 D, E) en los ratones P301S en comparación con los ratones WT, confirmando la existencia de un estado neuroinflamatorio en estos ratones. El tratamiento con reboxetina presentó un efecto en cuanto a los niveles de MIP-1 α e IL6 (Figura 65 B, E). En el caso de MIP-1 α encontramos un efecto del tratamiento y una interacción entre las variables, pero el *post hoc* de Tukey no reveló ninguna diferencia significativa entre ratones P301S+Veh y P301S+Rbx. Por otro lado, en el caso de la IL6 encontramos un efecto del tratamiento y el *post hoc* de Tukey nos revela una disminución de la expresión de la IL6 en los ratones WT+Rbx en comparación con los ratones WT+Veh (Figura 65 B, E), indicándonos el papel de la reboxetina en la regulación de esta interleuquina tan solo en condiciones basales.

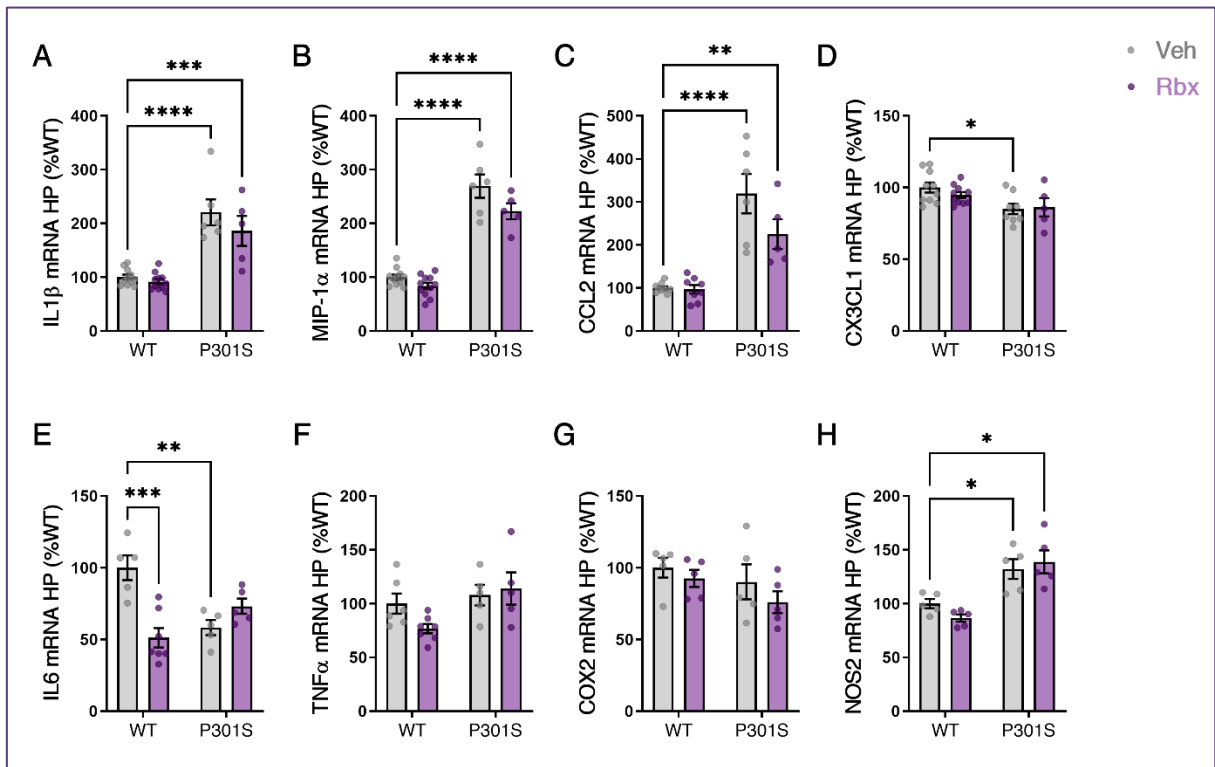


Figura 65. Los ratones P301S presentan un estado neuroinflamatorio en el hipocampo. Se determinaron los niveles de mRNA de IL1 β , MIP-1 α , CCL2, CX3CL1, IL6, TNF α , COX2, NOS2 en muestras de hipocampo de ratones WT y P301S tratados con vehículo (Veh) o reboxetina (Rbx). Los datos corresponden a las medias \pm SEM de $n \geq 6$ réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo \times tratamiento) seguido de un post hoc de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

En cuanto a las muestras de corteza frontal, tan solo observamos un efecto del genotipo en la expresión de IL1 β , MIP-1 α e IL6, aumentando la expresión de estos marcadores proinflamatorios en ratones P301S respecto a ratones WT, confirmando que el estado neuroinflamatorio en los ratones P301S se restringe principalmente al hipocampo, afectando en menor medida a la corteza frontal (Figura 66 A, B, E). El *post hoc* de Tukey nos permitió determinar que el aumento de IL1 β y MIP-1 α se deben principalmente al grupo P301S tratado con reboxetina (Figura 66 A, B).

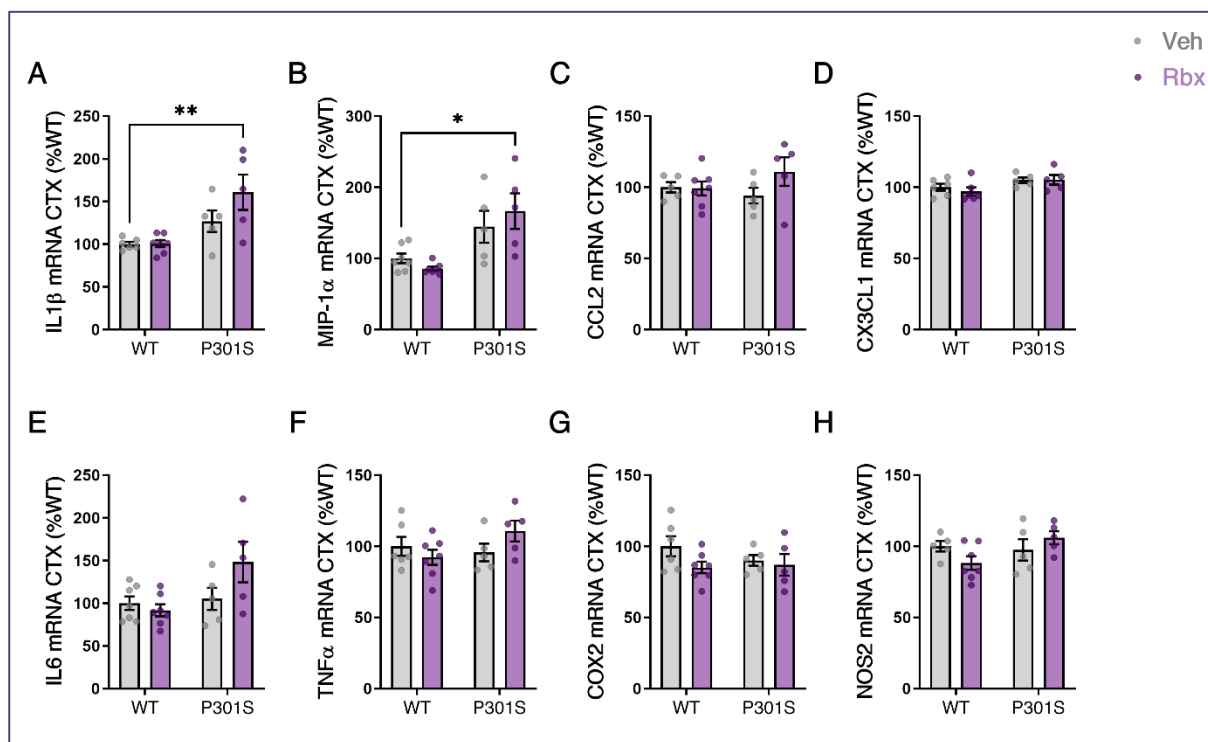


Figura 66. Los ratones P301S no presentan un estado neuroinflamatorio en la corteza frontal. Se determinaron los niveles de mRNA de IL1 β , MIP-1 α , CCL2, CX3CL1, IL6, TNF α , COX2, NOS2 en muestras de corteza frontal de ratones WT y tratados con vehículo (Veh) o reboxetina (Rbx). Los datos corresponden a las medias \pm SEM de $n \geq 6$ réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo \times tratamiento) seguido de un post hoc de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

El tratamiento con reboxetina disminuye la reactividad microglial en los ratones P301S

Dado que la microglía es uno de los principales tipos celulares mediadores de la respuesta inflamatoria, y debido a su papel central en la fisiopatología de la EA, analizamos si el tratamiento con reboxetina modifica la cantidad de células de microglía y su estado reactivo.

En primer lugar, realizamos una tinción inmunohistoquímica para Iba-1, proteína ampliamente utilizada como marcador de este tipo celular en el SNC. Esta tinción nos permitió determinar el número de células de microglía presentes tanto en el hipocampo, distinguiendo entre las regiones CA3, CA1 y el giro dentado (DG), como en la corteza frontal, así como la morfología celular.

En el hipocampo, observamos un efecto significativo del genotipo, aumentando el número de células de microglía en ratones P301S en comparación con ratones WT en las tres regiones del hipocampo analizadas (CA3, CA1 y DG), confirmándonos la proliferación de las células de microglía como parte de la respuesta inflamatoria presente en los ratones P301S en el hipocampo (Figura 67). Sin embargo, el tratamiento con reboxetina no presentó ningún efecto en cuanto al número de células de microglía presentes en el hipocampo (Figura 67).

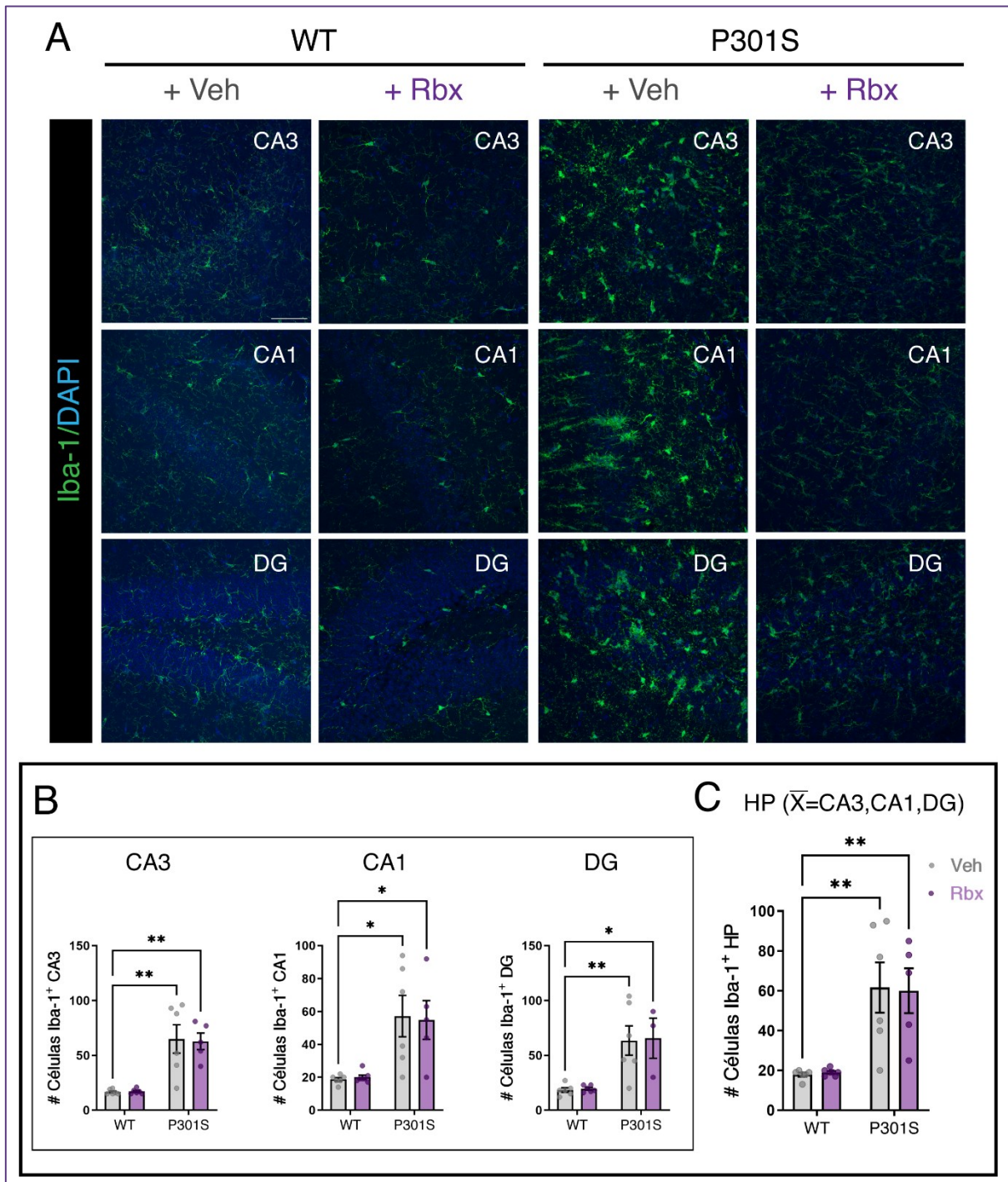


Figura 67. Los ratones P301S presentan un mayor número de células de microglía en el hipocampo. **A)** Imágenes representativas de secciones coronales de las áreas CA3, CA1 y giro dentado (DG) del hipocampo (HP), preparadas a partir de ratones WT y P301S tratados con vehículo (Veh) o reboxetina (Rbx) y teñidos para Iba-1 (verde) y DAPI (azul). La barra de escala corresponde a 100 μ m. **B)** Determinación del número de células Iba-1⁺ en las diferentes regiones del HP. **C)** Media (\bar{X}) de los valores obtenidos en CA3, CA1 y DG. Los datos corresponden a las medias \pm SEM de $n \geq 6$ réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo x tratamiento) seguido de un post hoc de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

A pesar de no observar diferencias en cuanto al número de células de microglía tras el tratamiento con reboxetina en animales P301S, si se observaron diferencias en la morfología celular. Para confirmar el efecto de la reboxetina sobre la morfología de las células de microglía se llevó a cabo un estudio morfológico mediante el uso del software ImageJ® determinando: el tamaño del soma celular, el área total ocupada (*CEA: Cover environmental área*) y el índice de transformación (*TI: Transformation Index*). En las gráficas B y C se representan los datos individuales por célula. Las células de microglía reactivas presentan un mayor tamaño del soma, una menor área total ocupada (*CEA*) y un menor índice de transformación (*TI*) debido al menor número de ramificaciones que presentan. Dentro de cada grupo experimental encontramos los valores de todas las células analizadas. Mientras que en las gráficas D y E se representan los datos por cada animal dentro del grupo experimental, siendo cada dato la media de todas las células analizadas por animal.

Tras el análisis morfológico observamos un efecto del genotipo, observando que el tamaño del soma celular es mayor en las células de microglía de los animales P301S en comparación con los animales WT (Figura 68 A, B, C) en las tres regiones del hipocampo (HP): CA3, CA1 y giro dentado (DG); mientras que el área total ocupada (*CEA*) y el índice de transformación (*TI*) presentan valores menores en los animales P301S en comparación con los animales WT (Figura 69 A, B, C; Figura 70 B, C, D). Estos datos nos confirman que las células de microglía se encuentran en un estado reactivo en el hipocampo de ratones P301S en comparación con el estado homeostático en el que se encuentran en ratones WT. Por otro lado, el tratamiento con reboxetina presentó un efecto sobre parte de los parámetros analizados, el *post hoc* de Tukey nos muestra que el tratamiento con reboxetina en ratones P301S dio lugar a una disminución del tamaño del soma celular (Figura 68 A, C) y un aumento de la *CEA* y del *TI* (Figura 69 A, B, C; Figura 70 B, C, D) en parte de la población de las células de microglía presentes en el hipocampo en comparación con los ratones P301S tratados con vehículo, indicándonos que la reboxetina promueve la transición de parte de la población microglial hacia un estado menos reactivo.

El análisis por animal nos muestra un efecto del genotipo en el tamaño del soma celular (Figura 68 D, E) y el índice de transformación (*TI*) (Figura 69 E, F), poniendo de manifiesto que todos los animales P301S incluidos en el grupo de estudio presentan una población microglial más reactiva respecto a la población microglial presente en los ratones WT. En este caso, el tratamiento con reboxetina presentó un efecto en el parámetro *CEA*. El *post hoc* de Tukey nos muestra que los ratones P301S tratados con reboxetina presentan mayores valores de *CEA* en comparación con los ratones P301S tratados con vehículo en el hipocampo, debido principalmente a los efectos encontrados sobre las áreas hipocampales CA1 y el DG (Figura 69 D, E).

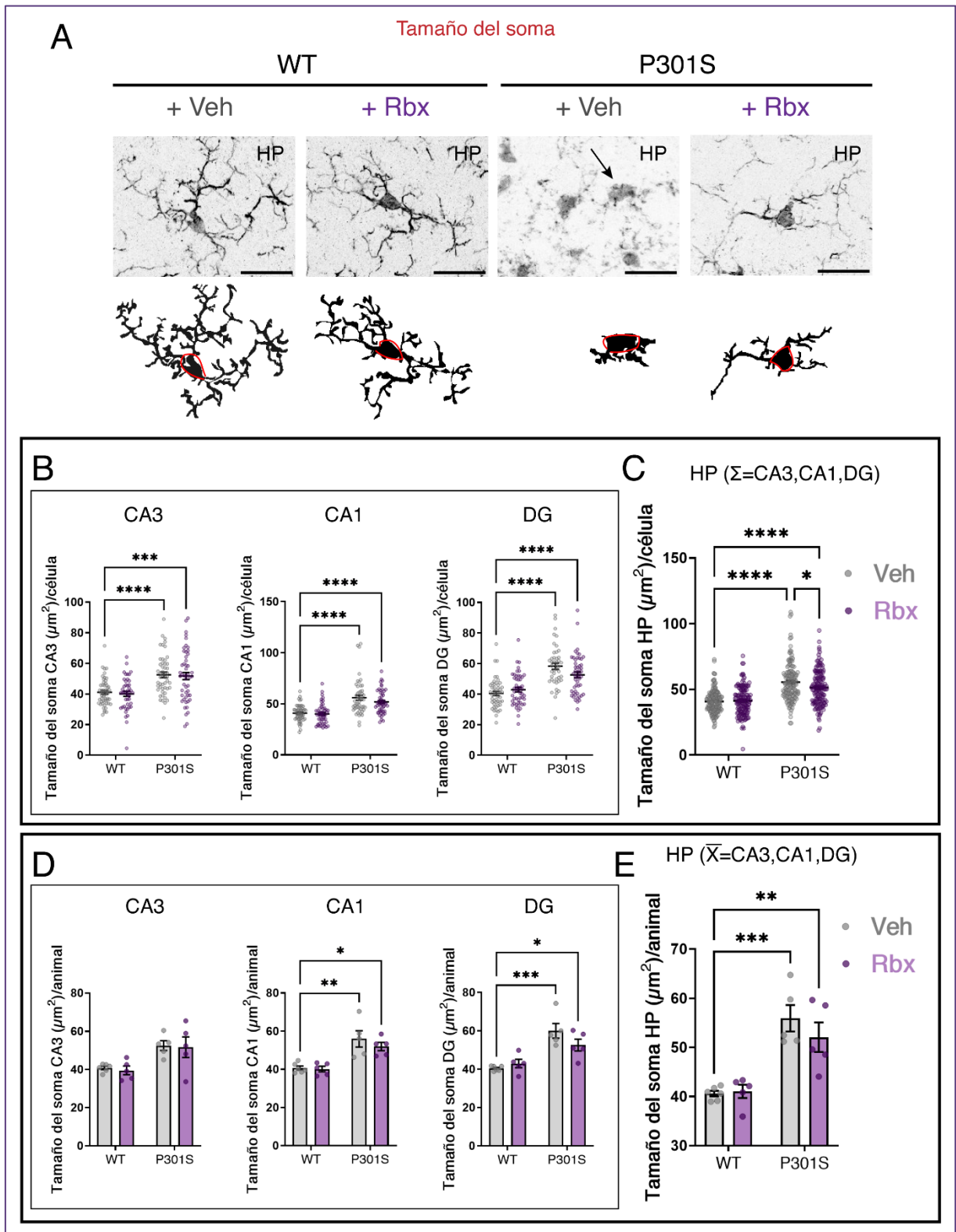


Figura 68. Estudio morfológico de las células de microglía: tamaño del soma. **A)** Imágenes representativas de las células de microglía preparadas a partir de secciones coronales del hipocampo (HP), preparadas a partir de ratones WT y P301S tratados con vehículo (Veh) o reboxetina (Rbx) y marcadas mediante la tinción con Iba-1 y esquematización binaria donde se marca el tamaño del soma en rojo. **B)** Determinación del tamaño del soma en las regiones CA3, CA1 y el giro dentado (DG) del

hipocampo (HP). **C)** Suma (Σ) de los valores obtenidos en CA3, CA1 y DG. Cada punto representa una célula analizada en las gráficas B y C. **D)** Determinación del tamaño del soma en las regiones CA3, CA1 y el giro dentado (DG) del hipocampo (HP). **E)** Media (\bar{X}) de los valores obtenidos en CA3, CA1 y DG. Cada punto representa la media de los datos obtenidos en un ratón en las gráficas D y E. Los datos corresponden a las medias \pm SEM. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (tratamiento x genotipo) seguido de un post hoc de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

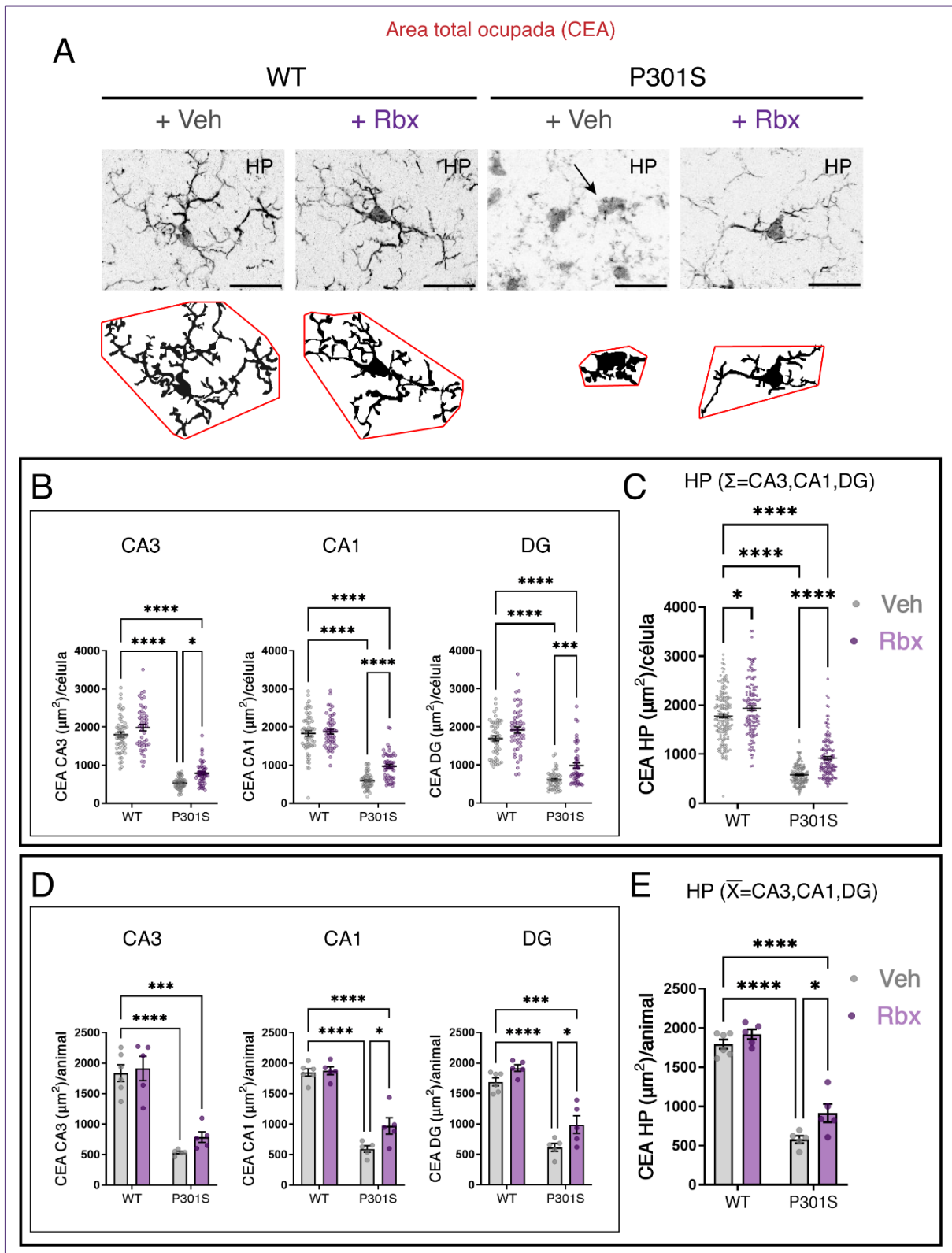


Figura 69. Estudio morfológico de las células de microglía: área total ocupada (CEA). **A**) Imágenes representativas de las células de microglía preparadas a partir de secciones coronales del hipocampo (HP), preparadas a partir de ratones WT y P301S tratados con vehículo (Veh) o reboxetina (Rbx) y marcadas mediante la tinción con Iba-1 y esquematización binaria donde se marca el área total ocupada (CEA) en rojo. **B**) Determinación de la CEA en las regiones CA3, CA1 y el giro dentado (DG) del

hipocampo (HP). **C)** Suma (Σ) de los valores obtenidos en CA3, CA1 y DG. Cada punto representa una célula analizada en las gráficas B y C. **D)** Determinación de la CEA en las regiones CA3, CA1 y el giro dentado (DG) del hipocampo (HP). **E)** Media (\bar{X}) de los valores obtenidos en CA3, CA1 y DG. Cada punto representa la media de los datos obtenidos en un ratón en las gráficas D y E. Los datos corresponden a las medias \pm SEM. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (tratamiento x genotipo) seguido de un post hoc de Tukey. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

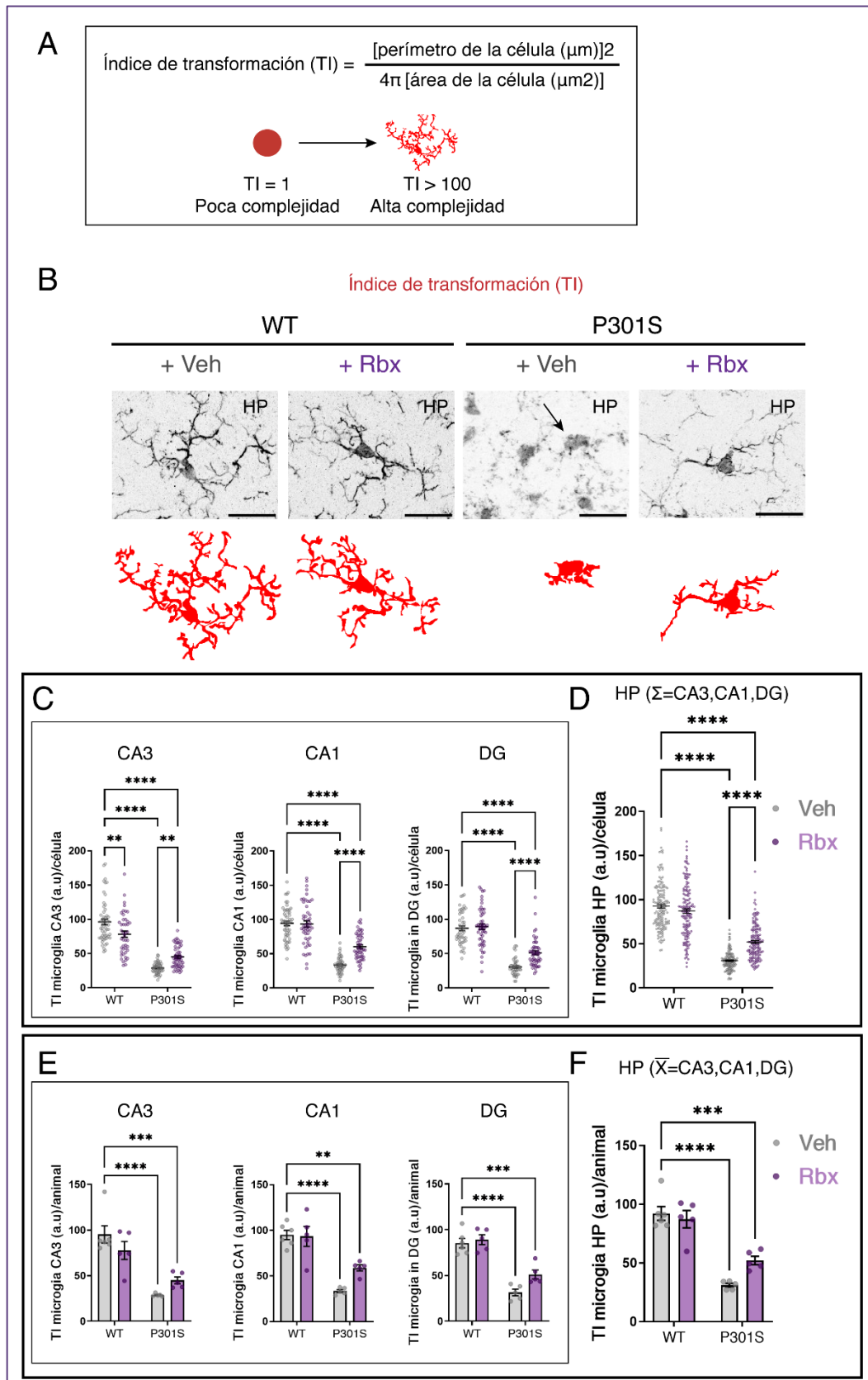


Figura 70. Estudio morfológico de las células de microglía: índice de transformación (TI). **A)** Fórmula del cálculo del índice de transformación (TI). **A)** Imágenes representativas de las células de microglía

preparadas a partir de secciones coronales del hipocampo (HP), preparadas a partir de ratones WT y P301S tratados con vehículo (Veh) o reboxetina (Rbx) y marcadas mediante la tinción con Iba-1 y esquematización binaria donde se marca el tamaño del soma en rojo. **B)** Determinación del índice de transformación (TI) en las regiones CA3, CA1 y el giro dentado (DG) del hipocampo (HP). **C)** Suma (Σ) de los valores obtenidos en CA3, CA1 y DG. Cada punto representa una célula analizada en las gráficas B y C. **D)** Determinación del TI en las regiones CA3, CA1 y el giro dentado (DG) del hipocampo (HP). **E)** Media (\bar{X}) de los valores obtenidos en CA3, CA1 y DG. Cada punto representa la media de los datos obtenidos en un ratón en las gráficas D y E. Los datos corresponden a las medias \pm SEM. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (tratamiento \times genotipo) seguido de un post hoc de Tukey. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Tras la determinación del efecto del tratamiento con reboxetina sobre el grado de activación de las células de microglía, se usó la técnica de citometría de flujo para determinar el porcentaje de la población de microglía presente en el hipocampo mediante el uso de los marcadores CD11b y CD45. Las células de microglía se caracterizan por la expresión en su membrana celular de CD11b^{high} (niveles altos) y CD45^{int} (niveles intermedios), aunque la expresión de CD45 puede aumentar cuando la microglía se encuentra en un estado reactivo. Los resultados obtenidos nos muestran un efecto del genotipo y del tratamiento, el *post hoc* de Tukey nos muestra que los ratones P301S tratados con vehículo presentan una mayor cantidad de células de microglía respecto a los ratones WT (Figura 71), confirmando los resultados encontrados mediante IHC (Figura 67). Mientras que los ratones P301S tratados con reboxetina presentaron un porcentaje menor de la población de microglía respecto a los animales P301S tratados con vehículo (Figura 71), sin que se observase ningún efecto significativo entre ratones WT+Veh y WT+Rbx.

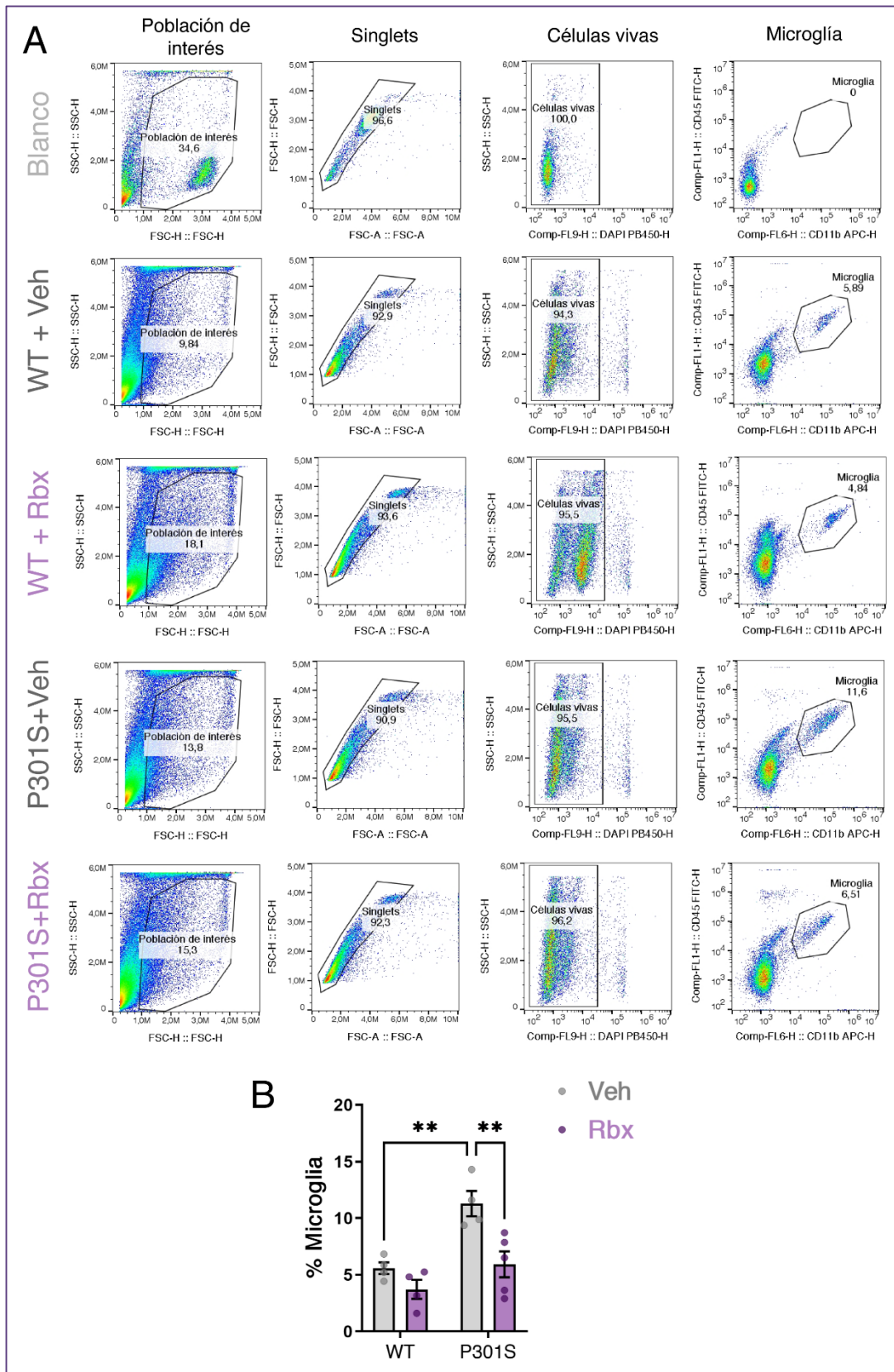


Figura 71. Análisis mediante citometría de flujo de la población de microglia en hipocampo. Muestras de hipocampo de ratones WT y P301S tratados con vehículo (Veh) o reboxetina (Rbx). **A**) Gráficos

representativos en los que se muestra la estrategia empleada para diferenciar la población de microglía de cada grupo experimental. **B)** Cuantificación del porcentaje de población de microglía respecto a las células vivas. Los datos corresponden a las medias \pm SEM de $n \geq 4$ réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo x tratamiento) seguido de un *post hoc* de Tukey. $**p < 0,01$.

Posteriormente, dentro de la población de microglía se analizaron los niveles de TREM2 mediante la determinación de la intensidad del marcaje, y a partir de la media de la intensidad del grupo WT tratados con vehículo se han establecido dos poblaciones de microglía: TREM2^{low} (valores de intensidad por debajo de la media) y TREM2^{high} (valores de intensidad por encima de la media). TREM2 es un receptor presente en las células de microglía, así como otras células del sistema inmunitario, y cuyos niveles aumentan en la población de microglía asociada a daño, conocida como DAM. En la [Figura 72 A](#) se muestran los histogramas representativos de cada grupo experimental, en la [Figura 72 B](#) se representa la superposición de estos histogramas donde podemos observar que los histogramas pertenecientes a los ratones P301S (P301S+Veh en gris oscuro y P301S+Rbx en violeta oscuro) se encuentran desplazados hacia la derecha indicando un aumento en el valor de la media de intensidad de TREM2 (marcada en mediante una línea discontinua color gris). El análisis estadístico nos muestra un efecto del genotipo en cuanto a la media de intensidad de TREM2, y el *post hoc* de Tukey nos indica un aumento de la media de intensidad de TREM2 en ratones P301S tratados con reboxetina en comparación con ratones WT tratados con vehículo ([Figura 72 C](#)). Estos datos nos confirman el estado reactivo de las células de microglía presentes en los ratones P301S previamente observado mediante los parámetros morfológicos. En cuanto a los porcentajes de las poblaciones, observamos un efecto del genotipo sobre estas, y el *post hoc* de Tukey nos indica un aumento del porcentaje de la población TREM2^{high} en ratones P301S tratados con reboxetina en comparación con ratones WT tratados con vehículo ([Figura 72 D](#)).

corresponden a las medias \pm SEM de $n \geq 4$ réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo \times tratamiento) seguido de un post hoc de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Con el fin de seguir evaluando el grado de activación microglial y el posible efecto del tratamiento con reboxetina sobre este, decidimos analizar la expresión de diferentes marcadores de reactividad microglial mediante RT-PCR. De forma general, la expresión de los marcadores Iba-1, CD68 y TREM2 aumentan en la microglía reactiva, mientras que CX3CR1, Tmem119 y P2ry12 son marcadores del estado homeostático de la microglía y su expresión disminuye cuando aumenta el estado reactivo de este tipo celular.

Se observó un efecto del genotipo sobre la expresión de Iba-1 y CX3CR1 cuya expresión se encontraba aumentada en el hipocampo de ratones P301S en comparación con ratones WT (Figura 73 A, D). Por otro lado, el tratamiento con reboxetina presentó un efecto sobre la expresión de TREM2 y CX3CR1 disminuyendo ambos parámetros. En el caso de los niveles de expresión de CX3CR1 se obtuvo además una interacción entre las variables y el análisis *post hoc* de Tukey nos demostró que el tratamiento con reboxetina en animales P301S disminuyó la expresión del marcador CX3CR1 en comparación con animales P301S tratados con vehículo (Figura 73 D).

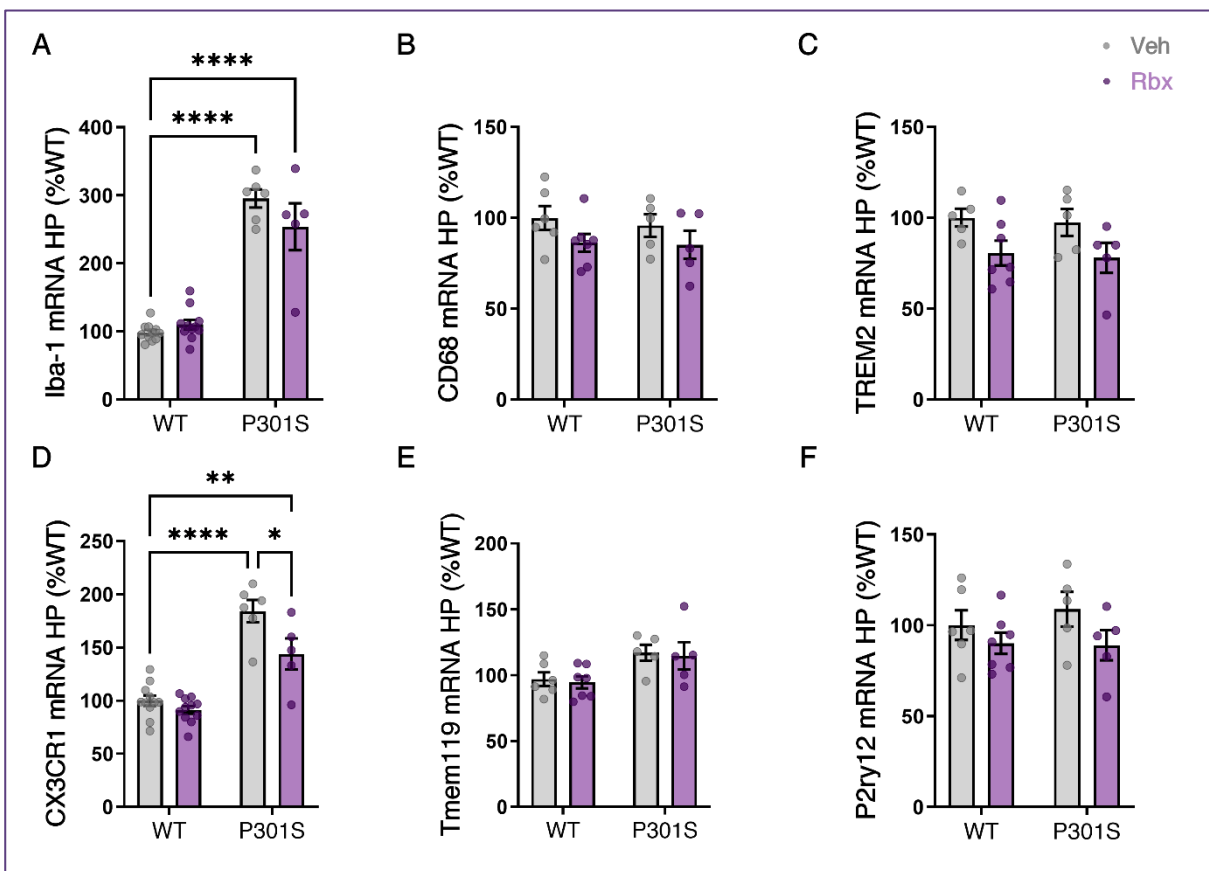


Figura 73. Expresión de marcadores de activación microglial en hipocampo. Se determinaron los niveles de mRNA de Iba-1, CD68, TREM2, CX3CR1, Tmem119 y P2ry12 en muestras de hipocampo

*de ratones WT y P301S tratados con vehículo (Veh) o reboxetina (Rbx). Los datos corresponden a las medias \pm SEM de $n \geq 6$ réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo x tratamiento) seguido de un post hoc de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.*

Finalmente, en la corteza frontal no se observó ningún efecto del genotipo o del tratamiento en cuanto al número de células de microglía, ni de su morfología (Figura 74), confirmándonos nuevamente el menor estado inflamatorio en esta región cerebral en comparación con el hipocampo de ratones P301S.

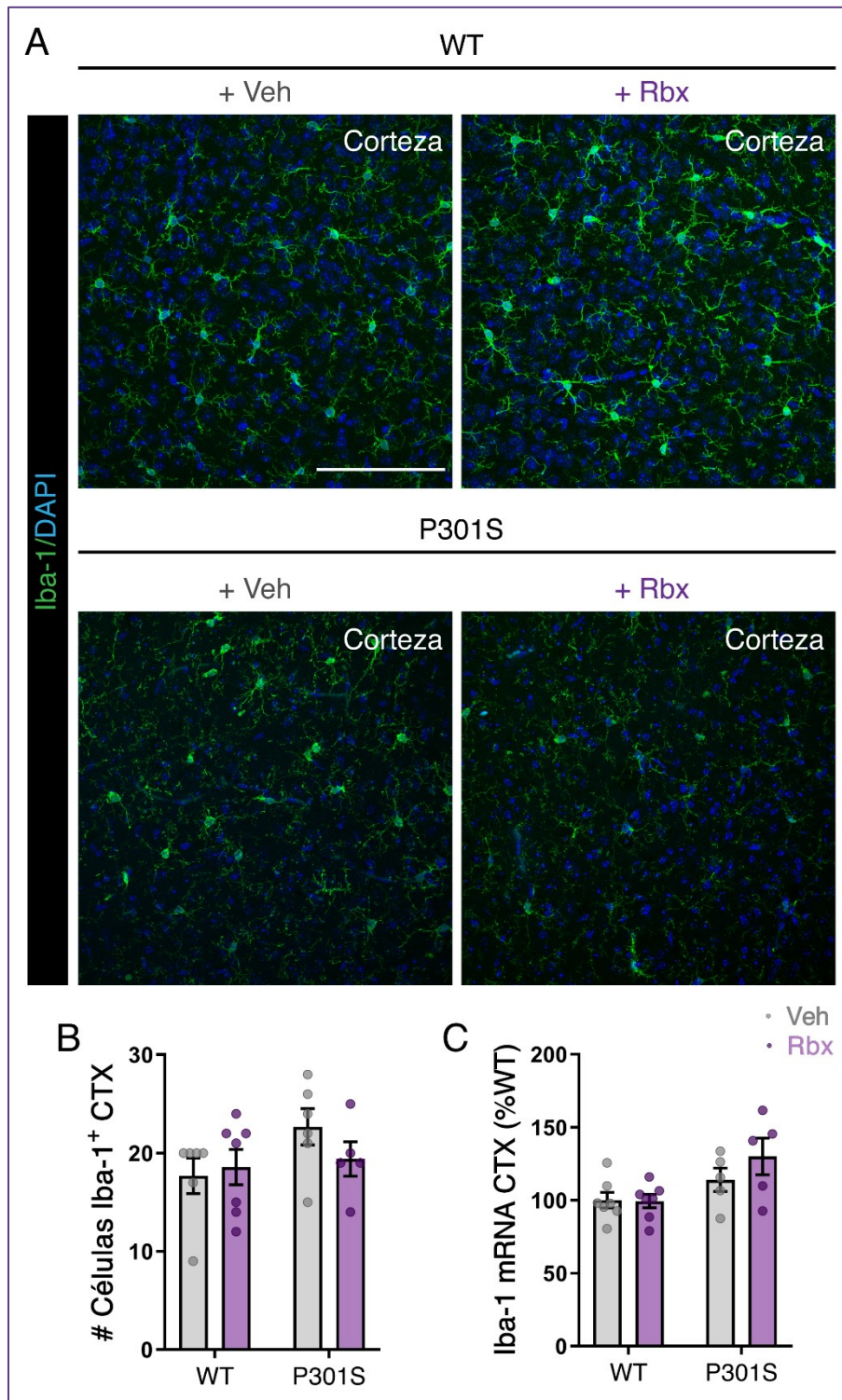


Figura 74. Los ratones *P301S* no presentan microglía reactiva en la corteza frontal. **A)** Imágenes representativas de secciones coronales de corteza frontal preparadas a partir de ratones WT y *P301S* tratados con vehículo (Veh) o reboxetina (Rbx) y teñidos para Iba-1 (verde) y DAPI (azul). La barra de escala corresponde a 50 μ m. **B)** Cuantificación del número de células Iba-1⁺ **C)** Determinación de los niveles de mRNA de Iba-1 en corteza frontal. Los datos corresponden a las medias \pm SEM de $n \geq 6$ réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo \times tratamiento).

El tratamiento con reboxetina disminuye la astrogliosis en los ratones P301S

Dado que otro tipo de células gliales que participan en la respuesta neuroinflamatoria y que juegan un importante papel en la fisiopatología de la EA son los astrocitos (Chun & Lee, 2018), el siguiente paso fue analizar si el tratamiento con reboxetina modifica el grado de astrogliosis.

En primer lugar, realizamos una tinción inmunohistoquímica para GFAP, proteína ampliamente utilizada como marcador de este tipo celular en el SNC. Esta tinción nos permitió determinar el área total cubierta por los astrocitos, lo que nos da una idea de la astrogliosis, tanto en el hipocampo, distinguiendo entre las regiones CA3, CA1 y el giro dentado (DG), como en la corteza frontal.

En el hipocampo, observamos un efecto del genotipo sobre el área ocupada por los astrocitos. Los ratones P301S presentan una mayor cantidad de astrocitos (porcentaje del área GFAP⁺) en comparación con ratones WT en todas las tres regiones hipocampales analizadas: CA3, CA1 y giro dentado (DG) (Figura 75), confirmándonos la presencia de astrogliosis como parte de la respuesta neuroinflamatoria presente en los ratones P301S en el hipocampo. El tratamiento con reboxetina, aunque parece disminuir el área total ocupada por los astrocitos, no presentó ningún efecto significativo tras el análisis estadístico (Figura 75).

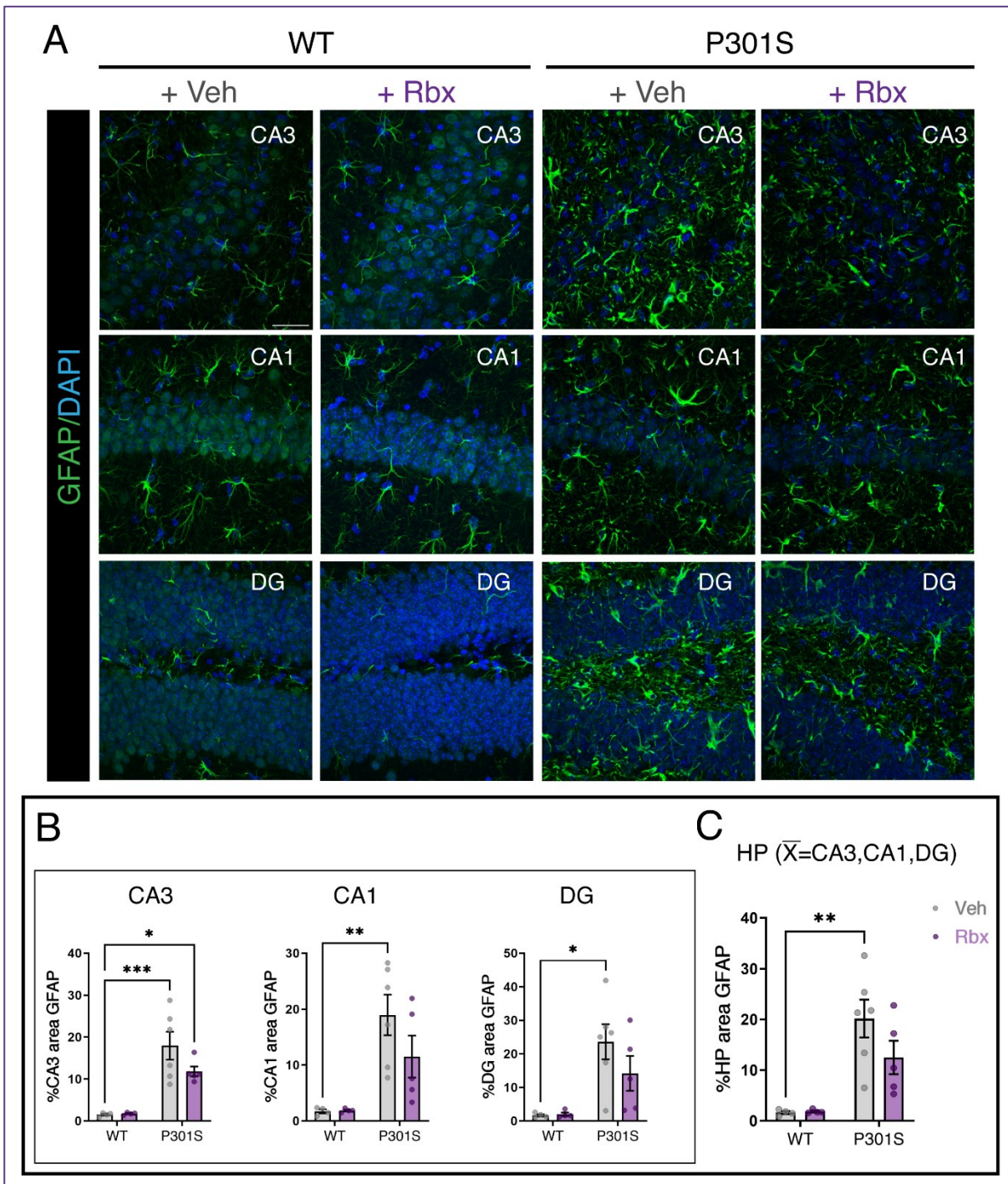


Figura 75. Los ratones P301S presentan una mayor astrogliosis en el hipocampo. **A)** Imágenes representativas de secciones coronales de las regiones CA3, CA1 y giro dentado (DG) del hipocampo (HP) preparadas a partir de ratones WT y P301S tratados con vehículo (Veh) o reboxetina (Rbx) y teñidos para GFAP (verde) y DAPI (azul). La barra de escala corresponde a 100 μ m. **B)** Determinación del área GFAP⁺ en las diferentes regiones del HP. **C)** Media de los valores obtenidos en CA3, CA1 y DG. Los datos corresponden a las medias \pm SEM de $n \geq 6$ réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo x tratamiento) seguido de un post hoc de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

La astrogliosis en el hipocampo se determinó también mediante estudios de citometría de flujo utilizando para ello el marcador de astrocitos ACSA-2. Este se trata de un antígeno de superficie celular específico para astrocitos y ampliamente utilizado para la separación de este tipo celular en estudios de citometría de flujo (Calvo et al., 2020; Kantzer et al., 2017).

Los resultados obtenidos nos muestran un efecto del genotipo y una interacción entre las variables en el porcentaje de población de astrocitos (% de la población ACSA-2⁺). El análisis *post hoc* de Tukey nos muestra que los ratones P301S tratados con vehículo presentan una mayor cantidad de astrocitos en el hipocampo respecto a los ratones WT tratados con vehículo (Figura 76), mientras que los ratones P301S tratados con reboxetina presentan una menor población de astrocitos en comparación con los ratones P301S tratados con vehículo (Figura 76). Estos resultados nos confirman el efecto de la reboxetina sobre la disminución de la astrogliosis en los animales P301S.

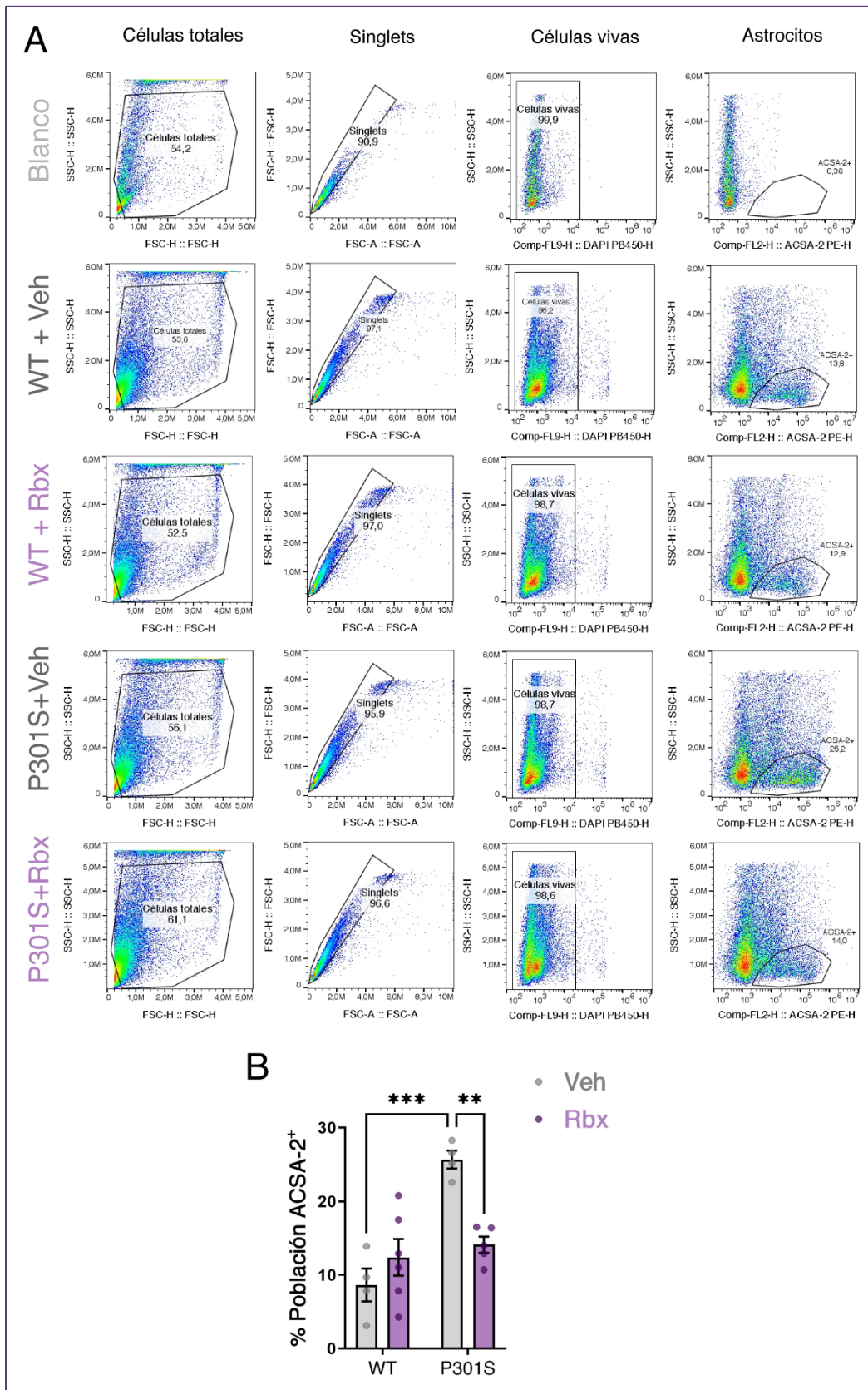


Figura 76. Análisis mediante citometría de flujo de la población astrogliar en hipocampo de ratón. Muestras de hipocampo de ratones WT y P301S tratados con vehículo (Veh) o reboxetina (Rbx). **A)** Gráficos representativos en los que se muestra la estrategia empleada para diferenciar la población de

astrocitos de cada grupo experimental. **B)** Determinación del porcentaje de población de astrocitos (ACSA-2⁺) respecto a las células vivas. Los datos corresponden a las medias \pm SEM de $n \geq 4$ réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo x tratamiento) seguido de un post hoc de Tukey. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Por otro lado, a partir de la población ACSA-2⁺ se ha determinado la intensidad de ACSA-2, y a partir de la media de la intensidad del grupo WT tratados con vehículo se han establecido dos poblaciones de astrocitos: ACSA-2^{low} (valores de intensidad por debajo de la media) y ACSA-2^{high} (valores de intensidad por encima de la media). En la [Figura 77 A](#) se muestran los histogramas representativos de cada grupo experimental, mientras que la [Figura 77 B](#) representa la superposición de todos los histogramas. En cuanto a la intensidad media de ACSA-2, no observamos ningún efecto ni del genotipo ni del tratamiento ([Figura 77 C](#)). Sin embargo, en cuanto al porcentaje de las poblaciones, observamos un efecto del genotipo en cuanto al porcentaje de la población ACSA-2^{low} y ACSA-2^{high} ([Figura 77 B](#)). El *post hoc* de Tukey nos muestra que los ratones P301S tratados con vehículo presentan un mayor porcentaje de población ACSA-2^{high} y un menor porcentaje de la población ACSA-2^{low} respecto a los ratones WT tratados con vehículo ([Figura 77 B](#)), lo que nos indica un mayor grado de astrogliosis en los ratones P301S en comparación con los ratones WT. Mientras que el tratamiento con reboxetina en los animales P301S a pesar de observarse una tendencia en la disminución de la población ACSA-2^{high} y un aumento de la población ACSA-2^{low} respecto a los ratones P301S tratados con vehículo, no se detectaron diferencias significativas.

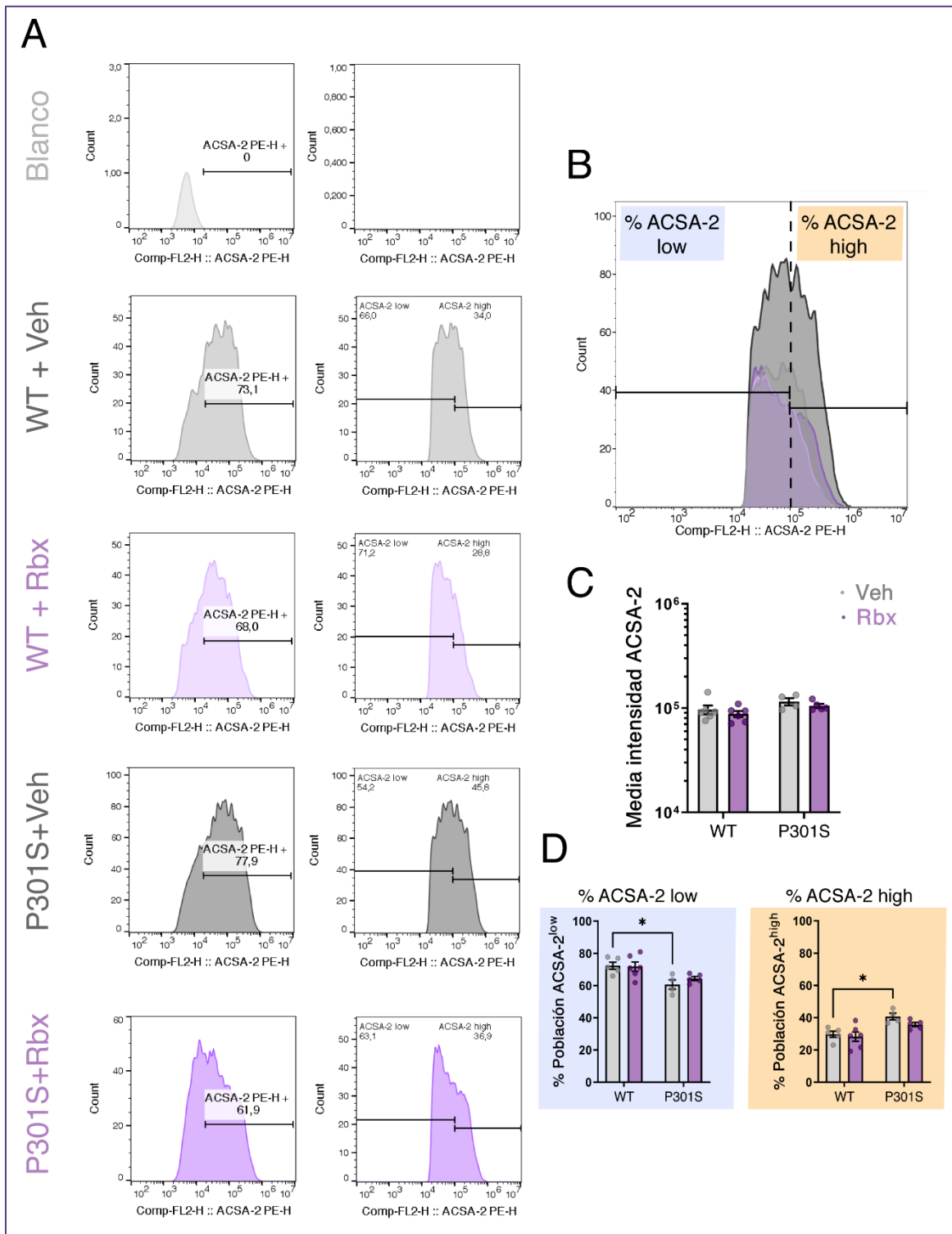


Figura 77. Análisis mediante citometría de flujo de la intensidad de ACSA-2. Muestras de hipocampo de ratones WT y P301S tratados con vehículo (Veh) o reboxetina (Rbx). **A)** Histogramas representativos de ACSA-2. **B)** Histogramas superpuestos de ACSA-2 obtenidos. La intensidad de los colores de los grupos se ha modificado para una mejor visualización de los datos. **C)** Determinación de la media de intensidad de ACSA-2 en astrocitos. **D)** Determinación del porcentaje de población ACSA-2^{low} y ACSA-2^{high}. Los datos corresponden a las medias \pm SEM de $n \geq 4$ réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo \times tratamiento) seguido de un post hoc de Tukey. * $p < 0,05$.

Con el fin de seguir analizando el grado de astrogliosis presente en los ratones P301S y el posible efecto del tratamiento con reboxetina, se analizó la expresión de diferentes marcadores de astrogliosis mediante RT-PCR.

Se observó un efecto del genotipo sobre la expresión de los marcadores de activación astrocítica GFAP, S100B, ALDHL1, EAAT1 y EAAT2 (Figura 78 A, B, C, D, E) y un efecto del tratamiento sobre la expresión de los marcadores GFAP y S100B (Figura 78 A, B), así como una interacción entre las dos variables en estos dos últimos marcadores. El análisis *post hoc* de Tukey nos mostró una disminución en la expresión de GFAP y S100B en los animales P301S tratados con reboxetina en comparación con los animales P301S tratados con vehículo (Figura 78 A, B), confirmado el efecto del tratamiento con reboxetina sobre la disminución de la astrogliosis.

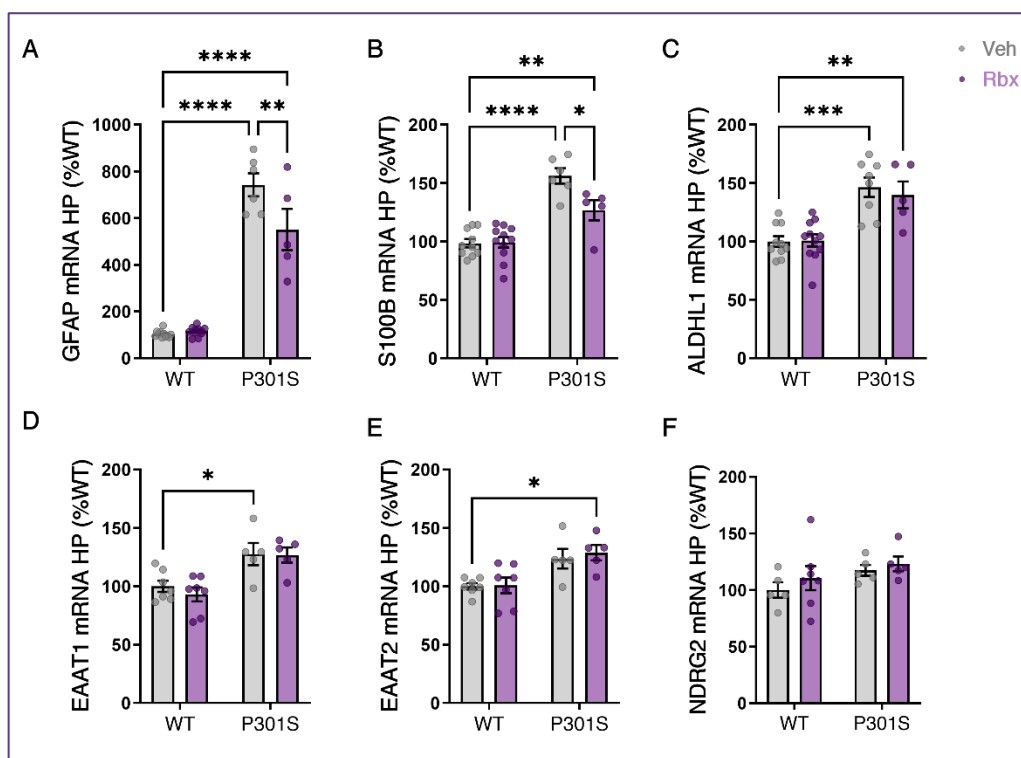


Figura 78. Expresión de diferentes marcadores de activación astrocítica en hipocampo. Se determinaron los niveles de mRNA de GFAP, S100B, ALDHL1, EAAT1, EAAT2 y NDRG2 en muestras de hipocampo de ratones WT y P301S tratados con vehículo (Veh) o reboxetina (Rbx). Los datos corresponden a las medias ± SEM de n ≥ 6 réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo x tratamiento) seguido de un post hoc de Tukey. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

Finalmente, en la corteza frontal se observó un grado de astrogliosis menor que el presente en el hipocampo en los ratones P301S (Figura 79). El genotipo presentó un efecto en cuanto a la expresión de GFAP. El *post hoc* de Tukey nos permitió determinar que este aumento se debe principalmente al grupo P301S tratado con reboxetina (Figura 79 C).

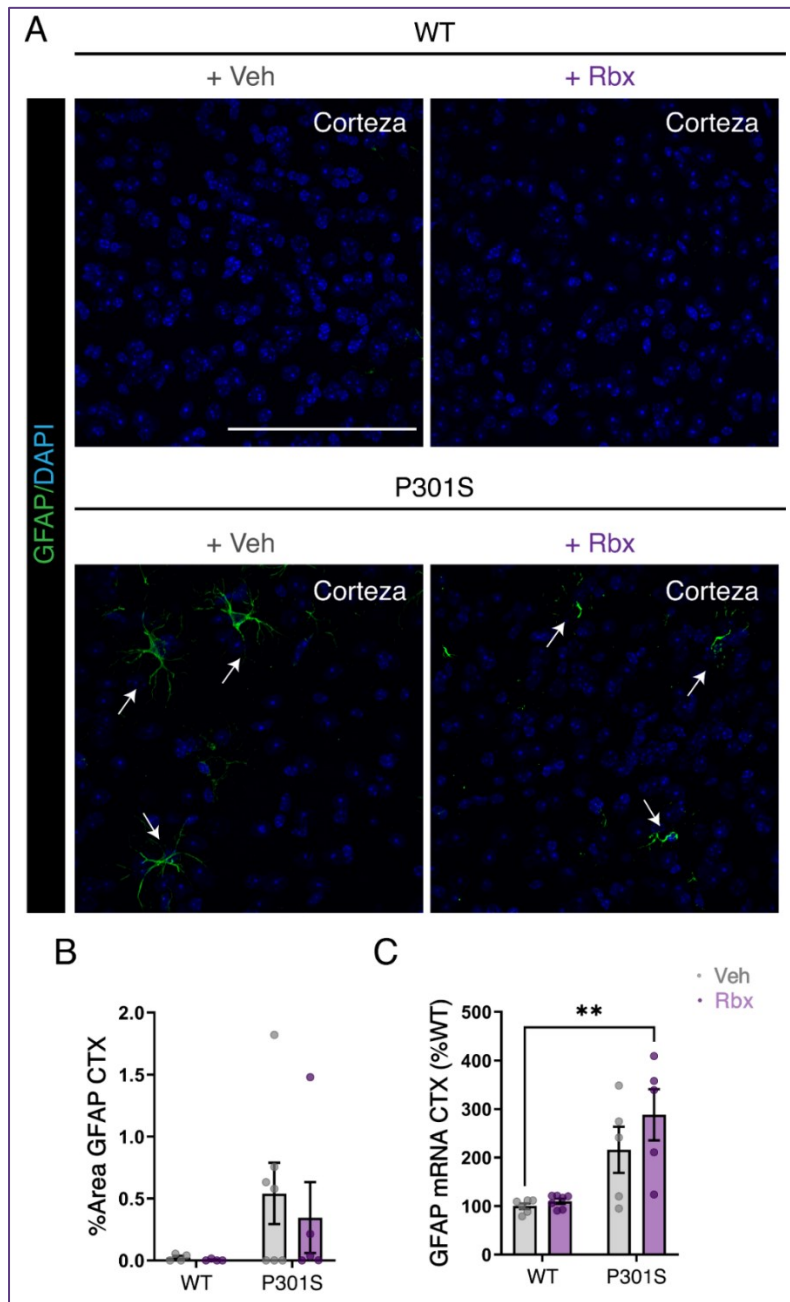


Figura 79. Análisis inmunohistoquímico de astrogliosis en corteza frontal. **A)** Imágenes representativas de secciones coronales de corteza frontal preparadas a partir de ratones WT y P301S tratados con vehículo (Veh) o reboxetina (Rbx) y teñidos para GFAP (verde) y DAPI (azul). La barra de escala corresponde a 100 μ m. Las flechas señalan el marcaje positivo para GFAP. **B)** Cuantificación del porcentaje del área ocupada por astrocitos. **C)** Determinación de los niveles de mRNA de GFAP en corteza frontal. Los datos corresponden a las medias \pm SEM de $n \geq 5$ réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo \times tratamiento) seguido de un post hoc de Tukey. ** $p < 0,01$.

El tratamiento con reboxetina no afecta a los niveles de fosforilación de TAU

Debido a los efectos del tratamiento con reboxetina sobre el grado de activación glial observados, decidimos analizar si el tratamiento con reboxetina presentaba algún efecto sobre la fosforilación y acumulación de tau en los ratones P301S. Para ello, realizamos una tinción inmunohistoquímica con un anticuerpo AT8, que reconoce la fosforilación de la proteína tau en los residuos de serina 202 y de treonina 205, ya que representa una de las fosforilaciones más frecuentes en este modelo animal y en los pacientes con EA. Esta tinción nos permitió determinar el área total ocupada por los depósitos AT8⁺ en el hipocampo y en la corteza frontal.

En el hipocampo, observamos la presencia de neuronas AT8⁺ en ratones P301S confirmándonos la fosforilación de tau y la formación de depósitos intraneuronales en los ratones P301S (Figura 80). Mientras que en la corteza cerebral no se observó prácticamente presencia de marcaje AT8⁺, confirmándonos nuevamente la menor afectación de la corteza cerebral en este modelo animal. Finalmente, el tratamiento con reboxetina no presentó ningún efecto sobre los niveles de fosforilación de tau.

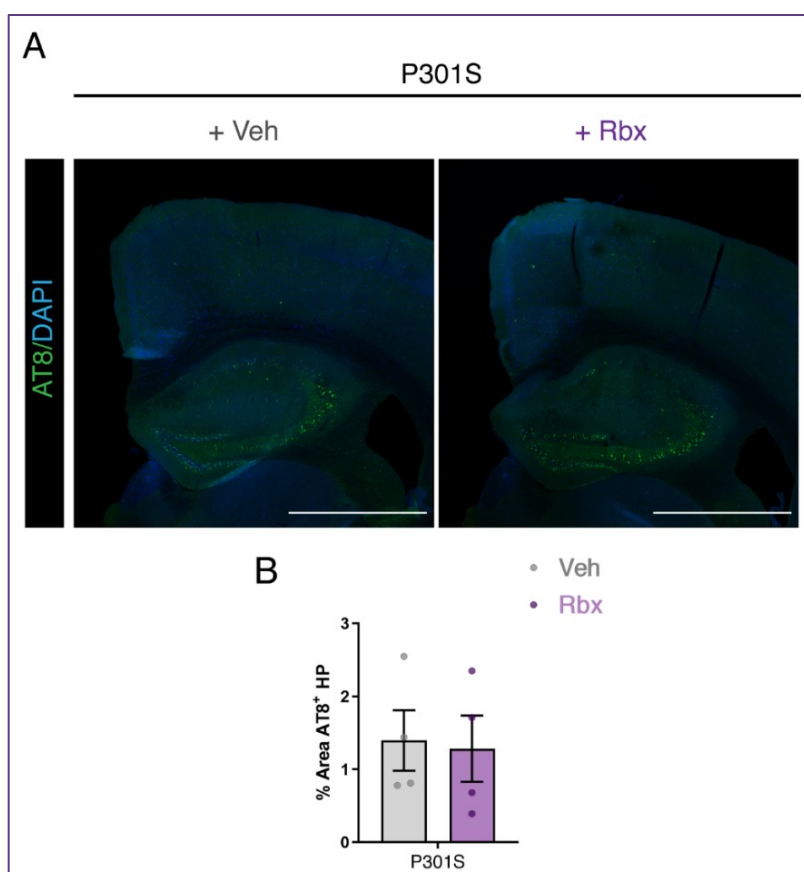


Figura 80. Fosforilación de tau en el hipocampo de ratón. **A)** Imágenes representativas de secciones coronales de hipocampo (HP) preparadas a partir de ratones WT y P301S tratados con vehículo (Veh) o reboxetina (Rbx) y teñidos para AT8 (verde) y DAPI (azul). La barra de escala corresponde a 1000 μ m. **B)** Determinación del porcentaje de área ocupada por los depósitos de tau fosforilado (AT8⁺). Los datos corresponden a las medias \pm SEM de n=4 réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante una t de student.

El tratamiento con reboxetina no altera la pérdida neuronal presente en el hipocampo de los ratones P301S

El estado neuroinflamatorio en el hipocampo y la presencia de depósitos de tau intraneuronales provocan neurodegeneración y eventualmente pérdida neuronal. Por ello, en último lugar hemos analizado la pérdida neuronal en los ratones P301S y si el tratamiento con reboxetina presentaba algún efecto sobre este proceso.

Con el fin de determinar el grado de pérdida neuronal, realizamos una tinción inmunohistoquímica para NeuN, proteína ampliamente utilizada como marcador neuronal en el SNC. Esta tinción nos permitió determinar el número de neuronas (células NeuN⁺) tanto en el hipocampo, distinguiendo entre las regiones CA3, CA1 y el giro dentado (DG), como en la corteza frontal.

En el hipocampo, observamos un efecto del genotipo en cuanto al número neuronal. Los animales P301S presentan una disminución en el número neuronal principalmente en la región del giro dentado (DG) en comparación con ratones WT (Figura 81 B, C), confirmándonos la presencia de pérdida neuronal en los ratones P301S en el hipocampo. Sin embargo, aunque el tratamiento con reboxetina en ratones P301S parece aumentar el número de neuronas totales, no se observó ningún efecto significativo del tratamiento.

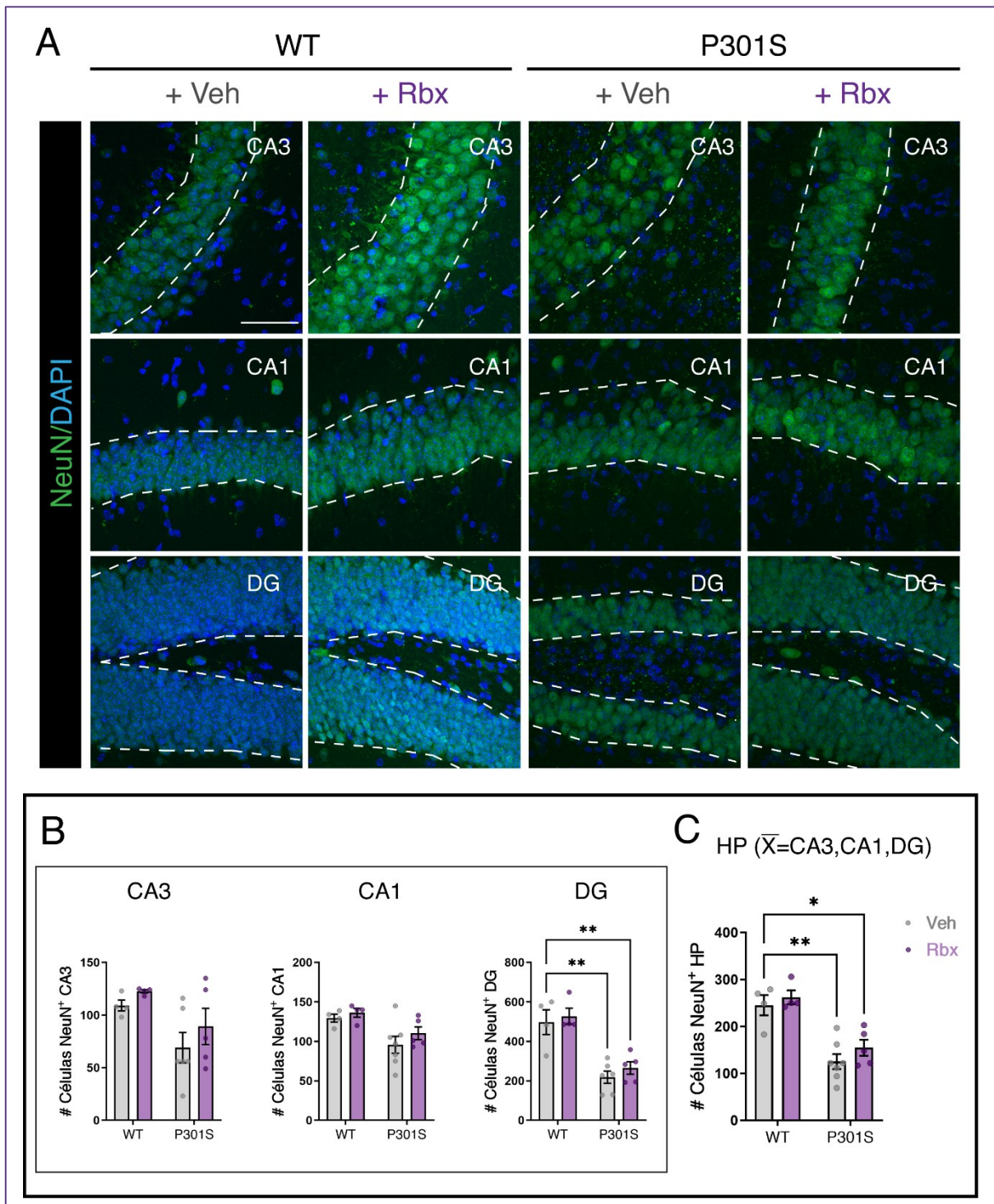


Figura 81. Análisis del grado de pérdida neuronal en el hipocampo. **A)** Imágenes representativas de secciones coronales de las regiones CA3, CA1 y giro dentado (DG) del hipocampo (HP), preparadas a partir de ratones WT y P301S tratados con vehículo (Veh) o reboxetina (Rbx) y teñidos para NeuN (verde) y DAPI (azul). La barra de escala corresponde a 100 μ m. **B)** Determinación del número neuronas (células NeuN⁺) en las diferentes regiones del HP. **C)** Media de los valores obtenidos en CA3, CA1 y DG. Los datos corresponden a las medias \pm SEM de $n \geq 6$ réplicas por grupo. Los datos se

analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo x tratamiento) seguido de un post hoc de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

A pesar de no encontrar un efecto significativo del tratamiento con reboxetina en relación con la pérdida neuronal, dado el papel neuroprotector de la noradrenalina a través del incremento en la expresión y síntesis de diferentes factores neurotróficos, decidimos analizar la expresión de los factores neurotróficos BDNF y NGF, así como de los marcadores de apoptosis celular BAX y p53.

En este caso se observó un efecto del genotipo en la expresión de NGF (Figura 82 B), presentando los ratones P301S una mayor expresión de este factor neurotrófico respecto a los ratones WT. El análisis *post hoc* de Tukey nos permitió determinar que este efecto se debe principalmente al grupo P301S tratado con reboxetina.

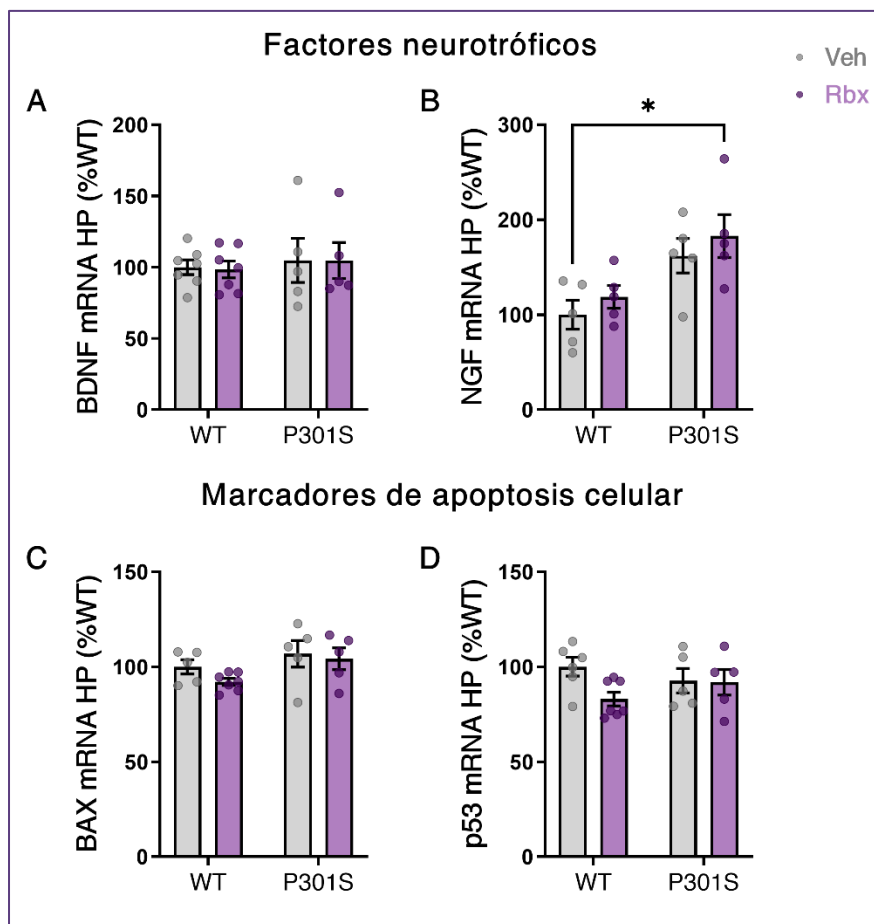


Figura 82. Expresión de diferentes factores tróficos y marcadores de apoptosis celular en hipocampo. Se determinaron los niveles de mRNA de BDNF, NGF, BAX y p53 en muestras de hipocampo de ratones WT y P301S tratados con vehículo (Veh) o reboxetina (Rbx). Los datos corresponden a las medias \pm SEM de $n \geq 6$ réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo x tratamiento) seguido de un post hoc de Tukey. * $p < 0,05$.

Finalmente, mediante el marcaje inmunohistoquímico de NeuN analizamos la pérdida neuronal en la corteza frontal. En este caso no se observó ningún efecto ni del genotipo ni del tratamiento (Figura 83), confirmando la ausencia de pérdida neuronal en los ratones P301S en esta región cerebral.

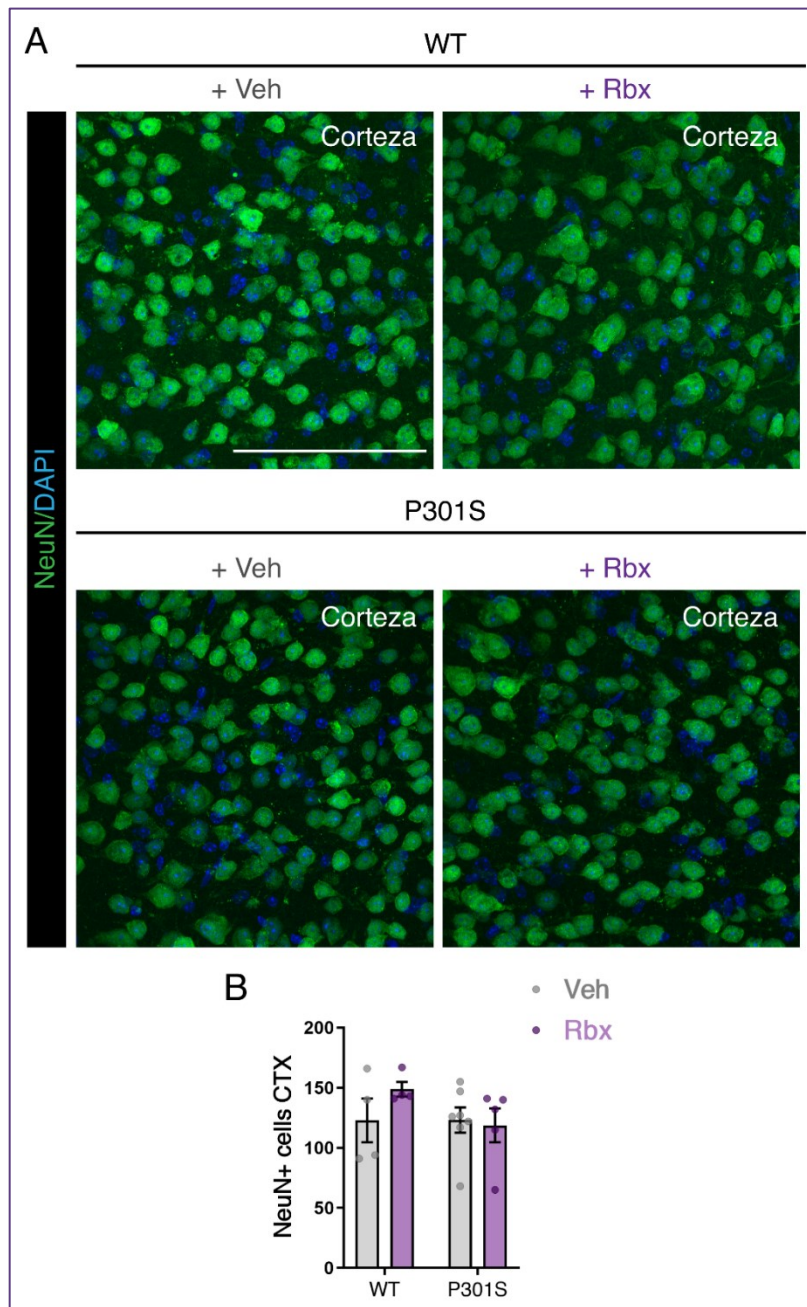


Figura 83. Los ratones P301S no presentan pérdida neuronal en la corteza. **A)** Imágenes representativas de secciones coronales de corteza frontal preparadas a partir de ratones WT y P301S tratados con vehículo (Veh) o reboxetina (Rbx) y teñidos para NeuN (verde) y DAPI (azul). La barra de escala corresponde a 100 μ m. **B)** Determinación del número de neuronas (células NeuN⁺). Los datos corresponden a las medias \pm SEM de $n \geq 5$ réplicas por grupo. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías (genotipo x tratamiento).

Correlación entre el comportamiento y los parámetros bioquímicos analizados

A pesar de observar diferencias entre animales P301S y WT en cuanto a los parámetros analizados, observamos una gran heterogeneidad en el grupo de ratones P301S tanto en el comportamiento como en todos los parámetros bioquímicos analizados. Por ello, se decidió realizar un análisis de correlación con el fin de determinar si la heterogeneidad en el comportamiento observado en los ratones P301S analizados se correlaciona con los parámetros bioquímicos analizados.

Para ello, decidimos escoger el parámetro comportamental de velocidad (m/s) como medida del grado de hiperlocomoción (indicador de un comportamiento de tipo hiperactivo) o déficits motores presentes en ratones P301S, y realizar una correlación múltiple con el resto de los parámetros bioquímicos analizados, seguido de una prueba FDR (tasa de descubrimiento falso) para cada una de las comparaciones realizadas.

En la [Figura 84](#) se muestran aquellos parámetros que han presentado unos valores del coeficiente de Pearson significativos entre todos los parámetros analizados. Como podemos observar, la velocidad se correlaciona de manera positiva con la expresión de la quimioquina proinflamatoria CCL2, y el grado de gliosis (cantidad de microglía y astrocitos, así como la expresión de GFAP), mientras que se correlaciona de manera negativa con el número de neuronas en el hipocampo. Indicándonos que la presencia de neuroinflamación en el hipocampo provoca una pérdida neuronal y un comportamiento de tipo hiperactivo en los ratones, mientras que aquellos ratones con bajos valores de velocidad, con potenciales problemas motores, presentan un bajo grado de neuroinflamación en el hipocampo y de pérdida neuronal. Estos datos ponen de manifiesto el papel de la quimioquina CCL2 en la fisiopatología del modelo murino P301S de la EA.

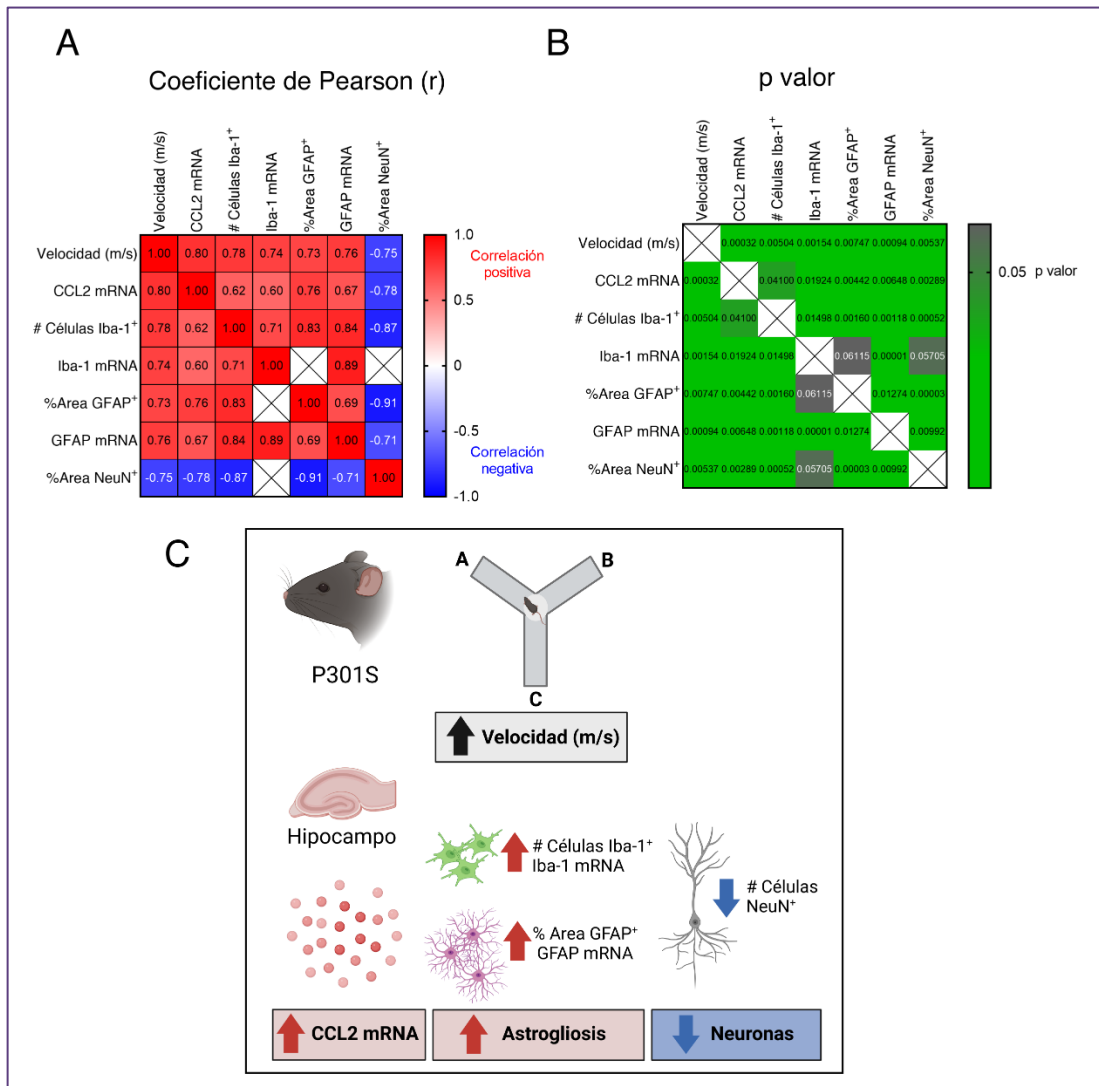


Figura 84. Correlación entre los parámetros analizados. **A)** Coeficientes de correlación de Pearson (r). **B)** Valores de p. **C)** Representación gráfica de los resultados obtenidos.

6.4 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON NORADRENALINA EN CÉLULAS DE MICROGLÍA DERIVADAS DE iPSCS HUMANAS

Los datos obtenidos en los apartados anteriores han puesto de manifiesto el papel de la quimioquina CCL2 en la inducción de la respuesta inflamatoria y su implicación en la fisiopatología de los modelos animales 5xFAD y P301S de la EA, así como el potencial de la reboxetina para disminuir la neuroinflamación a través del control de la activación glial en diferentes modelos murinos de la EA. Sin embargo, las células gliales humanas presentan importantes diferencias en su respuesta a la EA en comparación con las células gliales de otros animales (Chen & Colonna, 2021; J. Li et al., 2021; Mathys et al., 2019). Por lo tanto, validar los efectos de la NA en modelos humanos es imprescindible antes de poder ser considerada una posible diana terapéutica para la EA.

En este sentido, las células madre pluripotentes inducidas humanas (iPSCs) ofrecen una poderosa herramienta para modelizar diferentes enfermedades humanas, entre ellas las neurodegenerativas y, más concretamente, la EA (Jay Penney et al., 2020). Es por ello por lo que, como primera aproximación se decidió evaluar los efectos de la NA sobre células de microglía derivadas de iPSCs humanas, debido al importante papel que este tipo celular juega en la EA.

La generación de los cultivos celulares y tratamientos se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Renzo Mancuso en el *VIB Center for Molecular Neurology* localizado en Amberes (Bélgica). En la [Figura 85](#) se muestra el protocolo de diferenciación utilizado, así como imágenes representativas de etapas clave del protocolo (véase la [Figura 37](#) del apartado de material y métodos para una información más detallada del protocolo utilizado).

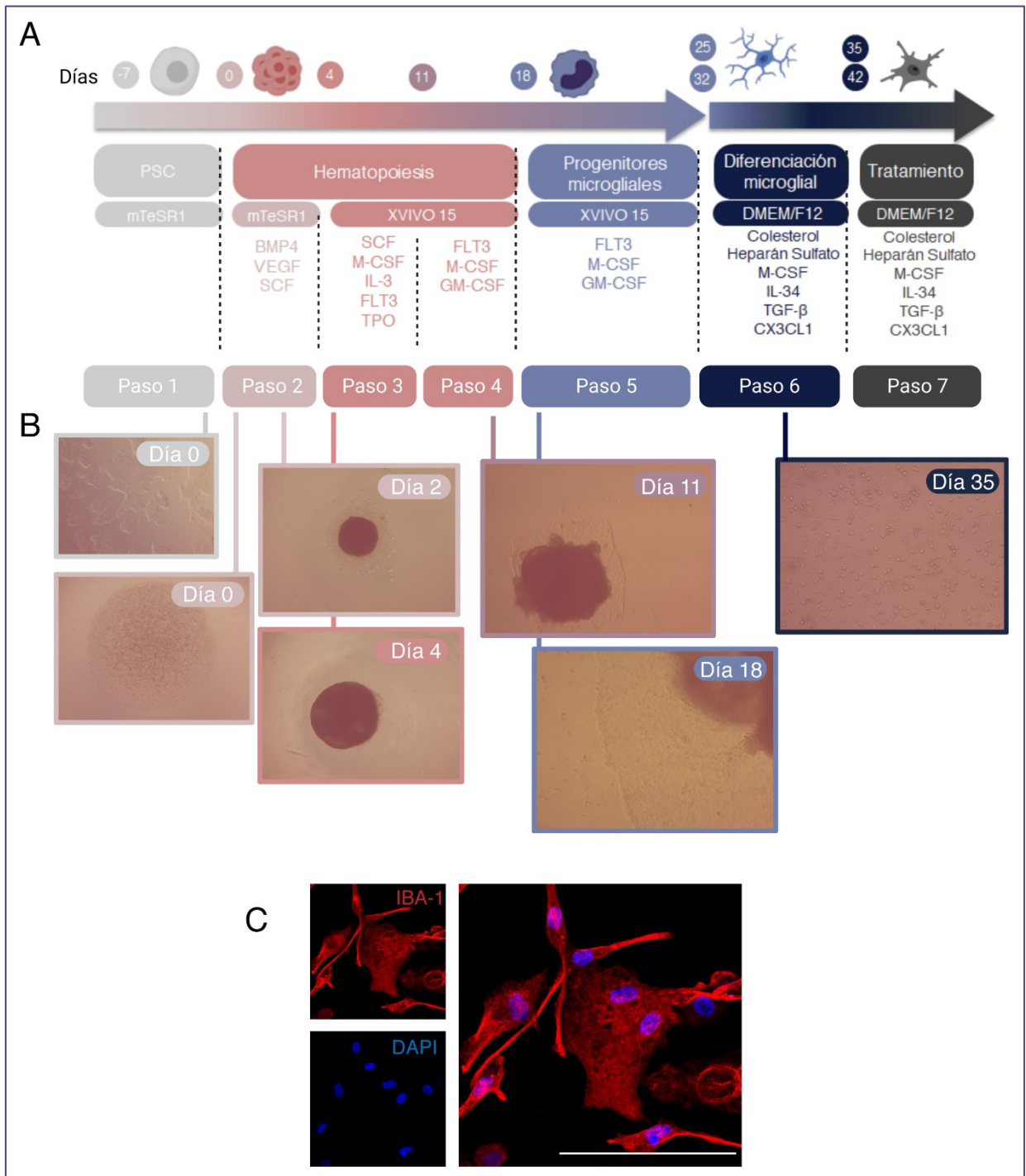


Figura 85. Representación esquemática del protocolo de diferenciación utilizado. **A)** Esquema del protocolo de diferenciación de células de microglía a partir de iPSCs humanas donde se indican los principales pasos junto con los medios de cultivos y los cócteles de quimioquinas que se utilizan. **B)** Imágenes representativas de los pasos clave del protocolo de diferenciación. **C)** Tinción inmunocitoquímica con Iba-1 (rojo) y DAPI (azul). La barra de escala corresponde a 100 μ m.

El tratamiento con NA incrementa la respuesta inflamatoria inducida por el LPS

Teniendo en cuenta los efectos antiinflamatorios de la NA observados con anterioridad en células gliales murinas, en primer lugar, se evaluó el efecto de la NA sobre la respuesta inflamatoria inducida por el tratamiento de LPS junto con ATP en cultivos de microglía derivadas de iPSCs humanas.

Para ello, las células de microglía se trataron durante 18 horas con medio con o sin suero fetal bovino (FBS) al 5%. Posteriormente, se indujo la expresión de moléculas proinflamatorias a través del tratamiento con LPS (200 ng/ml) durante 3h con o sin NA (10, 25 o 50 μ M) manteniendo el suero en aquellos pocillos tratados con el mismo. Finalmente, se añadió ATP (5mM) para inducir la liberación de la IL1 β en aquellos pocillos tratados con LPS. Una hora después se recogió el medio de cultivo para la determinación de la liberación de diferentes analitos al medio de cultivo, y se extrajo el RNA de los lisados celulares para determinar en estudios futuros la expresión de diferentes genes de interés (Figura 86). Para una descripción más detallada del tratamiento véase la Figura 38 en el apartado de material y métodos.

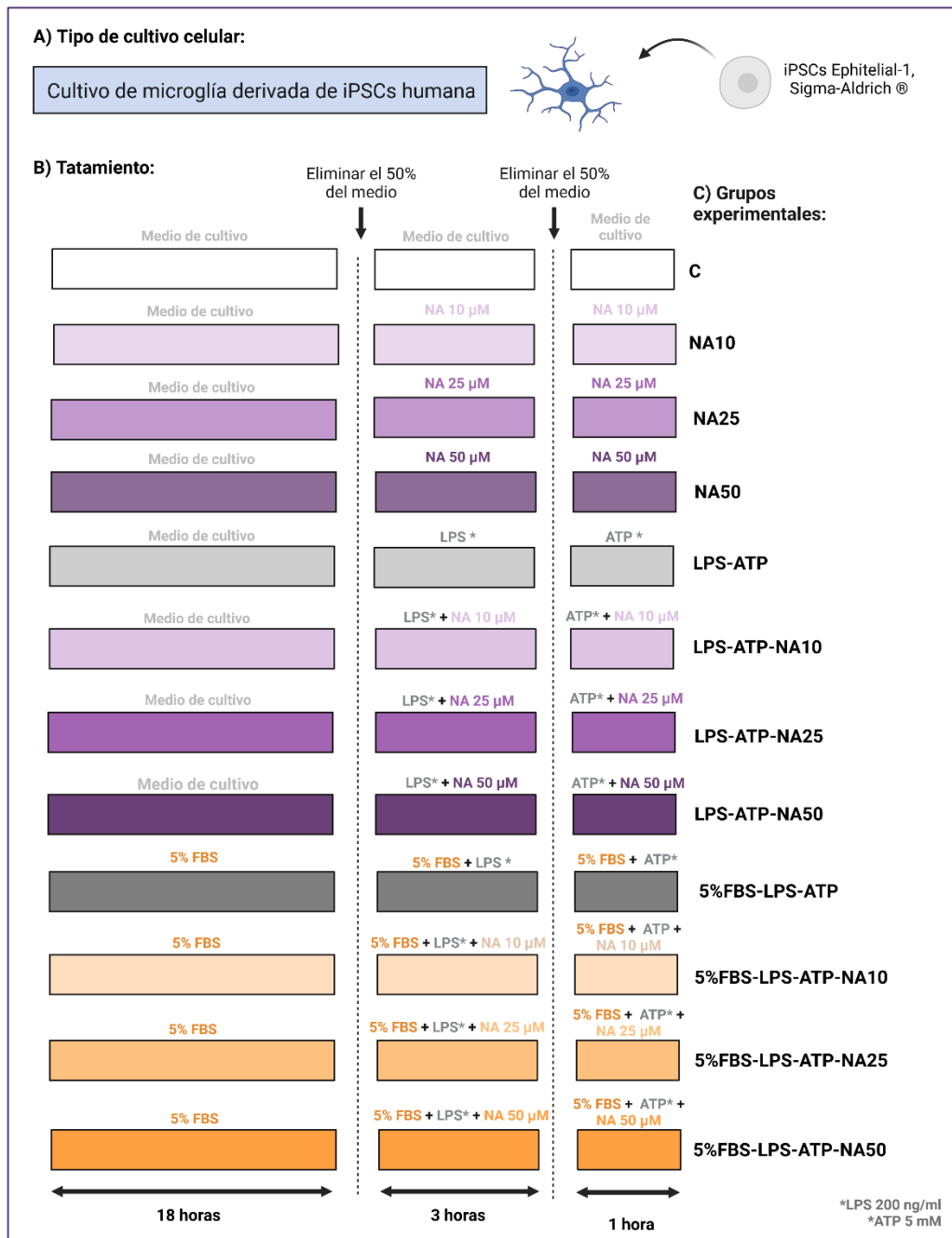


Figura 86. Resumen gráfico del protocolo utilizado en células de microglía derivadas de iPSCs humanas. $N \geq 12$ por grupo experimental, pertenecientes de tres diferenciaciones diferentes.

Como marcador inflamatorio, se determinaron los niveles de IL1 β liberada al medio de cultivo celular mediante la técnica de ELISA (Figura 87). Los datos obtenidos nos muestran que el tratamiento con NA no induce la liberación de IL1 β al medio celular por si sola a las tres concentraciones analizadas. Por otro lado, el tratamiento con LPS y ATP incrementó los niveles de IL1 β en el medio celular, mientras que la presencia de NA (10 μ M) incrementó los

niveles de esta citoquina, potenciando la respuesta inflamatoria inducida por el tratamiento con LPS y ATP (Figura 87). El pretratamiento con FBS predispuso a las células a una mayor activación de la respuesta inflamatoria después del tratamiento con LPS y ATP, aumentando los niveles de IL1 β en el medio celular respecto a los grupos que no presentaban FBS en el medio de cultivo. Mientras que la presencia de NA (25, 50 μ M) disminuyó la liberación de IL1 β en el medio celular. Estos datos confirman el efecto de la NA sobre la regulación de la respuesta inflamatoria, pero siendo este efecto dependiente del estado de activación microglial previo.

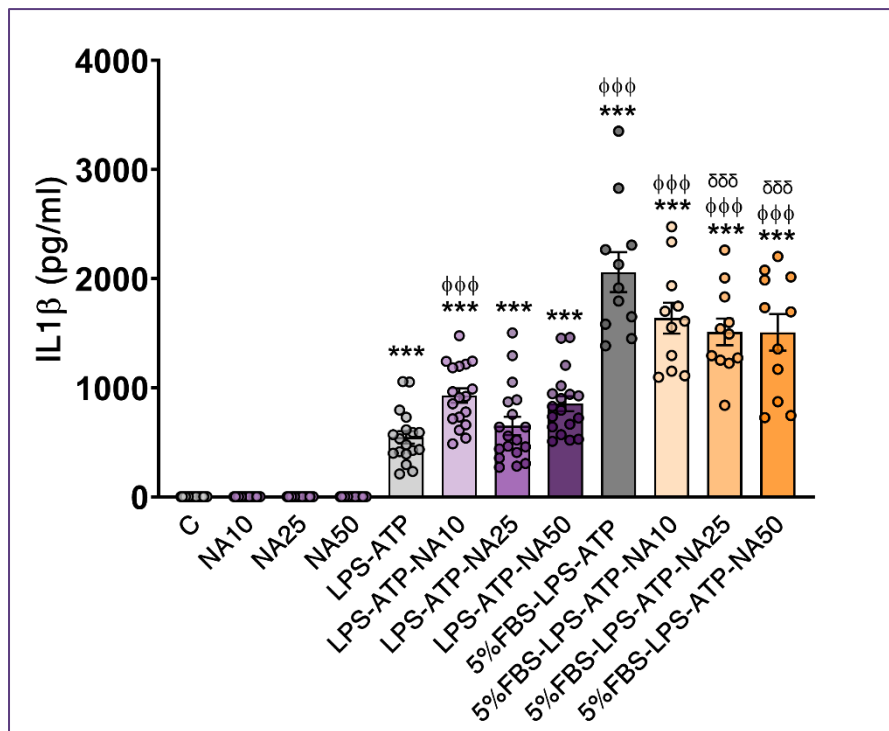


Figura 87. Determinación de los niveles de la IL-1 β en el medio celular en cultivos de microglía derivadas de iPSCs humanas. Cultivos de células de microglía derivadas de iPSCs humanas se mantuvieron en condiciones control o con 5% suero fetal bovino (FBS) durante 18 horas, posteriormente se eliminó la mitad del medio y se añadió NA (10, 25 o 50 μ M) o LPS (200 ng/ml) con o sin NA (10, 25 o 50 μ M) y manteniendo el FBS en aquellos casos donde había sido utilizado. 3 horas después, se eliminó la mitad del medio y se añadió ATP (5 mM) con o sin NA (10, 25 o 50 μ M) y manteniendo el FBS en aquellos casos en el que se había utilizado. 1 hora después se recogió el medio de cultivo y se determinaron los niveles de IL1 β en el medio de cultivo mediante la técnica de ELISA. Los datos representados corresponden a las medias \pm SEM de $n \geq 12$ réplicas por grupo obtenidas de tres diferenciaciones diferentes. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguido de un post hoc de Tukey. *** $p < 0,001$ vs. C, $\phi\phi\phi$ $p < 0,001$ vs. LPS-ATP, $\delta\delta\delta$ $p < 0,001$ vs. 5%FBS-LPS-ATP.

El tratamiento con NA no afecta a la capacidad fagocítica

Además de su función en la respuesta inflamatoria, las células de microglía presentan un importante papel en la fagocitosis de sustancias de desecho en el organismo, tales como los depósitos proteicos de A β y de tau presentes en el SNC de pacientes con EA.

Debido a los efectos demostrados por la reboxetina sobre la disminución de los depósitos de A β en el modelo murino 5xFAD (Figura 46), finalmente evaluamos los efectos de la NA sobre la capacidad fagocítica de las células de microglía derivadas de iPSCs humanas.

Para ello se trataron las células con el péptido A β fusionado con el fluoróforo Alexa Fluor 488 durante 3 horas durante las cuales se adquirieron imágenes cada 20 minutos mediante el dispositivo Incucyte[®] y se determinó mediante el software del propio dispositivo la confluencia celular y la intensidad total integrada o *Total Green-A β integrated intensity* (RCU x $\mu\text{m}^2/\text{imagen}$), este último valor se normalizó por la confluencia celular para obtener valores comparables entre los diferentes pocillos analizados (Figura 88 A). La confluencia celular y la intensidad total integrada o *Total Green-A β integrated intensity* (RCU x $\mu\text{m}^2/\text{imagen}$) también se determinó pasadas las 3 horas de tratamiento y después de realizar tres lavados con PBS para eliminar el exceso de las partículas de A β presentes en el medio y no fagocitadas por las células de microglía. Para una información más detallada del protocolo experimental utilizado véase la Figura 39 en el apartado de material y métodos.

Los datos obtenidos nos muestran que el tratamiento con A β induce la proliferación celular, observándose una mayor confluencia celular en aquellos grupos experimentales tratados con A β en comparación con el grupo control, mientras que el tratamiento con NA no afectó a la confluencia celular (Figura 88 B, C). La confluencia celular se mantuvo constante a lo largo del protocolo experimental lo que nos confirma la ausencia de muerte celular durante las condiciones experimentales (Figura 88 B). En cuanto a la intensidad integrada total, observamos que esta se incrementa a lo largo del tiempo en aquellos grupos tratados con A β indicándonos el aumento de la fagocitosis celular de A β a lo largo del tiempo (Figura 88 D). Mientras que no se observó ningún efecto significativo del tratamiento con NA sobre la cantidad total de A β celular (Figura 88 D, E).

Aunque el A β marcado con una molécula fluorescente es ampliamente utilizado para la realización de estudios de fagocitosis, presenta algunas limitaciones. Puesto que determinamos la fluorescencia en el área celular en dos dimensiones, no nos permite discriminar entre las partículas fagocitadas de las adheridas a la superficie celular o extracelulares. Para realizar esta distinción, realizamos un ensayo fagocítico mediante el uso de biopartículas de *E.coli* conjugadas con pHrodo, un colorante fluorogénico sensible al pH. Estas partículas tan solo emiten fluorescencia en el rango del espectro del color rojo a un pH \leq 5. De este modo, tan solo se observa señal cuando las biopartículas se encuentran en los compartimentos endosomales que presentan un pH ácido, en comparación con el pH neutro presente en el exterior y citoplasma celular.

Para la realización de este ensayo se utilizó el protocolo anterior (Figura 89 A) y descrito en la Figura 39 en el apartado de material y métodos.

Los datos obtenidos nos muestran que el tratamiento con las biopartículas induce la proliferación celular, observándose una mayor confluencia celular en aquellos grupos

experimentales tratados con las biopartículas en comparación con el grupo control, mientras que el tratamiento con NA no afectó a la confluencia celular (Figura 89 B, C). Al igual que en el ensayo anterior, la confluencia celular se mantuvo constante a lo largo del protocolo experimental lo que nos confirma la ausencia de muerte celular durante las condiciones experimentales utilizadas (Figura 89 B). En cuanto a la intensidad integrada total, observamos que esta se incrementa a lo largo del tiempo en aquellos grupos tratados con las biopartículas indicándonos el aumento de la fagocitosis celular de estas biopartículas a lo largo del tiempo (Figura 89 D). Mientras que no se observó ningún efecto significativo del tratamiento con NA sobre la capacidad fagocítica de las células de microglía (Figura 89 D, E).

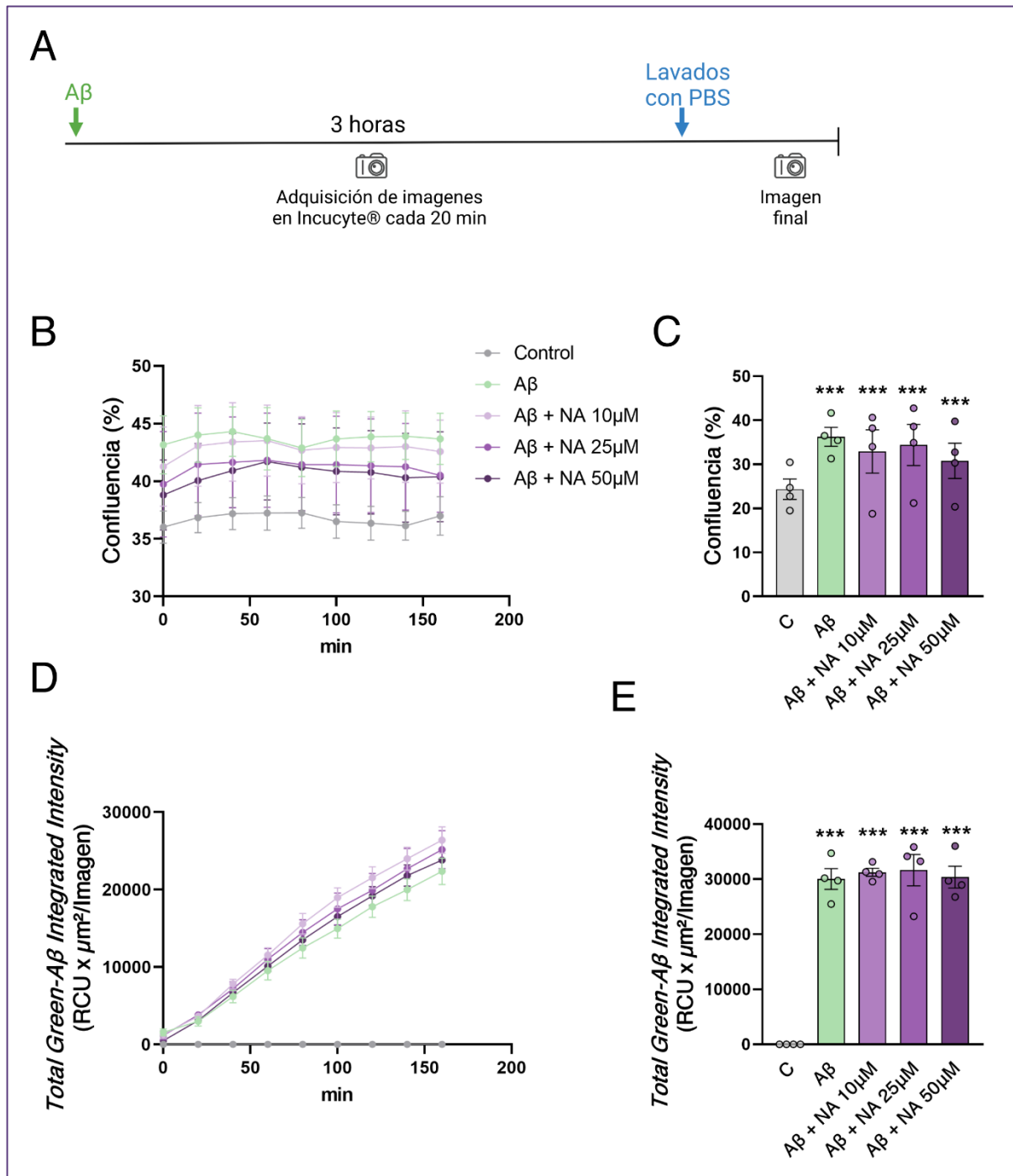


Figura 88. Ensayo de la capacidad fagocítica de las células de microglía derivadas de iPSCs humanas. Cultivos de células de microglía derivadas de iPSCs humanas se trataron con Aβ (1-42)-488 (20 μM) durante 3 horas durante las cuales se adquirieron fotos mediante el equipo Incucyte® cada 20 minutos. Pasadas las 3 horas, se realizaron 3 lavados con PBS, para eliminar el exceso de partículas fluorescentes, y se adquirimos una imagen final mediante el equipo Incucyte®. **A)** Gráfico representativo del protocolo experimental utilizado. **B)** Porcentaje de confluencia celular en cada grupo durante las 3h de incubación con Aβ (1-42)-488. **C)** Porcentaje de confluencia celular en cada grupo tras las 3h de incubación con Aβ. **D)** Intensidad integrada total de fluorescencia medida durante las 3h de incubación con Aβ (1-42)-488. **E)** Intensidad integrada total de fluorescencia tras las 3h de incubación con Aβ (1-42)-488. Los datos representados corresponden a las medias ± SEM de n = 4 réplicas por grupo. El experimento se realizó por triplicado a partir de células obtenidas de tres

diferenciaciones diferentes. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía seguido de un post hoc de Tukey. *** $p < 0,001$ vs. C.

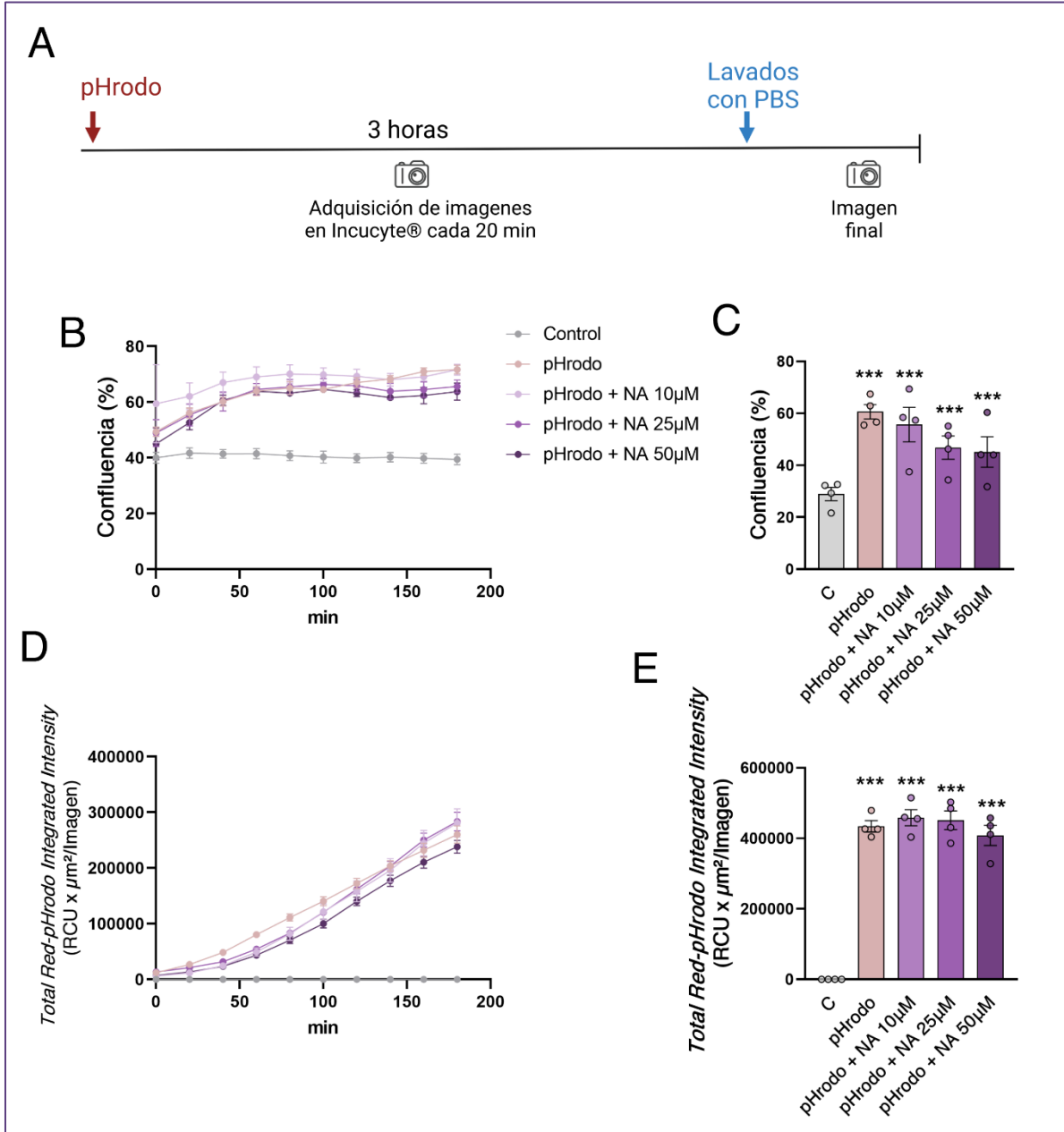


Figura 89. Ensayo de la capacidad fagocítica de las células de microglía derivadas de iPSCs humanas. Cultivos de células de microglía derivadas de iPSCs humanas se trataron con biopartículas de *E.coli* marcadas con pHrodoRed (50 µg/ml) durante 3 horas durante las cuales se adquirieron fotos mediante el equipo Incucyte® cada 20 minutos. Pasadas las 3 horas, se realizaron 3 lavados con PBS, para eliminar el exceso de partículas fluorescentes, y se adquirimos una imagen final mediante el equipo Incucyte®. **A)** Gráfico representativo del protocolo experimental utilizado. **B)** Porcentaje de confluencia celular en cada grupo durante las 3h de incubación con pHrodo. **C)** Porcentaje de confluencia celular en cada grupo tras las 3h de incubación con pHrodo. **D)** Intensidad integrada total de fluorescencia medida durante las 3h de incubación con pHrodo. **E)** Intensidad integrada total de fluorescencia tras las 3h de incubación con pHrodo. Los datos representados corresponden a las medias ± SEM de $n = 4$ réplicas por grupo. El experimento se realizó por triplicado a partir de células obtenidas de tres

*diferenciaci3nes diferentes. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía seguido de un post hoc de Tukey. *** $p < 0,001$ vs. C.*

DISCUSIÓN

7.1 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON REBOXETINA Y DE LA SUPRESIÓN DE CCL2 EN EL MODELO MURINO 5XFAD DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

7.2 EFECTO DE LA QUIMIOQUINA CCL2 EN LA RESOLUCIÓN DE LA INFLAMACIÓN

7.3 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON REBOXETINA EN EL MODELO MURINO P301S DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

7.4 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON NORADRENALINA EN CÉLULAS DE MICROGLÍA DERIVADAS DE IPSCS HUMANAS

7.5 DISCUSIÓN GENERAL, LIMITACIONES Y PRESPECTIVAS FUTURAS

7 DISCUSIÓN

7.1 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON REBOXETINA Y DE LA SUPRESIÓN DE CCL2 EN EL MODELO MURINO 5XFAD DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

En la Figura 90 se resumen los descubrimientos más significativos de este primer apartado.

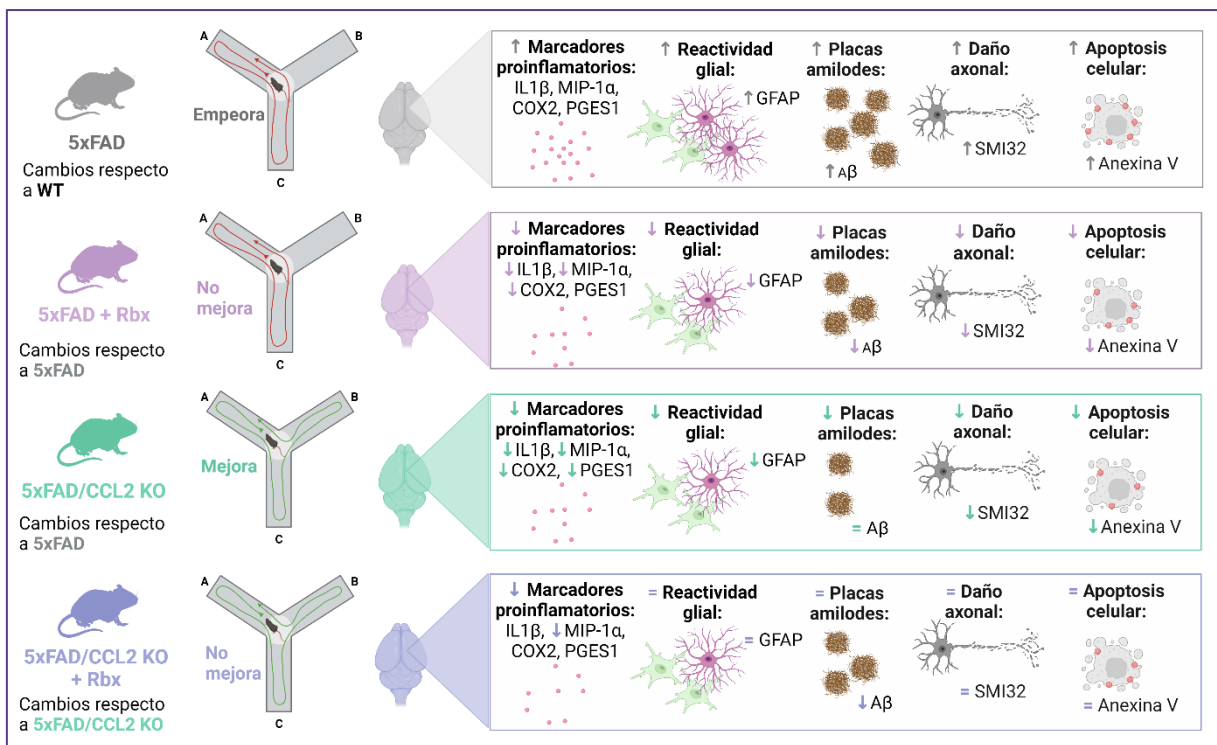


Figura 90. Efectos del tratamiento con reboxetina y de la supresión genética de CCL2 en la corteza frontal del modelo murino 5xFAD de la enfermedad de Alzheimer. El tratamiento con reboxetina durante 28 días a través de minibombas osmóticas en ratones 5xFAD disminuye la expresión de marcadores proinflamatorios, la astrogliosis, el número de placas amiloides y los niveles de oligómeros de Aβ, el daño axonal y la apoptosis celular en la corteza frontal a los 6 meses de edad. La supresión genética de CCL2 en ratones 5xFAD mejora las alteraciones observadas en la memoria de trabajo espacial y disminuye la expresión de marcadores proinflamatorios, la astrogliosis, la cantidad de placas amiloides, el daño axonal y la apoptosis celular en la corteza frontal a los 6 meses de edad. Finalmente, el tratamiento con reboxetina en ratones 5xFAD/CCL2KO disminuye la expresión del marcador inflamatorio MIP-1α y la cantidad de oligómeros de Aβ en la corteza frontal a los 6 meses de edad.

Efectos del tratamiento con reboxetina sobre ratones 5xFAD

En primer lugar, se analizó la memoria de trabajo espacial de los ratones 5xFAD mediante el uso de la prueba comportamental *Y maze*. Elegimos esta prueba comportamental ya que las alteraciones de la memoria de trabajo espacial constituyen uno de los síntomas más característicos de la EA, y se ha visto que este dominio de la memoria es regulado por la NA (Arnsten, 2006; Motley, 2018).

En nuestras condiciones experimentales no hemos encontrado un efecto del tratamiento con reboxetina a nivel comportamental (Figura 41), sin embargo, estudios previos utilizando diferentes estrategias terapéuticas que actúan modulando los niveles de NA cerebrales han demostrado efectos conductuales beneficiosos en modelos similares, incluyendo la administración de un antagonista $\alpha 2$ adrenérgico (Kalinin et al., 2006) o el aumento de la concentración de la TH (enzima limitante en la síntesis de NA) en el LC (Braun & Feinstein, 2019). A pesar de no obtener efectos a nivel comportamental, el efecto antiinflamatorio y neuroprotector encontrado tras el tratamiento con reboxetina concuerda con los obtenidos por otros grupos de investigación. En estos estudios se demuestra que la administración de diferentes inhibidores de los transportadores de NA como la atomoxetina o de precursores de NA como la L-DOPS presentan un papel antiinflamatorio y reducen la acumulación de A β y el daño neuronal que muestran diferentes modelos murinos de la EA (Heneka et al., 2010; Kalinin et al., 2012).

El aumento de la expresión de COX2 y mPGES1 provocado por la reboxetina en los animales WT también respalda resultados anteriores obtenidos por otros autores en cultivos primarios de microglía (Schlachetzki et al., 2010) y astrocitos (Hinojosa et al., 2013). En estudios realizados con anterioridad por el grupo de investigación donde se llevó a cabo esta tesis doctoral, se observó que la adición directa de NA a cultivos primarios de astrocitos y microglía de rata induce la expresión y la síntesis de COX2. Sin embargo, también se observó un efecto dual de la NA según el cual induce la producción de ciertas citoquinas en condiciones basales, pero la evita cuando los astrocitos son activados por LPS. Esto no se aplicó a COX2, que fue inducida por la NA en ausencia y en presencia de LPS (Hinojosa et al., 2013). Aquí observamos una dualidad de efectos similar, ya que la reboxetina induce la expresión de la COX2 y la mPGES1 en ratones WT, pero presenta el efecto contrario en los ratones 5xFAD (Figura 43). Por lo tanto, algunos de los efectos de la modulación de los niveles de NA en el SNC pueden depender de la presencia de un estímulo inflamatorio, como la formación de agregados de A β presente en los ratones 5xFAD.

Por otro lado, el tratamiento con reboxetina disminuyó la expresión de diferentes marcadores proinflamatorios tales como la IL1 β y MIP-1 α elevados en ratones 5xFAD (Figura 42), confirmando el efecto antiinflamatorio de la NA. La reducción de estos parámetros inflamatorios puede ser consecuencia de la regulación que ejerce la NA sobre la activación de las células gliales. En este sentido, en este estudio no observamos ningún efecto de la reboxetina sobre la densidad microglial, determinada mediante la tinción inmunohistoquímica de CX3CR1 (Figura 44). Sin embargo, un análisis más detallado de las células de microglía en este modelo animal (incluyendo estudios morfológicos, de expresión y síntesis de diferentes marcadores microgliales, etc.) será necesario con el fin de evaluar los efectos de la reboxetina sobre la reactividad microglial. Sin embargo, hemos podido detectar una disminución de la astrogliosis tras el tratamiento con reboxetina en animales 5xFAD (Figura 45). Estos datos concuerdan con los obtenidos por otros grupos de investigación donde el

tratamiento con L-DOPS, precursor de la NA, en ratones 5xFAD redujo la activación astrogliar, medida también mediante la inmunotinción con GFAP, tanto en la corteza como en hipocampo (Kalinin et al., 2012).

Los efectos de la reboxetina sobre los depósitos de amiloide (Figura 46, Figura 47) también concuerdan con los encontrados en otros estudios donde la deficiencia de NA aumenta el depósito de placas de A β en modelos de ratón de la EA (Heneka et al., 2010; Kalinin et al., 2007), lo que lleva a sugerir que la NA promueve la fagocitosis de A β por parte de las células gliales. Además, el número de células de microglía reclutadas a las placas de A β se reduce por la depleción de NA, lo que sugiere que el reclutamiento de microglía se inhibe en ausencia de NA (Heneka et al., 2010). En concordancia con estos resultados, el tratamiento con el antagonista de los receptores α 2 adrenérgicos indazoxan, que provoca un incremento de los niveles cerebrales de NA, en ratones APP/PS1 redujo los niveles cerebrales de A β 40 y A β 42 y los depósitos de amiloide (Chen et al., 2014). Mientras que la activación del receptor β 2 adrenérgico a través del tratamiento con clenbuterol en ratones APP/PS1 redujo las placas amiloides a través del incremento de la actividad α -secretasa y la disminución de la fosforilación de APP en la Thr668 (Chai et al., 2017). Estos resultados ponen de manifiesto el potencial terapéutico de la reboxetina, así como de otras estrategias terapéuticas moduladoras del sistema noradrenérgico, para reducir no solo el estado neuroinflamatorio, sino también los depósitos amiloides característicos de la EA. Sin embargo, la señalización a través de los receptores adrenérgicos también ha demostrado aumentar la producción de A β (Ni et al., 2006) y el uso de antagonistas de los receptores β 2 adrenérgicos en animales APP/PS1 y Tg2576 también promueve la reducción de los acúmulos de A β (Ni et al., 2006; Wagner et al., 2012). Estos datos en apariencia contradictorios ponen de manifiesto la necesidad de una mejor caracterización de las funciones del sistema noradrenérgico en condiciones fisiológicas y distintos estadios de la EA, ya que estos resultados parecen indicar un efecto dual de la NA en cuanto a la acumulación de los depósitos de A β en el SNC, pudiendo promover su aclaramiento o producción dependiendo del ambiente inflamatorio.

La regulación de las células gliales por parte de la NA, reduciendo la neuroinflamación y los depósitos de amiloide pueden ser uno de los mecanismos a través de los cuales la reboxetina ejerce los efectos neuroprotectores encontrados (disminución del daño axonal y la apoptosis celular) (Figura 48, Figura 49, Figura 50). Sin embargo, la NA podría ejercer a un efecto neuroprotector directo a través de la liberación de factores neurotróficos y otros agentes neuroprotectores. En este sentido, el tratamiento con L-DOPS (precursor de NA), así como el tratamiento con vindeburol (inductor de la TH, enzima implicada en la síntesis de NA) en ratones 5xFAD indujo la expresión y producción de BDNF (Kalinin et al., 2012). En el contexto de la EA, los niveles de BDNF están reducidos en estos pacientes (Lina Gao et al., 2022) y se ha demostrado que el aumento de BDNF protege a las neuronas contra la muerte celular inducida por A β (Counts & Mufson, 2010). Además, el BDNF podría proporcionar apoyo trófico no solo a las áreas de proyección del sistema noradrenérgico como la corteza o el hipocampo, sino también a las neuronas del LC a través de mecanismos de transporte retrógrado. El BDNF parece jugar un papel crítico en la supervivencia celular de las neuronas del LC, pues los ratones deficientes en TrkB, receptor de BDNF, presentan un 30% menos de neuronas del LC (Holm et al., 2003). Por lo que el apoyo trófico a las neuronas del LC, cuya neurodegeneración parece desempeñar un papel clave en la EA, podría mejorar la supervivencia y actividad neuronal del LC pudiendo reducir la fisiopatología de la EA. Por otro

lado, el tratamiento con clenbuterol, agonista de los receptores β_2 adrenérgicos, en ratones APP/PS1 promovió la generación de espinas dendríticas en las neuronas CA1 del hipocampo, lo que se acompañó de un aumento en los niveles de la proteína 95 de densidad postsináptica (PSD95), la sinapsina 1 y la sinaptofisina (Chai et al., 2017). Estos datos apoyan la hipótesis de que los fármacos moduladores del sistema noradrenérgico podrían actuar también sobre la pérdida sináptica presente en los pacientes con EA. Teniendo en cuenta estos mecanismos neuroprotectores de la NA, sería de gran interés evaluar en estudios futuros los efectos del tratamiento con reboxetina sobre la expresión y síntesis de otros marcadores de muerte celular, así como de diferentes factores neurotróficos y marcadores de disfunción sináptica.

Efectos de la supresión genética de CCL2 sobre ratones 5xFAD

En cuanto a los efectos de la supresión de CCL2, nuestros datos indican que, en las condiciones analizadas, la supresión genética de CCL2 en animales 5xFAD reduce los déficits de memoria de trabajo espacial determinada mediante la prueba comportamental *Y maze* (Figura 41), así como la expresión de citoquinas proinflamatorias (Figura 42), la astrogliosis (Figura 45), la acumulación de placas A β (Figura 46) y el daño neuronal (Figura 48, Figura 49, Figura 50) en la corteza frontal. Esto coincide con algunos de los estudios realizados anteriormente donde se demostró que la sobreexpresión de CCL2 en ratones transgénicos APP aumenta la acumulación de A β y los déficits de memoria (Kiyota et al., 2009; Yamamoto et al., 2005). Sin embargo, este grupo también ha descrito que la deficiencia de CCL2 en ratones APP/PS1 o PS1 presenta un efecto deletéreo dando lugar a alteraciones similares a las que observaron cuando se sobreexpresaba CCL2 (Kiyota et al., 2013; Kiyota et al., 2015). Mientras que la protección proporcionada por la eliminación de CCL2 en otras condiciones en las que el SNC estaba expuesto a lesiones inflamatorias (Howe et al., 2017; Hughes et al., 2002; Janssen et al., 2016; Rankine et al., 2006; B. D. Semple, N. Bye, et al., 2010) coincide con nuestras observaciones. No obstante, consideramos que las divergencias entre nuestros datos y los mencionados anteriormente podrían deberse, entre otros factores, a los diferentes tipos de ratones APP utilizados que pueden dar lugar a patrones alterados de producción de A β y diferentes grados de neuroinflamación donde tanto la supresión como la inducción de CCL2 pueden presentar efectos beneficiosos en función del contexto inflamatorio.

CCL2 constituye una de las quimioquinas más potentes en la regulación de la migración de las células gliales y la infiltración de monocitos/macrófagos hacia las zonas de daño (Sozzani et al., 1994). En la fisiopatología de la EA, CCL2 se expresa principalmente en las células gliales y los macrófagos, ambos implicados en la eliminación de los depósitos de A β en la EA (Britschgi & Wyss-Coray, 2007). Por lo que su supresión puede reducir la migración celular hacia los depósitos de A β y su correcta eliminación, incrementando los depósitos de amiloide en el SNC, tal y como observaron algunos estudios (Kiyota et al., 2013; Kiyota et al., 2015).

Además, CCL2 ha demostrado promover la neuroprotección (Bruno et al., 2000) y reducir la muerte celular apoptótica (Eugenin et al., 2003) debido a la toxicidad del NMDA al disminuir la liberación neuronal de glutamato, que aumenta en ciertas enfermedades neurodegenerativas como la EA. Por lo que su supresión puede promover la neurodegeneración en ciertos contextos. Por otro lado, la neuroinflamación y la reactividad glial crónica son responsables de la neurodegeneración en la EA, lo que podría explicar los efectos beneficiosos de la supresión genética de CCL2 en modelos más agresivos de la EA

como es el caso del modelo 5xFAD, así como los efectos deletéreos de la sobreexpresión de CCL2 (Kiyota et al., 2009; Yamamoto et al., 2005).

Efectos del tratamiento con reboxetina sobre ratones 5xFAD/CCL2KO

Otro objetivo de este estudio era dilucidar el papel de CCL2 en las acciones antiinflamatorias de la NA, ya que habíamos observado previamente la modulación de esta quimioquina por la NA (Hinojosa et al., 2013; Madrigal et al., 2009). Las diferencias en la expresión génica de MIP-1 α entre los ratones 5xFAD/CCL2KO tratados con vehículo y los tratados con reboxetina sugieren que este efecto de la NA es independiente de CCL2 (Figura 42). Esto es particularmente notable en el caso de la detección de A β por WB, para la cual la reboxetina mostró una gran reducción en presencia y en ausencia de CCL2 (Figura 47). Por lo tanto, aunque la concentración de NA puede influir en la producción de CCL2 en el cerebro, y esto puede mediar las acciones neuroprotectoras y antiinflamatorias de la NA (Madrigal et al., 2009), algunas de estas acciones no requieren la presencia de CCL2. No obstante, la aparente falta de efecto de la reboxetina en los ratones 5xFAD/CCL2KO en el caso de la astrogliosis (Figura 45), las placas de A β (Figura 46, Figura 47) o el neurofilamento H no fosforilado (SMI32) (Figura 48, Figura 49) podrían deberse a la gran reducción proporcionada en todos esos casos por la supresión genética de CCL2 en los ratones 5xFAD, lo que dificulta la detección de un posible efecto aditivo o sinérgico de la reboxetina.

Efectos de la supresión genética de CCL2 sobre ratones WT

Los efectos de la supresión genética de CCL2 en ratones WT se resumen en la Figura 91. Los datos obtenidos muestran que la supresión genética de CCL2 en animales WT presenta un efecto perjudicial incrementando la expresión de la IL1 β (Figura 42), la astrogliosis (aumento de GFAP) (Figura 45), el daño axonal (aumento de SMI32) (Figura 48, Figura 49) y la apoptosis celular (aumento de la anexina V) (Figura 50).

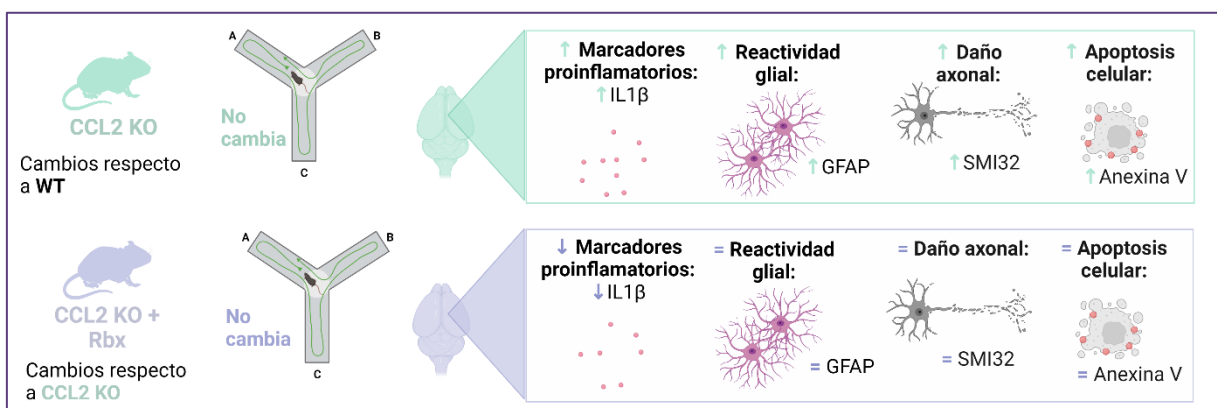


Figura 91. Efectos de la supresión genética de CCL2 en animales WT. La supresión genética de CCL2 incrementa la expresión de la IL1 β , la astrogliosis (aumento de GFAP), el daño axonal (aumento de SMI32) y la apoptosis celular (aumento de la anexina V) en la corteza frontal de ratones de 6 meses de edad.

Aunque la supresión genética de CCL2 ha sido ampliamente estudiada en modelos de daño cerebral, los efectos deletéreos de la supresión genética de CCL2 en animales WT ha sido menos estudiada. Estos efectos pueden estar mediados en parte por las funciones homeostáticas que presenta esta quimioquina en el SNC. Así, se ha demostrado que la deficiencia de CCL2 reduce la neurogénesis y la diferenciación de los progenitores neuronales (Kiyota et al., 2013). Otros estudios han demostrado que CCL2 induce el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF), implicado en la protección neuronal y en promover la proliferación de progenitores neuronales (Aberg et al., 2006). Además, CCL2 presenta importantes efectos neuroprotectores. Se ha demostrado que puede proteger a las neuronas frente a ciertos agentes proapoptóticos, incrementando las proteínas antiapoptóticas Akt y p-Bad (Franke et al., 2003).

De este modo, basándonos en nuestras observaciones, proponemos que CCL2 constituye una diana relevante para la reducción de los daños asociados a la EA. Pero, dadas las consecuencias neurodegenerativas que ha demostrado tener su eliminación, y el papel dual de esta quimioquina en función del contexto neuroinflamatorio, la inhibición de su actividad en determinados contextos inflamatorios, durante largos periodos o de forma no local podría llegar a ser perjudicial a largo plazo.

7.2 EFECTO DE LA QUIMIOQUINA CCL2 EN LA RESOLUCIÓN DE LA INFLAMACIÓN

En la Figura 92 se resumen los resultados más relevantes de este apartado.

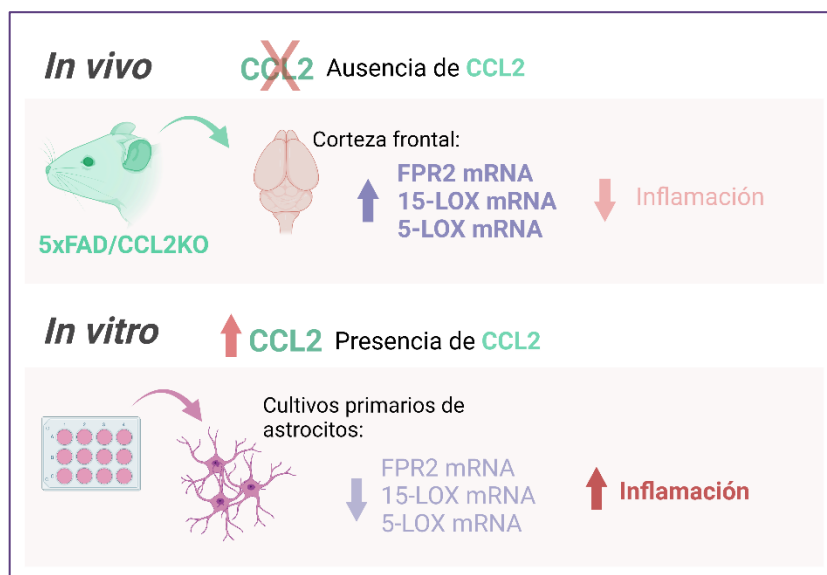


Figura 92. Efectos de la quimioquina CCL2 sobre la resolución de la inflamación. Los ratones 5xFAD/CCK2KO presentan un menor estado inflamatorio respecto a los ratones 5xFAD y una mayor expresión del receptor, FPR2, y las enzimas de síntesis, 15-LOX y 5-LOX, de la RvD1 en la corteza frontal a los 6 meses de edad. Mientras que la presencia de la quimioquina CCL2 en cultivos primarios de astrocitos corticales de rata previno el incremento en la expresión de los receptores y enzimas de la RvD1 tras el tratamiento con LPS, incrementando la expresión de diferentes marcadores inflamatorios.

Efecto de la supresión genética de CCL2 sobre la resolución de la inflamación en ratones 5xFAD

Nuestros resultados *in vivo* demuestran que la supresión genética de CCL2 en ratones 5xFAD induce la expresión del receptor FPR2 de la RvD1, así como las enzimas de síntesis 15-LOX y 5-LOX de la RvD1 (Figura 54). Esto nos sugiere que en condiciones inflamatorias como las presentes en los ratones 5xFAD, CCL2 puede ejercer un efecto represor sobre la vía de la RvD1, promoviendo el estado neuroinflamatorio. Mientras que la ausencia de esta quimioquina en los ratones 5xFAD/CCL2KO facilita el proceso de resolución de la inflamación y, como consecuencia, estos animales presentan un menor grado del estado neuroinflamatorio tal y como observábamos en el apartado anterior de resultados (Figura 42). Sin embargo, sería interesante evaluar en futuros estudios los niveles proteicos de los receptores y enzimas de síntesis de la RvD1, así como la determinación de los niveles de RvD1 y otros mediadores lípidicos especializados en la resolución de la inflamación (SPMs). En este estudio se intentaron evaluar los niveles cerebrales de RvD1 en estos ratones mediante la técnica de ELISA, sin embargo, no se obtuvieron niveles detectables. El uso de otras técnicas alternativas tales como HPLC podrían ser de gran interés para evaluar el papel

de estas moléculas en los modelos murinos de la EA. Por otro lado, se ha demostrado que el A β inhibe la resolución de la inflamación (Zhu et al., 2015) por lo que el menor número de depósitos de amiloide presentes en los ratones 5xFAD/CCL2KO en comparación con los ratones 5xFAD (Figura 46) podría estar también contribuyendo al aumento de la expresión de FPR2, 15-LOX y 5-LOX en los ratones 5xFAD/CCL2KO.

Efectos de la quimioquina CCL2 sobre la resolución de la inflamación en cultivos primarios de astrocitos corticales de rata

Dentro del SNC, las células gliales son los principales agentes encargados de promover la respuesta inflamatoria, así como de su resolución. Debido a la disminución en la astrogliosis observada en los ratones 5xFAD/CCL2KO con anterioridad (Figura 45), así como el papel de los astrocitos como fuente principal de CCL2 en el SNC, evaluamos cómo la quimioquina CCL2 podría estar alterando la resolución de la inflamación en cultivos primarios de astrocitos corticales de rata.

Estudios anteriores demostraron que el tratamiento con LPS en cultivos de células de microglía induce la expresión de 5-LOX y FPR2, mientras que la exposición al péptido A β 1-42 inhibe la resolución de la inflamación (Zhu et al., 2015). Además, se ha demostrado que A β interactúa directamente con el receptor FPR2 (Tiffany et al., 2001). Por estos motivos, aunque el análisis de los efectos de A β podría haber representado un estudio interesante, creemos que el uso del LPS y por tanto la generación de una respuesta inflamatoria a través de la activación de los receptores TLRs (L. Li et al., 2021), es el modelo más útil para analizar la regulación por CCL2 del proceso de inflamación-resolución.

Los datos obtenidos en los cultivos de astrocitos demuestran que la inducción de mediadores de resolución, a saber, las lipoxigenasas 15-LOX y 5-LOX, así como los receptores de RvD1 FPR2 y GPR32, que tiene lugar en los astrocitos tras su activación mediante LPS es inhibida por CCL2 (Figura 56). Esto podría prolongar el estado inflamatorio y, por tanto, facilitar la acumulación de citocinas proinflamatorias y otras sustancias neurotóxicas. De acuerdo con esto, descubrimos que CCL2 aumenta la expresión, síntesis y liberación de IL1 β , así como la expresión de otros mediadores inflamatorios (Figura 58, Figura 59). En este caso, aunque el pretratamiento con CCL2 incrementó la expresión de MIP-1 α , TNF α y NOS2 a las 48 tras el tratamiento con LPS (Figura 59), no se observaron diferencias en cuanto a los niveles proteicos de MIP-1 α y TNF α (Figura 60 A, B), ni de los niveles de nitritos en el medio celular (Figura 60 D). Sin embargo, podrían necesitarse más tiempo para observar los efectos de CCL2 a nivel proteico. Futuros estudios deberán evaluar si el tratamiento con CCL2 incrementa los niveles de estos marcadores a tiempos más largos. Estos resultados muestran por primera vez, el potencial papel de CCL2 en la inhibición de la resolución de la inflamación y aumento de la cronificación de la respuesta inflamatoria en astrocitos. Estudios realizadas con anterioridad, observaron que el tratamiento con LPS en cultivos primarios de astrocitos corticales provenientes de ratones CCL2KO indujo unos mayores niveles de mediadores inflamatorios como la IL6 en comparación con aquellos astrocitos tratados con LPS provenientes de ratones WT (Bridgette D. Semple et al., 2010). Por lo que, la ausencia de CCL2 incrementó la expresión de la IL6 inducida por el LPS. Poniendo de manifiesto el papel de la quimioquina CCL2 en el control de la respuesta inflamatoria mediada por los astrocitos.

Finalmente, observamos que la RvD1 disminuye la expresión de IL1 β , aunque no afectó a sus niveles proteicos a las 24 horas tras el tratamiento (Figura 62). La falta de efectos de la RvD1

sobre los niveles proteicos de la IL1 β puede deberse nuevamente al tiempo al cual se realizó la determinación. De este modo, la cuantificación de los niveles proteicos de IL1 β , así como otros marcadores inflamatorios, a tiempos más largos podría ayudarnos a observar efectos de la RvD1.

Finalmente, la presencia de CCL2 impidió los efectos de la RvD1 sobre la expresión de la IL1 β (Figura 62). Estos datos apoyan la hipótesis de que la quimioquina CCL2 podría favorecer la cronificación de la inflamación, al menos en parte, a través de la inhibición de los efectos de las moléculas implicadas en la resolución de la inflamación tales como la RvD1.

Potencial terapéutico de la RvD1 y otros SPMs en la enfermedad de Alzheimer y papel de la quimioquina CCL2

La quimioquina CCL2 desempeña un papel dominante en la propagación de la neuroinflamación en la EA (Sokolova et al., 2009), y sus niveles se correlacionan con la progresión de la enfermedad y el deterioro cognitivo (Kimura et al., 2018; Lee et al., 2018). Mientras que se ha descrito una disminución de los niveles de la RvD1 y otros mediadores lipídicos especializados en la resolución de la inflamación (SPMs) en LCR e hipocampo de pacientes con EA, los cuales se correlacionan también con un mayor deterioro cognitivo (revisado en Serhan, 2014).

Hasta la fecha las terapias en enfermedades que cursan con inflamación crónica se centran en la inhibición de la inflamación a través del uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Sin embargo, este tipo de terapias presentan diferentes efectos secundarios indeseados, y mientras que se ha documentado que el uso de AINEs disminuye el riesgo de desarrollar EA y retrasa la aparición de la enfermedad (revisado en Heneka & O'Banion, 2007), su eficacia en esta enfermedad neurodegenerativa sigue siendo objeto de debate (Etminan et al., 2003). Por ello, terapias centradas en la resolución de la inflamación en lugar de su inhibición pueden ofrecer una alternativa terapéutica al tratamiento de enfermedades que cursan con inflamación crónica más segura y efectiva (Crean & Godson, 2015). En modelos animales de la EA, el uso de SPMs presenta un efecto beneficioso disminuyendo diferentes eventos patológicos asociados a la misma y disminuyendo así su progresión. Las lipoxinas (LXA) disminuyen la expresión de NF κ β y favorecen el reclutamiento de microglía promoviendo la eliminación de los depósitos de A β y mejorando los déficits cognitivos (Medeiros et al., 2013). Otros estudios, han determinado que el tratamiento con RvD1 y LXA4 en modelos murinos de la EA es capaz de restaurar los niveles de los SPMs y disminuir los depósitos de A β y las citoquinas proinflamatorias (Kantarci et al., 2018). De acuerdo con estos datos, un estudio reciente demostró que la administración intranasal de SPMs a ratones App^{NL-G-F/NL-G-F} de la EA reduce los déficits de memoria acompañados de una restauración de los déficits de oscilación gamma, junto con una disminución de la activación microglial (Emre et al., 2022). Mientras que la adición de RvD1 a macrófagos de pacientes con EA *in vitro* evita el desarrollo de un fenotipo proinflamatorio y promueve la fagocitosis de A β (Mizwicki et al., 2013).

En su conjunto, estos datos demuestran el potencial terapéutico de los SPMs en la EA (Miyazawa et al., 2020). En este sentido, actualmente se están desarrollando estrategias terapéuticas basadas en el uso de la neuroprotectina D1 (NPD1) y la protectina D1 para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Serhan, 2014). Hasta la fecha, tan solo el potencial terapéutico de los suplementos de omega-3, precursor de algunos SPMs, ha sido evaluado en ensayos clínicos en pacientes con EA, sin embargo su eficacia terapéutica sigue

siendo objeto de debate (Fraga et al., 2017). A pesar de que estudios futuros son necesarios, los datos aquí obtenidos demuestran que los altos niveles de CCL2 presentes en los pacientes de EA podrían llegar a ser responsables de la pérdida de eficacia de estos suplementos y de las futuras terapias de este tipo, debido a la inhibición de los mecanismos de acción de estas moléculas que podría estar ejerciendo CCL2, así como otras quimioquinas y/o el propio A β . Por lo tanto, la inhibición de CCL2 podría llegar a considerarse como un tratamiento coadyuvante en las terapias centradas en la resolución de la inflamación, con el fin de aumentar su eficacia, aunque futuros estudios serán necesarios para demostrar esta hipótesis. Finalmente, el potencial papel de la reboxetina en el proceso de resolución de la inflamación será un interesante campo de estudio futuro.

7.3 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON REBOXETINA EN EL MODELO MURINO P301S DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Mientras que los efectos de los fármacos moduladores de la NA han sido ampliamente estudiados en modelos de amiloidosis de la EA, no existen prácticamente datos sobre los efectos de estos fármacos en modelos de taupatía de la EA. El extenso uso de ratas o ratones transgénicos para APP o PS1 en el campo de investigación de la EA puede deberse a: 1) *La importancia de estas mutaciones en el desarrollo de la EA familiar (FAD)*, y 2) *La dominancia de la hipótesis de la cascada amiloide en la patología de la EA durante los últimos años*. Sin embargo, los depósitos de tau constituyen otra de las características patológicas de gran relevancia en la EA. Es por ello por lo que creímos relevante evaluar los efectos de la reboxetina en un modelo de taupatía para la EA.

Estos modelos animales modificados genéticamente se basan en la presencia de la proteína tau humana con determinadas mutaciones que favorecen su fosforilación en determinados residuos y la formación de agregados insolubles intraneuronales (NFTs). Cabe destacar que estas mutaciones no se han encontrado hasta la fecha en pacientes con EA, sino que se encuentran en pacientes con en otras taupatías tales como la demencia frontotemporal (DFT) (Iqbal et al., 2016). Dentro de los modelos disponibles, se decidió utilizar los ratones P301S, también conocidos como PS19, por diversos motivos entre los que cabe destacar los siguientes: 1) *Los depósitos de tau generados en este modelo animal son muy similares a los encontrados en pacientes con EA* (Briggs et al., 2017; Takeuchi et al., 2011), 2) *La forma mutante de tau P301S promueve la neuroinflamación, neurodegeneración y el deterioro cognitivo tanto en ratones como en humanos, lo que nos permite evaluar los efectos antiinflamatorios y neuroprotectores de la reboxetina en este modelo* (Takeuchi et al., 2011), y 3) *Los ratones P301S constituyen uno de los modelos de taupatía más extensamente utilizados por la comunidad científica, lo que permite comparar los resultados obtenidos con otros estudios*. De acuerdo con estos motivos, se decidió utilizar el modelo murino P301S para evaluar los efectos de la reboxetina sobre la neuroinflamación provocada por los depósitos de tau (Jankowsky & Zheng, 2017).

Prueba comportamental del laberinto en Y a ratones P301S

En primer lugar, quisimos evaluar los posibles efectos del tratamiento con reboxetina en los déficits cognitivos presentes en los ratones P301S. La presencia de depósitos de tau en el hipocampo y la neurodegeneración de esta región cerebral en pacientes con EA es una de las causas de las alteraciones en la memoria de trabajo espacial presentes en estos pacientes,

dando lugar a tendencias a perderse y problemas para recordar incluso lugares familiares (Allison et al., 2016; Lithfous et al., 2013). Por ello, decidimos evaluar la posible alteración de la memoria y de trabajo espacial en los ratones P301S mediante la prueba comportamental del laberinto en Y o *Y maze* y el efecto del tratamiento con reboxetina. Además, esta prueba comportamental ha sido utilizada para evaluar las alteraciones comportamentales presentes en los ratones P301S en anteriores estudios (Apicco et al., 2018; Takeuchi et al., 2011).

Los datos obtenidos ponen de manifiesto una gran heterogeneidad en la capacidad locomotora de nuestra cohorte de animales P301S, interfiriendo con la determinación del porcentaje de alternancia espontánea, indicador de la memoria espacial de trabajo, así como en los posibles efectos del tratamiento con reboxetina (Figura 64). Sin embargo, otros estudios donde se utilizó la administración de DSP4, toxina que provoca una degeneración de las neuronas noradrenérgicas del LC, en ratones P301S demostró un incremento de los déficits de memoria espacial presentes en los ratones P301S a partir de los 8 meses de edad, evaluados mediante la prueba comportamental de *Morris water maze* (Terpanit Chalermpananupap et al., 2018). Estos datos apoyan el potencial terapéutico de la reboxetina y otros moduladores de la noradrenalina en la mejoría de las alteraciones de la memoria espacial presentes en pacientes con EA. Mientras que otros estudios observaron alteraciones locomotoras y un comportamiento de tipo hiperactivo similar al encontrado en nuestro estudio a través de la prueba comportamental de *Open field* o campo abierto (Apicco et al., 2018; Takeuchi et al., 2011). A pesar de que la prueba del laberinto en Y no es la prueba estándar para evaluar alteraciones en la locomoción, la distancia total recorrida y la velocidad nos permitió evaluar el comportamiento de tipo hiperactivo y las alteraciones locomotoras en estos ratones (Figura 64) y su posterior correlación con los parámetros bioquímicos analizados tal y como comentaremos más adelante. Sin embargo, con el fin de evaluar los posibles efectos del tratamiento con reboxetina y otros moduladores de la NA en los diferentes dominios cognitivos afectados en la EA, futuros estudios deberán incluir la realización de una batería de pruebas comportamentales antes y después del tratamiento. Además, debido a la gran heterogeneidad fenotípica presente en este modelo murino, un número suficiente de animales que permita subdividir el grupo experimental P301S según las alteraciones comportamentales sería de gran interés con el fin de observar los efectos de la reboxetina, así como de otras estrategias terapéuticas.

Sin embargo, a pesar de no encontrarse resultados concluyentes en cuanto a la prueba comportamental utilizada, nuestro objetivo principal en este estudio era evaluar los efectos antiinflamatorios y neuroprotectores de la NA, y en este sentido el tratamiento con reboxetina en ratones P301S presentó diferentes efectos a nivel celular y bioquímico. Los resultados más relevantes se resumen en la Figura 93.

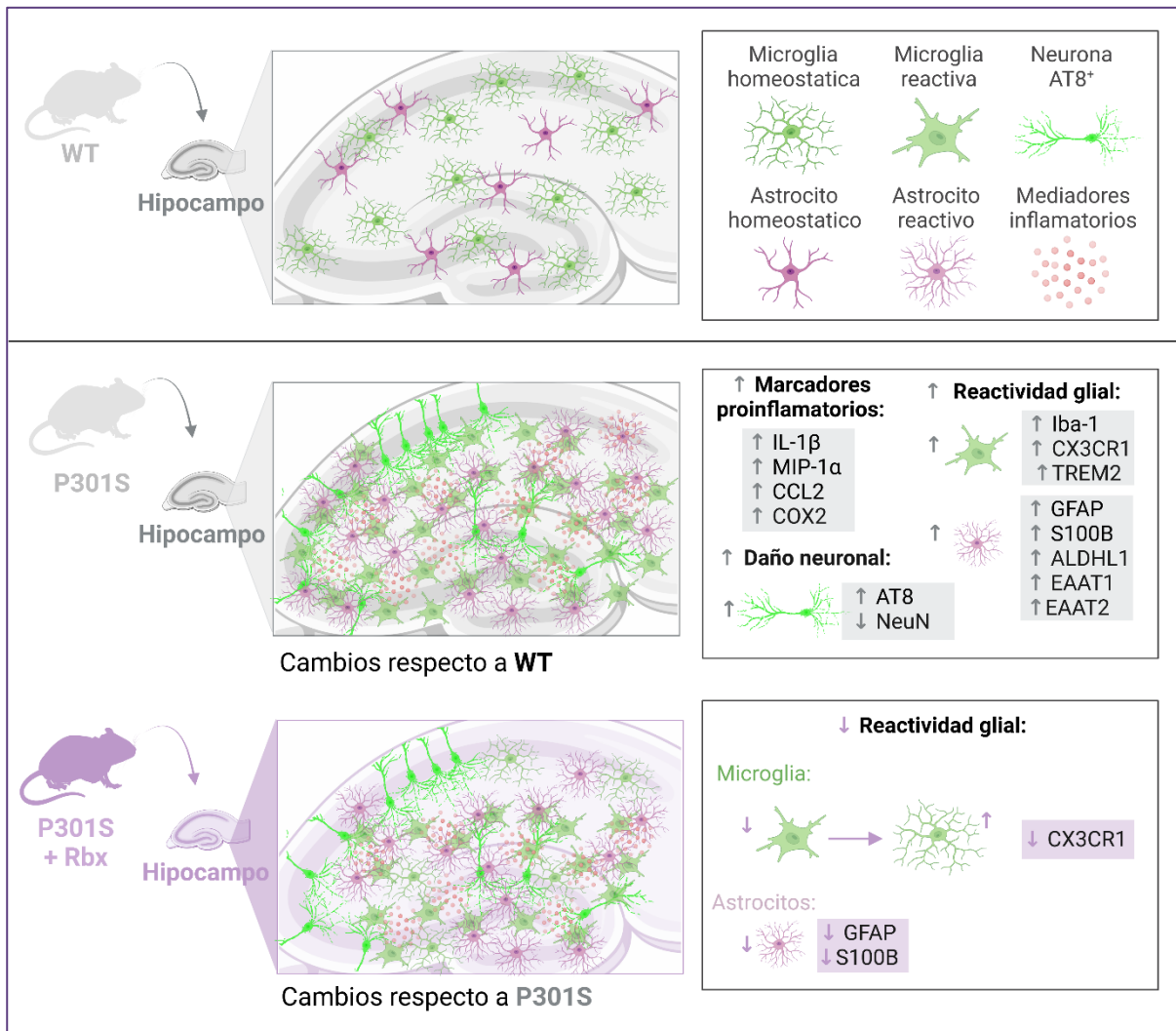


Figura 93. Efectos del tratamiento con reboxetina en hipocampo del modelo murino P301S de la enfermedad de Alzheimer. Los ratones P301S presentan un estado neuroinflamatorio en el hipocampo acompañado de gliosis, aumento de las poblaciones de microglía y astrocitos, así como un mayor aumento de depósitos intraneuronales de tau fosforilado y una pérdida neuronal a los 10 meses de edad. El tratamiento con reboxetina en ratones P301S provoca una disminución de la reactividad glial, disminuyendo el grado de activación de estas células, pero sin llegar a afectar a los depósitos de tau ni a la pérdida neuronal a los 10 meses de edad.

Efectos del tratamiento con reboxetina sobre el estado neuroinflamatorio del hipocampo en ratones P301S

En primer lugar, se evaluó el grado de neuroinflamación presente en los ratones P301S en el hipocampo y los posibles efectos antiinflamatorios del tratamiento con reboxetina. A pesar de los efectos antiinflamatorios mostrados tras el tratamiento con reboxetina en la corteza frontal de ratones 5xFAD (Figura 42) en nuestros anteriores estudios, el tratamiento con reboxetina no presentó los efectos antiinflamatorios esperados en el hipocampo de ratones P301S (Figura 65). El análisis estadístico de ANOVA de dos vías determinó un efecto del tratamiento sobre los niveles de expresión de MIP-1 α (Figura 65 B), pero no identificó efectos del

tratamiento en los ratones P301S en los otros parámetros inflamatorios analizados. Futuros estudios deberán incluir el análisis de los niveles proteicos de diferentes marcadores inflamatorios con el fin de evaluar los potenciales efectos antiinflamatorios de la reboxetina en ratones P301S.

Sin embargo, el tratamiento con reboxetina afectó al grado de activación glial presente en el hipocampo de los ratones P301S. Estos datos concuerdan con los observados por otros investigadores donde la neurodegeneración del LC en ratones P301S mediante el uso de la toxina DSP4 incrementó la activación glial, determinada mediante la inmunotinción de Iba-1 y GFAP, en el hipocampo de ratones P301S (Termpanit Chalermmpalanupap et al., 2018). Estos datos ponen de manifiesto el papel de la NA en el control de la activación glial.

Efectos del tratamiento con reboxetina sobre la reactividad de las células de microglía hipocampales en ratones P301S

En primer lugar, la tinción inmunohistoquímica con Iba-1 nos permitió detectar el número de células de microglía, así como su morfología en el hipocampo de ratones P301S y el efecto del tratamiento con reboxetina sobre estos parámetros. Mientras que el tratamiento con reboxetina pareció no afectar al número total de células de microglía presentes en el hipocampo de ratones P301S (Figura 67), pudimos determinar el efecto del tratamiento sobre la morfología de este tipo celular, y su grado de reactividad (Figura 68, Figura 69, Figura 70). En este sentido, mientras que los ratones P301S presentan una población microglial más reactiva (mayor tamaño del soma, menor área total ocupada y menor índice de transformación) respecto a ratones WT, el tratamiento con reboxetina en ratones P301S provocó una disminución de la población microglial reactiva dando lugar a la aparición de células con un menor grado de activación (mayor área total ocupada y mayor índice de transformación) (Figura 69, Figura 70).

En contraposición a nuestros resultados, estudios realizados por otros investigadores observaron que la NA provoca una retracción de los procesos microgliales en cultivos celulares y cortes cerebrales a través de la activación de los receptores β_2 adrenérgicos (Gyoneva & Traynelis, 2013). En línea con estos datos, estudios recientes encontraron que la NA disminuye la arborización de las células microgliales, restringiendo así el proceso de vigilancia, así como las áreas de contacto con las espinas dendríticas neuronales (Liu et al., 2019; Stowell et al., 2019). El aumento de las concentraciones cerebrales de NA tras una situación de estrés a través de la restricción de movimiento, promovió la activación microglial en diferentes regiones cerebrales en ratones WT, mientras que este efecto no se observó cuando se administraron betabloqueantes o se usaron ratones KO para los receptores β adrenérgicos, sugiriendo nuevamente que la activación de la microglía está mediada a través de la activación de los receptores β_2 adrenérgicos (Sugama et al., 2019). En su conjunto, estos resultados ponen de manifiesto el posible papel dual de la NA sobre el control del grado de activación microglial, pudiendo inducir su activación o reducirla en función del grado de activación en el que se encuentren las células de microglía.

En este sentido, nuestros datos demuestran que en una situación de neuroinflamación, como la presente en los animales P301S, la NA reduce el grado de activación microglial, mientras que los datos aportados por otros investigadores sugieren que la NA promueve la reactividad microglial en una situación de homeostasis celular. Sin embargo, en nuestras condiciones

experimentales no hemos observado efectos del tratamiento con reboxetina sobre animales WT, y por tanto futuros estudios son necesarios para confirmar este papel dual de la NA sobre las células de microglía.

Las células de microglía son células muy dinámicas y están en constante movimiento, por lo que el estudio de la morfología celular a través de estudios de inmunotinción presentan ciertas limitaciones. Otra de las limitaciones de nuestro estudio, es el uso de secciones de 25 μm de ancho y el análisis de la morfología celular en dos dimensiones. Aunque estos estudios pueden ofrecernos una idea del estado de reactividad de la microglía, futuros estudios realizados sobre secciones de un mayor grosor que incluyan todo el volumen celular (alrededor de 60 μm de ancho) y estudios de morfología en tres dimensiones a través del uso de diferentes softwares de imagen tales como Imaris[®], son necesarios para confirmar este efecto de la NA. Además, futuros estudios *in vivo* de la morfología celular a través del uso de microscopía de doble fotón serían de gran interés con el fin de confirmar los efectos del tratamiento con reboxetina, así como otros fármacos moduladores de los niveles cerebrales de NA, sobre el grado de activación microglial en modelos de la EA. Además, estos estudios también nos permitirían analizar la capacidad de migración de las células de microglía hacia los depósitos de amiloide y/o tau en diferentes modelos murinos de la EA, y observar los efectos de la NA sobre la migración y fagocitosis celular.

Sin embargo, los estudios realizados mediante citometría de flujo, que incluyen todo el hipocampo, si nos permitieron analizar todas las células de esta estructura cerebral y detectar un efecto de la reboxetina sobre la población total de células de microglía (Figura 71). En este caso, el tratamiento con reboxetina disminuye la cantidad de células de microglía presente en el hipocampo de ratones P301S (Figura 71). Estos datos concuerdan con estudios anteriores donde la NA suprime la proliferación de la microglía a través de la activación de los receptores $\beta 2$ adrenérgicos y el incremento de los niveles de AMPc intracelulares (Fujita et al., 1998). Además, pudimos determinar mediante esta técnica los niveles de TREM2 en la población microglial en el hipocampo de ratones P301S a través de la determinación de la intensidad del receptor TREM2 (Figura 72). TREM2 es un inmunoreceptor que interviene en el desarrollo de la microglía asociada a la enfermedad (DAM), un fenotipo activado y protector asociado a la EA (Jonsson et al., 2013; Wang et al., 2015). Nuestros datos muestran un aumento de la intensidad de TREM2 y del porcentaje de la población TREM2^{high} en ratones P301S en comparación con ratones WT (Figura 72 C, D). Estos datos concuerdan con los obtenidos en estudios anteriores donde se observa también un aumento en la intensidad de TREM2 mediante citometría de flujo, aunque en este caso en ratones 5xFAD (McAlpine et al., 2021).

Finalmente, se analizaron los niveles de expresión de diferentes marcadores de activación microglial mediante RT-PCR (Figura 73). Los ratones P301S presentaron mayores niveles de expresión de Iba-1 y CX3CR1 respecto a los ratones WT, lo que concuerda con la detección de un mayor número de células de microglía presentes en los ratones P301S en comparación con los ratones WT. Mientras que el tratamiento con reboxetina presentó un efecto en los niveles de expresión de TREM2 (Figura 73 C) y una interacción con el genotipo en cuanto a los niveles de CX3CR1, donde el *post hoc* de Tukey desveló una disminución de los niveles de CX3CR1 en los ratones P301S tratados con reboxetina en comparación con los ratones P301S tratados con vehículo (Figura 73 D). Estos datos nos indican el papel de la reboxetina sobre la alteración de la reactividad glial. Estudios futuros de transcriptómica a nivel celular pueden ayudarnos a dilucidar el papel de la NA sobre el control de las células de microglía en

modelos de la EA. Además, futuros estudios deberán también evaluar los niveles proteicos de estos marcadores mediante otras técnicas tales como WB o técnicas de inmunotinción.

Efectos del tratamiento con reboxetina sobre la astrogliosis hipocampal en ratones P301S

Por otro lado, evaluamos el grado de astrogliosis mediante la tinción inmunohistoquímica de GFAP (Figura 75) y estudios de citometría de flujo (Figura 76, Figura 77). Los estudios mediante citometría de flujo nos permitieron detectar efectos del tratamiento con reboxetina en ratones P301S. En este caso, el tratamiento con reboxetina redujo la población de astrocitos (ACSA-2⁺) presente en el hipocampo de ratones P301S (Figura 76 B). Además, aunque no detectamos una diferencia en la intensidad de ACSA-2 en ratones P301S en comparación con ratones WT, si observamos un aumento en la población ACSA-2^{high} en los ratones P301S en comparación con los ratones WT (Figura 77 C, D).

Estos datos se confirmaron a través del estudio de los niveles de expresión de diferentes marcadores astrocíticos mediante RT-PCR, donde el tratamiento con reboxetina en ratones P301S disminuyó la expresión de GFAP y S100B (Figura 78 A, B). Estudios previos han demostrado el potencial de la NA en la regulación de la actividad de los astrocitos, especialmente se encuentra bien documentado el aumento de los niveles de calcio intracelular tras la activación de los receptores $\alpha 1$ adrenérgicos en astrocitos (revisado en Wahis & Holt, 2021). Otros estudios han demostrado que la señalización a través de los receptores adrenérgicos induce la formación de procesos en los astrocitos a través del incremento del AMPc intracelular, mientras que la señalización a través de los receptores $\alpha 1$ adrenérgicos presenta un efecto contrario inhibiendo la formación de procesos en los astrocitos (Kitano et al., 2021). Diferentes estudios sugieren que los déficits estructurales en los procesos que preceden a la astrogliosis reactiva pueden impulsar la progresión de la EA (revisado en Zhou et al., 2019). Aunque el estudio morfológico de las células de microglía es ampliamente utilizado por la comunidad científica, el extenso grado de solapamiento celular durante los procesos de astrogliosis entre otros factores dificulta el análisis morfológico de los astrocitos mediante estudios de inmunostiquímica. Sin embargo, sería de gran interés evaluar en futuros estudios la morfología de los astrocitos a través del uso de métodos previamente descritos (Bakota et al., 2014) con el fin de esclarecer los efectos de la reboxetina sobre la formación de procesos en los astrocitos en modelos murinos de la EA.

Efectos del tratamiento con reboxetina sobre los depósitos de tau y la pérdida neuronal en el hipocampo en ratones P301S

En cuanto a los depósitos de tau fosforilado en el hipocampo de ratones P301S, no observamos ningún efecto del tratamiento con reboxetina en cuanto a los niveles de AT8 determinados mediante inmunohistoquímica (Figura 80). Futuros estudios deberán incluir el análisis proteico de diferentes formas fosforiladas de tau, así como de tau total con el fin de calcular la relación entre tau fosforilado y tau total mediante técnicas bioquímicas tales como WB y ELISA. Además, la determinación de los niveles de activación de las diferentes enzimas implicadas en la fosforilación de tau mediante el cálculo de la relación entre la proteína fosforilada (forma activa) y la proteína total, podría ayudarnos a dilucidar los posibles efectos del tratamiento con reboxetina sobre la fosforilación de tau y la formación de depósitos

intraneuronales. En línea con esto, la neurodegeneración del LC en ratones P301S mediante el uso de la toxina DSP4 incrementó los depósitos de tau presentes en el hipocampo de ratones P301S (Termpanit Chalermpananupap et al., 2018). Sin embargo, un estudio reciente demuestra que el tratamiento con reboxetina eleva la fosforilación de tau en un modelo animal de EA basado en la expresión de la proteína tau mutante (P301L) (Koppel et al., 2019). Por lo tanto, aunque el tratamiento con reboxetina, así como otros moduladores del sistema noradrenérgico, han demostrado presentar un efecto beneficioso en cuanto a la reducción de los depósitos de amiloide, estudios futuros que evalúen los efectos de estos fármacos sobre los depósitos de tau son necesarios con el fin de dilucidar sus acciones beneficiosas o perjudiciales en los pacientes con EA.

En cuanto al potencial efecto neuroprotector de la NA, el tratamiento con reboxetina no redujo la pérdida neuronal presente en el hipocampo de los ratones P301S (Figura 81). Por otro lado, la falta de efectos de la reboxetina puede deberse a la gran pérdida neuronal que presentan los ratones P301S a la edad evaluada (10 meses de edad), sería necesario pues evaluar el tratamiento con reboxetina a edades más tempranas con el fin de observar si el tratamiento con reboxetina presenta un efecto neuroprotector, y determinar cuál sería la mejor ventana terapéutica para usar este tipo de fármacos en pacientes con EA. Además, futuros estudios que incluyan el análisis de los niveles proteicos de BDNF y otros factores neurotróficos sería de gran interés debido al conocido papel de la NA en la inducción de la expresión y síntesis de estos factores. De acuerdo con esto, la neurodegeneración del LC en ratones P301S mediante el uso de la toxina DSP4 incrementó la pérdida neuronal en el hipocampo de ratones P301S (Termpanit Chalermpananupap et al., 2018).

Finalmente, los resultados obtenidos tras el análisis de correlación ponen de manifiesto el papel de la reactividad glial y de la quimioquina CCL2 en la pérdida neuronal y el comportamiento de tipo hiperactivo (determinado mediante la velocidad demostrada en el laberinto en Y) presente en los ratones P301S (Figura 84). De acuerdo con estos datos, la sobreexpresión de la quimioquina CCL2 en el modelo murino de taupatía rTg4510, incrementó los depósitos de tau y la pérdida neuronal, a la vez que incrementó el estado inflamatorio y la reactividad glial (Joly-Amado et al., 2020). Teniendo en cuenta el papel de la NA en la regulación de los niveles de esta quimioquina, así como el papel que ejerce sobre la regulación de las células gliales, estos datos apoyan el potencial neuroprotector de la reboxetina y otros fármacos moduladores de la NA en pacientes con EA.

Efectos del tratamiento con reboxetina en la corteza frontal de ratones P301S

Finalmente, se analizaron los efectos del tratamiento con reboxetina en la corteza frontal, debido a la implicación de esta región cerebral en la EA y su control por parte de las innervaciones noradrenérgicas. En este sentido, esta región cerebral se encuentra levemente afectada en los ratones P301S [elevación de la expresión de IL1 β , MIP-1 α (Figura 66), y GFAP (Figura 79)] respecto a los ratones WT. El análisis *post hoc* de Tukey nos muestra que este aumento respecto a ratones WT se debe principalmente a la contribución del grupo P301S tratado con reboxetina. Aunque futuros estudios son necesarios, estos estudios indican que el tratamiento con reboxetina podría llegar a tener un breve efecto proinflamatorio en un contexto neuroinflamatorio leve. Sin embargo, el tratamiento con reboxetina en animales WT no tuvo ningún efecto, lo que nos confirma la ausencia de toxicidad de este fármaco en ratones sanos.

7.4 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON NORADRENALINA EN CÉLULAS DE MICROGLÍA DERIVADAS DE IPSCS HUMANAS

Recientemente, la identificación de genes de riesgo para la EA mediante el análisis de asociación de todo el genoma (GWAS), determinó que la mayoría de los genes implicados son específicos de las células de microglía, tales como: APOE, TREM2, BIN1, CD33, INPP5D, CTSB, CTSD y PICALM (Lambert et al., 2013). Estos datos sugieren que la respuesta celular aberrante durante la respuesta inflamatoria en el SNC tiene un papel clave en la patogénesis de la EA, y por tanto el control de las células de microglía constituye una interesante diana terapéutica para disminuir la progresión de esta enfermedad (Fangda Leng & Paul Edison, 2021). En este sentido, la NA producida por las neuronas noradrenérgicas del LC presenta un efecto antiinflamatorio y neuroprotector (Feinstein et al., 2016) principalmente debido a su capacidad para controlar las células gliales (Gyoneva & Traynelis, 2013; Liu et al., 2019). Los datos obtenidos en los apartados anteriores han puesto de manifiesto el potencial de la reboxetina para disminuir la neuroinflamación a través del control de la activación glial en los modelos murinos 5xFAD y P301S de la EA. Sin embargo, las células gliales humanas presentan importantes diferencias en su respuesta a la EA en comparación con las células gliales de otros animales (Chen & Colonna, 2021; J. Li et al., 2021; Mathys et al., 2019). En este caso, el uso de cultivos de células de microglía derivadas de iPSCs humanas nos permitió evaluar los de la NA en células humanas como primer paso para la validación de sus efectos antiinflamatorios previamente observados en rata y ratón.

Efecto del tratamiento con NA sobre la respuesta inflamatoria inducida por LPS

Las células de microglía expresan los receptores adrenérgicos $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\beta 2$; y diversos estudios han demostrado que la activación de estos receptores inhibe la respuesta inflamatoria en las células de microglía (Carnevale et al., 2007). Estudios de patch-clamp han demostrado que la NA puede modular directamente las corrientes de membrana en células microgliales suprimiendo la liberación de citoquinas inflamatorias (Färber et al., 2005). En cultivos primarios de microglía de rata, los agonistas de los receptores $\beta 2$ y $\alpha 1$ adrenérgicos suprimen la expresión y liberación de IL6 y TNF α , así como la producción de NO (Mori et al., 2002). La expresión de diferentes mediadores inflamatorios (como TNF α , COX2, IFN γ , CCL2, IL1 β e IL8) son suprimidos por la NA y por el agonista β adrenérgico no selectivo, el isoproterenol, en cultivos primarios de microglía de ratón (Heneka et al., 2010; McNamee, Ryan, Kilroy, et al., 2010). Estas acciones antiinflamatorias de la NA parecen estar mediadas principalmente a través de los receptores $\beta 2$ adrenérgicos y el aumento de AMPc que inhibe la traslocación al núcleo de NF κ B (Feinstein et al., 2002; Kato et al., 2013), uno de los factores más relevantes en la respuesta inflamatoria debido a su papel regulador clave para numerosos genes implicados en la progresión de la inflamación. Sin embargo, otros estudios han demostrado que la NA aumenta la secreción de IL1 β mediada por A β a través de la acción en los receptores β adrenérgicos en macrófagos (Yang et al., 2012). La NA también aumenta la producción de la COX2 y la PGE2 inducida por LPS a través de los receptores β adrenérgicos en cultivos primarios de microglía de rata (Schlachetzki et al., 2010). En su conjunto, estos resultados ponen de manifiesto un papel dual de la NA, como supresora o facilitadora de la respuesta inflamatoria.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con LPS y ATP en células de microglía derivadas de iPSCs humanas induce la liberación de la IL1 β al medio de cultivo, mientras que el pretratamiento con suero fetal bovino incrementa la respuesta inflamatoria de las células de microglía (Figura 87). Estos datos concuerdan con los observados en estudios anteriores donde la presencia de suero en el medio de cultivo promueve un estado más reactivo en las células de microglía (Bohlen et al., 2017; van Rees et al., 2018). En cultivos libres de suero, la NA incrementó la liberación de la IL1 β inducida por el tratamiento con LPS y ATP, mientras que en presencia de suero la NA presentó un efecto opuesto disminuyendo los niveles de IL1 β liberados al medio de cultivos (Figura 87). Estos datos apoyan la hipótesis del papel dual de la NA en el control de la respuesta inflamatoria microglial. Futuros estudios deberán incluir el análisis de otros marcadores inflamatorios en el medio de cultivo, así como estudios de expresión genética y transcriptómica para comprender mejor el papel dual de la NA en el control de la inflamación, y el potencial terapéutico de los fármacos moduladores de la NA en la EA.

Efecto del tratamiento con NA sobre la capacidad fagocítica de las células de microglía derivadas de iPSCs humanas

Varios estudios han demostrado que la NA promueve la fagocitosis del péptido A β 42 en cultivos microgliales primarios murinos, a través de la activación de los receptores β 2 adrenérgicos (Heneka et al., 2010; Kong et al., 2010). La activación de los receptores β 2 adrenérgicos por la NA o el isoproterenol aumenta la expresión del receptor de A β FPR2 y de la enzima degradadora de insulina (IDE) implicada en la degradación de A β , a través de la activación de las vías de señalización ERK1/2-NF κ B y p38-NF κ B (Kong et al., 2010). Estos resultados sugieren que la inervación noradrenérgica del LC es necesaria para mantener una adecuada captación y eliminación de A β por las células de microglía. Sin embargo, estudios *in vitro* demostraron que la adición del agonista β adrenérgico isoproterenol o la elevación del AMPc intracelular suprimen la fagocitosis en cultivos microgliales primarios de rata (Steininger et al., 2011). La validación de estos resultados en modelos humanos es necesaria con el fin de esclarecer los efectos de la NA sobre la capacidad fagocítica de las células de microglía.

En este sentido, en nuestras condiciones experimentales no observamos un efecto de la NA sobre la fagocitosis de A β o las biopartículas utilizadas en cultivos de microglía derivadas de iPSCs humanas (Figura 88, Figura 89). Sin embargo, una de las limitaciones de este estudio es la evaluación de la fagocitosis durante 3 horas, el estudio durante mayores periodos de tiempo puede ayudarnos a dilucidar los posibles efectos de la NA sobre la capacidad fagocítica de la microglía. Además, hay que tener en cuenta que las diferencias en las condiciones experimentales utilizadas (concentraciones de los reactivos, tipo de medio de cultivo, etc.) entre nuestros estudios y los mencionados con anterioridad pueden dar cuenta de la divergencia de resultados.

Los efectos de la NA sobre las células de microglía parecen depender del estado de activación de estas células que puede afectar a los niveles de expresión de los receptores adrenérgicos o incluso las vías de señalización a las que se encuentren acoplados dando lugar a diferentes resultados. En este sentido, mientras que los cultivos de microglía primarios de rata o ratón suelen incluir suero en el medio de cultivo, los medios definidos utilizados en los cultivos de células de microglía derivadas de iPSCs humanas difieren en ocasiones en su composición. La presencia de suero promueve la reactividad de las células gliales y el proceso de

fagocitosis (Bohlen et al., 2017), por lo que su presencia o ausencia en el medio de cultivo, así como de otros factores, podría afectar a los efectos de la NA sobre las células de microglía. En este sentido, estudios anteriores han observado que el uso de medios enriquecidos con suero disminuye la expresión de los receptores β adrenérgicos en cultivos gliales de rata en comparación con el uso de medios libres de suero (Dibner & Insel, 1981; Dibner et al., 1981). Por tanto, futuros estudios que evalúen la capacidad fagocítica de las células de microglía derivadas de iPSCs humanas deberán tener en cuenta estos factores con el fin de esclarecer los efectos de la NA sobre el control de la capacidad fagocítica de estas células, y su potencial terapéutico en la EA.

7.5 DISCUSIÓN GENERAL, LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

7.5.1 Discusión general

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia en todo el mundo y tiene enormes implicaciones para los pacientes y la sociedad (Scheltens et al., 2021). Se prevé que su prevalencia aumente exponencialmente en los próximos años y aún no existen tratamientos eficaces que modifiquen el curso de la enfermedad (Tatulian, 2022; Yu et al., 2021). Por ello, la EA está reconocida por la OMS como una prioridad de salud pública mundial. Durante los últimos años, los grandes esfuerzos realizados por la comunidad científica han permitido avanzar en el conocimiento de la fisiopatología de esta devastadora enfermedad neurodegenerativa. Las investigaciones llevadas a cabo durante los últimos años ponen de manifiesto el papel central de la respuesta celular aberrante, particularmente de las células gliales, en la fisiopatología de la EA (De Strooper & Karran, 2016). Por otro lado, diversos estudios han demostrado la existencia de una pérdida temprana de neuronas noradrenérgicas en el LC y de la inervación noradrenérgica en las diferentes regiones cerebrales en la EA, lo que conlleva una compleja desregulación del sistema noradrenérgico (revisado en Beardmore et al., 2021). Teniendo en cuenta el papel de la NA en el control de la respuesta inflamatoria y la actividad de las células gliales, se ha planteado la hipótesis de que la alteración del sistema noradrenérgico y de los niveles cerebrales de NA que tiene lugar en la EA podría contribuir o incluso ser responsable de la neuroinflamación crónica y la sobreactivación glial que contribuyen a la patogénesis y progresión de la EA; y por lo tanto, el restablecimiento de una adecuada señalización noradrenérgica podría representar una potencial estrategia terapéutica para reducir la progresión de esta enfermedad (Chen et al., 2022).

Actualmente, tres fármacos moduladores de la actividad noradrenérgica se encuentran en ensayos clínicos para la EA (revisado en Cummings et al., 2022). El más avanzado es la guanfacina, agonista del receptor α_2 adrenérgico, el cual se encuentra en fase clínica 3 (NCT03116126). Por otro lado, en fase clínica 2, se encuentran el compuesto CST-2032 (NCT05104463), agonista adrenérgico, y la prazosina, antagonista α_1 (NCT03710642). Mientras que se está evaluando el potencial terapéutico de la guanfacina y el CST-2032 como potenciadores cognitivos, la prazosina se está estudiando por su potencial farmacológico para el tratamiento de la agitación en pacientes con EA (L. Y. Wang et al., 2009). En esta línea, el metilfenidato, un inhibidor de la recaptación de noradrenalina-dopamina (NDRI), ha demostrado mejorar la apatía y la atención en los pacientes con EA (Mintzer et al., 2021). Sin

embargo, hasta la fecha prácticamente no se ha estudiado el potencial de los fármacos moduladores de la NA como modificadores de la EA.

En este sentido, nuestros datos han demostrado el potencial terapéutico de la reboxetina para reducir la progresión de la EA en modelos animales tales como el modelo murino de amiloidosis 5xFAD y el modelo murino de taupatía P301S, así como la implicación de la quimioquina CCL2 en la neuroinflamación presente en estos modelos animales. Estos datos, junto con los obtenidos por otros grupos de investigación apoyan el potencial de los fármacos moduladores de los niveles cerebrales de NA (Matchett et al., 2021), no solo como potenciadores cognitivos y para el tratamiento de síntomas neuropsiquiátricos, sino también como moduladores de la enfermedad pudiendo actuar sobre la neuroinflamación y la reactividad glial, así como los propios depósitos de A β y tau que juegan un papel central en la patología de la EA.

No obstante, la mayoría de los mecanismos moleculares a través de los cuales la NA controla los procesos neuroinflamatorios y neurodegenerativos derivan de modelos animales. Mientras que en los últimos años se ha demostrado que las células de microglía humanas presentan grandes diferencias en su respuesta a la EA en comparación con las células de microglía murinas (Chen & Colonna, 2021). Recientemente, la tecnología de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) ha cambiado el panorama de la investigación preclínica, y las células derivadas de iPSCs se han utilizado ampliamente como plataforma para modelizar distintas enfermedades humanas, incluidas las neurodegenerativas. Investigaciones pioneras sugieren el notable potencial de esta tecnología de vanguardia para la generación de modelos de la EA (Abud et al., 2017; J. Penney et al., 2020). En nuestros estudios realizados en células de microglía derivadas en iPSCs humanas observamos un efecto dual de la NA respecto al control de la respuesta inflamatoria microglial. Estos datos apoyan la hipótesis de que la NA puede reducir o promover la actividad glial en función del contexto neuroinflamatorio (Barnard et al., 2019). Lo que podría explicar por qué tanto la inducción de la señalización noradrenérgica, como su bloqueo a través del uso de betabloqueantes principalmente, muestren efectos beneficiosos; y por lo tanto, se requiere una caracterización previa que aclare el papel de las disfunciones del sistema noradrenérgico a lo largo de la progresión de la EA, con el fin de arrojar luz sobre cuáles son las mejores ventanas terapéuticas, así como qué tipo de fármacos serían más efectivos para disminuir la progresión de la EA.

Sin embargo, estudios recientes han demostrado que el tratamiento con atomoxetina en pacientes con deterioro cognitivo leve (DCL) reduce los niveles de tau y tau fosforilado y normaliza los biomarcadores de la función sináptica, el metabolismo cerebral y la reactividad glial en el LCR, mientras que aumenta la actividad cerebral y el metabolismo en circuitos cerebrales clave en la fisiopatología de la EA (Levey et al., 2022). Estos datos aportan esperanza al potencial terapéutico de este tipo de fármacos, y abren un nuevo campo de investigación lleno de futuras promesas.

7.5.2 Limitaciones

A pesar de las contribuciones de nuestros resultados al área de la investigación de la EA, nuestra investigación presenta diferentes limitaciones que debemos señalar.

En primer lugar, el uso de modelos animales que tan solo recapitulan algunos de los aspectos de la patología de la EA presenta una de las limitaciones de este estudio. Aunque los estudios

a nivel preclínico pueden ayudarnos a recopilar información de gran valor con el fin de ayudarnos a orientar los ensayos clínicos futuros, y validar el potencial terapéutico de los fármacos moduladores de la NA en humanos, la mayoría de las terapias prometedoras con eficacia demostrada en modelos animales de la EA no presentaron beneficios clínicos en pacientes (Asher & Priefer, 2022). En parte, esta elevada tasa de fracaso se debe a la traslación prematura de resultados muy satisfactorios obtenidos en modelos animales que sólo reflejan aspectos limitados de la patología de la EA (Drummond & Wisniewski, 2017; Tatulian, 2022). Por lo tanto, a pesar de que el tratamiento con reboxetina, y otros moduladores de la señalización noradrenérgica, han conseguido reducir la patología presente en modelos animales de la EA, puede que no tengan los efectos deseados en humanos, y por lo tanto futuros estudios son necesarios para evaluar su eficacia terapéutica en la EA. En este sentido, dado que los modelos actuales de EA en ratones incorporan con frecuencia mutaciones causantes de la enfermedad en uno o más genes asociados a demencias autosómicas dominantes, y que los productos génicos se expresan a menudo a niveles superiores a los fisiológicos, en los últimos años se han comenzado a desarrollar nuevos modelos murinos que recapitulan mejor las vías moleculares subyacentes que conducen a la EA esporádica de aparición tardía (Baglietto-Vargas et al., 2021; L. Zhang et al., 2020). Además, la composición genética del individuo desempeña un papel importante en el desarrollo de la EA, pero no se tiene en cuenta en los actuales estudios preclínicos. En la actualidad se han desarrollado modelos murinos que incorporan la diversidad genética, lo que podría mejorar el potencial traslacional de estos modelos experimentales (Neuner et al., 2019).

Otra de las limitaciones de estos modelos animales, que afecta a nuestro estudio, es que no recapitulan todas las alteraciones del sistema noradrenérgico presentes en pacientes con EA (revisado en Gannon et al., 2015). Sin embargo, modelos animales transgénicos para APP presentaron una reducción en los niveles de NA cerebrales y de las proyecciones noradrenérgicas (revisado en Weinshenker, 2018), y los ratones P301S de 10 meses de edad presentaron una reducción significativa de los niveles de NA en el hipocampo y de las neuronas noradrenérgicas en el LC en comparación con ratones WT (T. Chalermpananupap et al., 2018). Futuros estudios que incluyan una caracterización de las alteraciones del sistema noradrenérgico en los modelos animales de la EA pueden ayudarnos a obtener una mejor comprensión del efecto de los fármacos moduladores de la NA en la EA. En este sentido, sería interesante utilizar estudios de pupilometría que evalúen los cambios en el diámetro pupilar en modelos animales de la EA, ya que estos pueden reflejar la actividad neuronal del LC (Lara-Doña et al., 2021), y su uso se ha evaluado en pacientes con deterioro cognitivo leve (DCL) y EA (Elman et al., 2017).

Por otro lado, el uso de animales de sexo masculino en todos nuestros experimentos supone una limitación en nuestro estudio. Futuros estudios que evalúen la eficacia de estos tratamientos en hembras son imprescindibles para poder evaluar la eficacia terapéutica de estos fármacos en la EA. En los últimos años, diversos estudios han demostrado la existencia de diferencias relacionadas con el sexo en la anatomía y la función neuronal (Ingalthalika et al., 2014; Li & Singh, 2014; Ruigrok et al., 2014). Las mujeres presentan un mayor riesgo de desarrollar la EA, y el sexo podría constituir un factor importante para la estratificación de los pacientes con EA y el tratamiento personalizado (Ferretti et al., 2018; Mielke, 2018). Los modelos animales de la EA también han demostrado un dimorfismo sexual en cuanto a la

fisiopatología de la EA, que coincide con los datos humanos (Drummond & Wisniewski, 2017; Sil et al., 2022). Además, el sistema noradrenérgico presenta importantes diferencias entre sexos (Bangasser et al., 2016; Mulvey et al., 2018), la cual podría influir en las alteraciones del sistema noradrenérgico presentes en los pacientes de la EA, así como a la eficacia terapéutica de los fármacos relacionados con el sistema noradrenérgico. Por lo tanto, futuros estudios que evalúen la eficacia de la reboxetina, y otros tratamientos similares, en ambos sexos y determinen los perfiles moleculares diferenciales entre ratones macho y hembra ofrecerán información de gran relevancia sobre posibles mecanismos de protección y, por tanto, potenciales estrategias terapéuticas para la EA.

Además, uno de los principales objetivos de los tratamientos para la EA es la mejora y/o prevención de la disfunción cognitiva, y por ello, el uso de pruebas comportamentales que evalúen los diferentes dominios cognitivos afectados en la EA, tales como el aprendizaje y la memoria, en los modelos animales son imprescindibles para evaluar el potencial terapéutico de diferentes estrategias farmacológicas. La ausencia de una extensa batería comportamental en nuestro estudio es otra de sus limitaciones. Sin embargo, es importante tener en cuenta que las pruebas comportamentales en roedores no dejan de ser análogos incompletos de la cognición humana, y por tanto una limitación clave es que muchas funciones cognitivas son exclusivas de los humanos o no pueden medirse adecuadamente en modelos experimentales (Puzzo et al., 2014). De hecho, estas diferencias podrían contribuir también a la alta tasa de fracasos de ensayos clínicos con fármacos que mostraban una eficacia prometedora en tareas conductuales preclínicas. Sin embargo, los modelos animales siguen siendo esenciales para acceder a la patología de la EA *in vivo* y probar estrategias terapéuticas.

Finalmente, a pesar de que el uso de cultivos de microglía derivadas de iPSCs humanas presentan ciertas ventajas con respecto al uso de modelos animales, estas no reproducen completamente el comportamiento de la microglía humana *in vivo* (de Leeuw & Tackenberg, 2019). Además, en la actualidad algunas de las limitaciones de esta tecnología incluyen problemas de reproducibilidad debido a las diferencias en los protocolos de diferenciación utilizados, así como la composición final de los medios de cultivo utilizados (Speicher et al., 2019). Por lo tanto, los efectos de la NA observados en nuestras condiciones experimentales puede que varíen en función del protocolo de diferenciación utilizado y la composición del medio de cultivo. Futuros estudios deberán tener en cuenta estas variables con el fin de dilucidar los efectos de la NA sobre el control de las células gliales humanas.

7.5.3 Perspectivas futuras

Los datos presentados en esta tesis doctoral junto con otros estudios preclínicos demuestran que el restablecimiento de la función de la NA tiene un gran potencial para ralentizar la neurodegeneración en la EA debido a su efecto neuroprotector y antiinflamatorio. Sin embargo, la complejidad de la señalización de la NA y la multiplicidad de efectos de los subtipos de receptores adrenérgicos, junto con las limitaciones de los estudios en animales e *in vitro*, subrayan la importancia de trasladar estos estudios a los seres humanos. Dentro de los retos futuros en el campo de la investigación del sistema noradrenérgico en la EA cabe destacar los siguientes:

1) *Neurodegeneración del LC en la EA:*

- ¿Es la degeneración del LC un evento temprano característico de la EA, o tan solo de un subgrupo de pacientes? ¿Existen diferencias relacionadas con el sexo?
- ¿Cómo evolucionan las alteraciones del sistema noradrenérgico a lo largo de la progresión de la EA?

La eficacia de los fármacos moduladores del sistema noradrenérgico va a depender de las alteraciones de este sistema presentes en los pacientes con EA, por lo que futuros estudios que caractericen estas alteraciones a lo largo de la progresión de la EA son necesarios. Por otro lado, la degeneración del LC podría utilizarse como un biomarcador temprano para el diagnóstico y seguimiento de la EA, y las terapias neuroprotectoras del LC centradas en prevenir su degeneración y/o promover la señalización noradrenérgica podrían constituir una estrategia terapéutica eficaz para combatir la progresión de la patología y la demencia en la EA (Termpanit Chalermpanupap et al., 2013).

2) *Mecanismos moleculares de acción de la NA:*

- ¿Cómo influye la composición genética de un individuo en los efectos de la NA?
- ¿Cómo influyen la presencia de variantes genéticas, que constituyen factores de riesgo para la EA (TREM2, APOE4, etc.), en los efectos de la NA sobre las células gliales?

Ahondar en los mecanismos de acción de la NA puede ayudarnos a comprender mejor el potencial terapéutico de los fármacos que actúan sobre el sistema noradrenérgico, y avanzar hacia una medicina personalizada. En este sentido, el uso de células derivadas de iPSCs humanas en cocultivos con otros tipos de células del SNC y organoides cerebrales humanos, así como el uso de xenotrasplantes en modelos de ratón inmunodeficientes y humanizados, son cruciales para la concepción de estudios traslacionales (Eme-Scolan & Dando, 2020).

3) *Fármacos moduladores del sistema noradrenérgico en la EA:*

- ¿Qué pacientes responden a los fármacos moduladores de la NA?
- ¿Cuál es la mejor ventana terapéutica para la administración de fármacos moduladores del sistema noradrenérgico?
- ¿Qué tipo de fármaco es el más efectivo en los pacientes con EA? ¿Se necesitan diferentes estrategias farmacológicas según el paciente y el estadio de la enfermedad?

La disponibilidad de fármacos clínicamente aprobados que reestablecen la función noradrenérgica central brinda una oportunidad única para reorientar su uso con el fin de determinar su potencial como nueva estrategia terapéutica modificadora de la EA. Pero todavía necesitamos encontrar respuestas a estos retos futuros con el fin de obtener terapias eficaces que mejoren la calidad de vida de aquellos pacientes que sufren de esta devastadora enfermedad.

CONCLUSIONS

8 CONCLUSIONS

The results obtained in this doctoral thesis allow us to conclude the following.

- Treatment of 6 months old 5xFAD mice with reboxetine reduces inflammation, astrocyte reactivity, amyloid burden, axonal damage, and cell death in the frontal cortex.
- CCL2 genetic suppression in 6 months old 5xFAD mice reduces the spatial memory impairments (measured by Y maze behavioral test), inflammation, astrocyte reactivity, amyloid burden, axonal damage, and cell death in the frontal cortex.
- Treatment of 6 months old 5xFAD/CCL2KO mice with reboxetine reduces the expression of MIP-1 α and the accumulation of A β peptides in the frontal cortex.
- CCL2 genetic suppression in 6 months old WT mice increase the inflammation, astrocyte reactivity, axonal damage, and cellular death. Therefore, CCL2 genetic removal has a deleterious effect in the absence of other stimuli.
- 6 months old 5xFAD/CCL2KO mice present higher expression levels of the pro-resolving mediators FPR2, 15-LOX, and 5-LOX in the frontal cortex. This could be involved in the lower grade of inflammation present in the frontal cortex of 5xFAD/CCL2KO mice.
- CCL2 inhibits the RvD1 pathway induced by LPS treatment in primary cultures of rat astrocytes, and potentiates the inflammatory response induced by LPS.
- CCL2 inhibits the anti-inflammatory effect of RvD1 treatment in primary cultures of rat astrocytes. Therefore, the CCL2 potentiation of inflammatory response could be, at least in part, due to the inhibition of the resolution of inflammation process in astrocytes.
- Treatment of 10 months old P301S mice with reboxetine reduces the glial reactivity in the hippocampus but does not affect tau deposits and neuronal loss.
- Noradrenaline treatment potentiates the inflammatory response induced by LPS and ATP treatment in human iPSCs-derived microglia cultures. However, noradrenaline decreases the inflammatory response induced by LPS and ATP treatment in the presence of fetal bovine serum. Therefore, noradrenaline seems to have a dual role in the regulation of the inflammatory response at least in our experimental conditions.
- Noradrenaline treatment does not show any effect in the phagocytic capacity of human iPSCs-derived microglia cells at least in our experimental conditions.

Altogether, our results demonstrate that CCL2 plays an important role in the pathogenesis of 5xFAD and P310S mouse models of Alzheimer's disease, and that reboxetine treatment could be considered as a potential pharmacological tool to decrease the pathogenesis of Alzheimer's disease through the reduction of chronic inflammation and glial overactivation.

BIBLIOGRAFÍA

9 BIBLIOGRAFÍA

- 2022 Alzheimer's disease facts and figures. (2022a). *Alzheimers Dement*, 18(4), 700-789. <https://doi.org/10.1002/alz.12638>
- 2022 Alzheimer's disease facts and figures. (2022b). *Alzheimer's & Dementia*, 18(4), 700-789. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/alz.12638>
- Aberg, N. D., Brywe, K. G., & Isgaard, J. (2006). Aspects of growth hormone and insulin-like growth factor-I related to neuroprotection, regeneration, and functional plasticity in the adult brain. *ScientificWorldJournal*, 6, 53-80. <https://doi.org/10.1100/tsw.2006.22>
- Abud, E. M., Ramirez, R. N., Martinez, E. S., Healy, L. M., Nguyen, C. H. H., Newman, S. A., Yeromin, A. V., Scarfone, V. M., Marsh, S. E., Fimbres, C., Caraway, C. A., Fote, G. M., Madany, A. M., Agrawal, A., Kayed, R., Gyls, K. H., Cahalan, M. D., Cummings, B. J., Antel, J. P., . . . Blurton-Jones, M. (2017). iPSC-Derived Human Microglia-like Cells to Study Neurological Diseases. *Neuron*, 94(2), 278-293.e279. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.03.042>
- Agnati, L. F., Bjelke, B., & Fuxe, K. (1995). Volume versus wiring transmission in the brain: a new theoretical frame for neuropsychopharmacology. *Med Res Rev*, 15(1), 33-45. <https://doi.org/10.1002/med.2610150104>
- Alafuzoff, I., Arzberger, T., Al-Sarraj, S., Bodi, I., Bogdanovic, N., Braak, H., Bugiani, O., Del-Tredici, K., Ferrer, I., Gelpi, E., Giaccone, G., Graeber, M. B., Ince, P., Kamphorst, W., King, A., Korkolopoulou, P., Kovacs, G. G., Larionov, S., Meyronet, D., . . . Kretschmar, H. (2008). Staging of neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease: a study of the BrainNet Europe Consortium. *Brain Pathol*, 18(4), 484-496. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2008.00147.x>
- Allen, N. J. (2014). Astrocyte regulation of synaptic behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30, 439-463. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013053>
- Allison, S. L., Fagan, A. M., Morris, J. C., & Head, D. (2016). Spatial Navigation in Preclinical Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 52(1), 77-90. <https://doi.org/10.3233/jad-150855>
- Alzheimer, A., Stelzmann, R. A., Schnitzlein, H. N., & Murtagh, F. R. (1995). An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde". *Clin Anat*, 8(6), 429-431. <https://doi.org/10.1002/ca.980080612>
- Ambrosini, E., & Aloisi, F. (2004). Chemokines and glial cells: a complex network in the central nervous system. *Neurochem Res*, 29(5), 1017-1038. <https://doi.org/10.1023/b:nere.0000021246.96864.89>
- Amor, S., Peferoen, L. A., Vogel, D. Y., Breur, M., van der Valk, P., Baker, D., & van Noort, J. M. (2014). Inflammation in neurodegenerative diseases--an update. *Immunology*, 142(2), 151-166. <https://doi.org/10.1111/imm.12233>
- Apicco, D. J., Ash, P. E. A., Maziuk, B., LeBlang, C., Medalla, M., Al Abdullatif, A., Ferragud, A., Botelho, E., Ballance, H. I., Dhawan, U., Boudeau, S., Cruz, A. L., Kashy, D., Wong, A., Goldberg, L. R., Yazdani, N., Zhang, C., Ung, C. Y., Tripodis, Y., . . . Wolozin, B. (2018). Reducing the RNA binding protein TIA1 protects against tau-mediated neurodegeneration in vivo. *Nat Neurosci*, 21(1), 72-80. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0022-z>
- Appleby, B. S., Nacopoulos, D., Milano, N., Zhong, K., & Cummings, J. L. (2013). A review: treatment of Alzheimer's disease discovered in repurposed agents. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 35(1-2), 1-22. <https://doi.org/10.1159/000345791>
- Arai, H., Kosaka, K., & Iizuka, R. (1984). Changes of biogenic amines and their metabolites in postmortem brains from patients with Alzheimer-type dementia. *J Neurochem*, 43(2), 388-393. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1984.tb00913.x>

- Arai, Y., Yamazaki, M., Mori, O., Muramatsu, H., Asano, G., & Katayama, Y. (2001). Alpha-synuclein-positive structures in cases with sporadic Alzheimer's disease: morphology and its relationship to tau aggregation. *Brain Res*, *888*(2), 287-296. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)03082-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)03082-1)
- Arendt, T. (2009). Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, *118*(1), 167-179. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0536-x>
- Arendt, T., Brückner, M. K., Morawski, M., Jäger, C., & Gertz, H. J. (2015). Early neurone loss in Alzheimer's disease: cortical or subcortical? *Acta Neuropathol Commun*, *3*, 10. <https://doi.org/10.1186/s40478-015-0187-1>
- Arnold, S. E., Arvanitakis, Z., Macauley-Rambach, S. L., Koenig, A. M., Wang, H. Y., Ahima, R. S., Craft, S., Gandy, S., Buettner, C., Stoekel, L. E., Holtzman, D. M., & Nathan, D. M. (2018). Brain insulin resistance in type 2 diabetes and Alzheimer disease: concepts and conundrums. *Nat Rev Neurol*, *14*(3), 168-181. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.185>
- Arnsten, A. F. (2006). Fundamentals of attention-deficit/hyperactivity disorder: circuits and pathways. *J Clin Psychiatry*, *67 Suppl 8*, 7-12.
- Asher, S., & Priefer, R. (2022). Alzheimer's disease failed clinical trials. *Life Sci*, *306*, 120861. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120861>
- Ashraf, G. M., Tarasov, V. V., Makhmutova, A., Chubarev, V. N., Avila-Rodriguez, M., Bachurin, S. O., & Aliev, G. (2019). The Possibility of an Infectious Etiology of Alzheimer Disease. *Mol Neurobiol*, *56*(6), 4479-4491. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1388-y>
- Aston-Jones, G., Rajkowski, J., & Cohen, J. (1999). Role of locus coeruleus in attention and behavioral flexibility. *Biol Psychiatry*, *46*(9), 1309-1320. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(99\)00140-7](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(99)00140-7)
- Atsmon-Raz, Y., & Miller, Y. (2016). Non-Amyloid- β Component of Human α -Synuclein Oligomers Induces Formation of New A β Oligomers: Insight into the Mechanisms That Link Parkinson's and Alzheimer's Diseases. *ACS Chem Neurosci*, *7*(1), 46-55. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.5b00204>
- Attems, J., & Jellinger, K. A. (2014). The overlap between vascular disease and Alzheimer's disease--lessons from pathology. *BMC Med*, *12*, 206. <https://doi.org/10.1186/s12916-014-0206-2>
- Atzori, M., Cuevas-Olguin, R., Esquivel-Rendon, E., Garcia-Oscos, F., Salgado-Delgado, R. C., Sadari, N., Miranda-Morales, M., Treviño, M., Pineda, J. C., & Salgado, H. (2016). Locus Ceruleus Norepinephrine Release: A Central Regulator of CNS Spatio-Temporal Activation? *Front Synaptic Neurosci*, *8*, 25. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2016.00025>
- Austin, S. A., Santhanam, A. V., Hinton, D. J., Choi, D. S., & Katusic, Z. S. (2013). Endothelial nitric oxide deficiency promotes Alzheimer's disease pathology. *J Neurochem*, *127*(5), 691-700. <https://doi.org/10.1111/jnc.12334>
- Azizi, G., Khannazer, N., & Mirshafiey, A. (2014). The Potential Role of Chemokines in Alzheimer's Disease Pathogenesis. *Am J Alzheimers Dis Other Dement*, *29*(5), 415-425. <https://doi.org/10.1177/1533317513518651>
- Bacon, K., Baggiolini, M., Broxmeyer, H., Horuk, R., Lindley, I., Mantovani, A., Maysushima, K., Murphy, P., Nomiya, H., Oppenheim, J., Rot, A., Schall, T., Tsang, M., Thorpe, R., Van Damme, J., Wadhwa, M., Yoshie, O., Zlotnik, A., & Zoon, K. (2002). Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Interferon Cytokine Res*, *22*(10), 1067-1068. <https://doi.org/10.1089/107999002760624305>
- Baglietto-Vargas, D., Forner, S., Cai, L., Martini, A. C., Trujillo-Estrada, L., Swarup, V., Nguyen, M. M. T., Do Huynh, K., Javonillo, D. I., Tran, K. M., Phan, J., Jiang, S., Kramár, E. A., Nuñez-Díaz, C., Balderrama-Gutierrez, G., Garcia, F., Childs, J., Rodriguez-Ortiz, C. J., Garcia-Leon, J. A., . . . LaFerla, F. M. (2021). Generation of a humanized A β expressing mouse demonstrating aspects of Alzheimer's disease-like pathology. *Nat Commun*, *12*(1), 2421. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22624-z>
- Bakota, L., Brandt, R., & Jakobs, T. (2014). Analysis of Morphology and Structural Remodeling of Astrocytes. In. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0381-8_6

- Balez, R., & Ooi, L. (2016). Getting to NO Alzheimer's Disease: Neuroprotection versus Neurotoxicity Mediated by Nitric Oxide. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 3806157. <https://doi.org/10.1155/2016/3806157>
- Bang, J., Spina, S., & Miller, B. L. (2015). Frontotemporal dementia. *The Lancet*, 386(10004), 1672-1682. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00461-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00461-4)
- Bangasser, D. A., Wiersielis, K. R., & Khantsis, S. (2016). Sex differences in the locus coeruleus-norepinephrine system and its regulation by stress. *Brain Res*, 1641(Pt B), 177-188. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.11.021>
- Banisadr, G., Gosselin, R. D., Mechighel, P., Kitabgi, P., Rostène, W., & Parsadaniantz, S. M. (2005). Highly regionalized neuronal expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) in rat brain: evidence for its colocalization with neurotransmitters and neuropeptides. *J Comp Neurol*, 489(3), 275-292. <https://doi.org/10.1002/cne.20598>
- Banisadr, G., Gosselin, R. D., Mechighel, P., Rostène, W., Kitabgi, P., & Mélik Parsadaniantz, S. (2005). Constitutive neuronal expression of CCR2 chemokine receptor and its colocalization with neurotransmitters in normal rat brain: functional effect of MCP-1/CCL2 on calcium mobilization in primary cultured neurons. *J Comp Neurol*, 492(2), 178-192. <https://doi.org/10.1002/cne.20729>
- 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. *J Neurochem*, 81(2), 257-269. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00809.x>
- Barage, S. H., & Sonawane, K. D. (2015). Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*, 52, 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.06.008>
- Barghorn, S., Nimmrich, V., Striebinger, A., Krantz, C., Keller, P., Janson, B., Bahr, M., Schmidt, M., Bitner, R. S., Harlan, J., Barlow, E., Ebert, U., & Hillen, H. (2005). Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 95(3), 834-847. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03407.x>
- Barkhatova, V. P., Zavalishin, I. A., Askarova, L., Shavratskii, V., & Demina, E. G. (1998). Changes in neurotransmitters in multiple sclerosis. *Neurosci Behav Physiol*, 28(4), 341-344. <https://doi.org/10.1007/BF02464784>
- Barnard, D. F., Gabella, K. M., Kulp, A. C., Parker, A. D., Dugan, P. B., & Johnson, J. D. (2019). Sex differences in the regulation of brain IL-1 β in response to chronic stress. *Psychoneuroendocrinology*, 103, 203-211. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.01.026>
- Baron, P., Bussini, S., Cardin, V., Corbo, M., Conti, G., Galimberti, D., Scarpini, E., Bresolin, N., Wharton, S. B., Shaw, P. J., & Silani, V. (2005). Production of monocyte chemoattractant protein-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve*, 32(4), 541-544. <https://doi.org/10.1002/mus.20376>
- Barry, A. E., Klyubin, I., Mc Donald, J. M., Mably, A. J., Farrell, M. A., Scott, M., Walsh, D. M., & Rowan, M. J. (2011). Alzheimer's disease brain-derived amyloid- β -mediated inhibition of LTP in vivo is prevented by immunotargeting cellular prion protein. *J Neurosci*, 31(20), 7259-7263. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.6500-10.2011>
- Beach, T. G., Kuo, Y. M., Spiegel, K., Emmerling, M. R., Sue, L. I., Kokjohn, K., & Roher, A. E. (2000). The cholinergic deficit coincides with A β deposition at the earliest histopathologic stages of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 59(4), 308-313. <https://doi.org/10.1093/jnen/59.4.308>
- Beaman, E. E., Bonde, A. N., Ulv Larsen, S. M., Ozenne, B., Lohela, T. J., Nedergaard, M., Gislason, G. H., Knudsen, G. M., & Holst, S. C. (2022). Blood-brain barrier permeable beta-blockers linked to lower risk of Alzheimer's disease in hypertension. *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/awac076>

- Beardmore, R., Hou, R., Darekar, A., Holmes, C., & Boche, D. (2021). The Locus Coeruleus in Aging and Alzheimer's Disease: A Postmortem and Brain Imaging Review. *J Alzheimers Dis*, 83(1), 5-22. <https://doi.org/10.3233/jad-210191>
- Behl, T., Kaur, I., Sehgal, A., Singh, S., Makeen, H. A., Albratty, M., Alhazmi, H. A., Bhatia, S., & Bungau, S. (2022). The Locus Coeruleus - Noradrenaline system: Looking into Alzheimer's therapeutics with rose coloured glasses. *Biomed Pharmacother*, 151, 113179. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113179>
- Bejanin, A., Schonhaut, D. R., La Joie, R., Kramer, J. H., Baker, S. L., Sosa, N., Ayakta, N., Cantwell, A., Janabi, M., Lauriola, M., O'Neil, J. P., Gorno-Tempini, M. L., Miller, Z. A., Rosen, H. J., Miller, B. L., Jagust, W. J., & Rabinovici, G. D. (2017). Tau pathology and neurodegeneration contribute to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Brain*, 140(12), 3286-3300. <https://doi.org/10.1093/brain/awx243>
- Bekar, L. K., Wei, H. S., & Nedergaard, M. (2012). The locus coeruleus-norepinephrine network optimizes coupling of cerebral blood volume with oxygen demand. *J Cereb Blood Flow Metab*, 32(12), 2135-2145. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.115>
- Bell, R. D., Winkler, E. A., Singh, I., Sagare, A. P., Deane, R., Wu, Z., Holtzman, D. M., Betsholtz, C., Armulik, A., Sallstrom, J., Berk, B. C., & Zlokovic, B. V. (2012). Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature*, 485(7399), 512-516. <https://doi.org/10.1038/nature11087>
- Belmadani, A., Tran, P. B., Ren, D., & Miller, R. J. (2006). Chemokines regulate the migration of neural progenitors to sites of neuroinflammation. *J Neurosci*, 26(12), 3182-3191. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0156-06.2006>
- Bennett, D. A., Schneider, J. A., Arvanitakis, Z., Kelly, J. F., Aggarwal, N. T., Shah, R. C., & Wilson, R. S. (2006). Neuropathology of older persons without cognitive impairment from two community-based studies. *Neurology*, 66(12), 1837-1844. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000219668.47116.e6>
- Berman, J. W., Guida, M. P., Warren, J., Amat, J., & Brosnan, C. F. (1996). Localization of monocyte chemoattractant peptide-1 expression in the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis and trauma in the rat. *J Immunol*, 156(8), 3017-3023.
- Betts, M. J., Cardenas-Blanco, A., Kanowski, M., Spottke, A., Teipel, S. J., Kilimann, I., Jessen, F., & Duzel, E. (2019). Locus coeruleus MRI contrast is reduced in Alzheimer's disease dementia and correlates with CSF Aβ levels. *Alzheimers Dement (Amst)*, 11, 281-285. <https://doi.org/10.1016/j.dadm.2019.02.001>
- Bezin, L., Marcel, D., Desgeorges, S., Pujol, J. F., & Weissmann, D. (2000). Singular subsets of locus coeruleus neurons may recover tyrosine hydroxylase phenotype transiently expressed during development. *Brain Res Mol Brain Res*, 76(2), 275-281. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(00\)00007-3](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(00)00007-3)
- Bi, D., Wen, L., Wu, Z., & Shen, Y. (2020). GABAergic dysfunction in excitatory and inhibitory (E/I) imbalance drives the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 16(9), 1312-1329. <https://doi.org/10.1002/alz.12088>
- Biber, K., & Boddeke, E. (2014). Neuronal CC chemokines: the distinct roles of CCL21 and CCL2 in neuropathic pain. *Front Cell Neurosci*, 8, 210. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00210>
- Binder, D. K., & Scharfman, H. E. (2004). Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors*, 22(3), 123-131. <https://doi.org/10.1080/08977190410001723308>
- Bird, T. D. (2005). Genetic factors in Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 352(9), 862-864. <https://doi.org/10.1056/NEJMp058027>
- Blanchard, J. W., Akay, L. A., Davila-Velderrain, J., von Maydell, D., Mathys, H., Davidson, S. M., Effenberger, A., Chen, C. Y., Maner-Smith, K., Hajjar, I., Ortlund, E. A., Bula, M., Agbas, E., Ng, A., Jiang, X., Kahn, M., Blanco-Duque, C., Lavoie, N., Liu, L., . . . Tsai, L. H. (2022). APOE4 impairs myelination via cholesterol dysregulation in oligodendrocytes. *Nature*, 611(7937), 769-779. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05439-w>

- Bohlen, C. J., Bennett, F. C., Tucker, A. F., Collins, H. Y., Mulinyawe, S. B., & Barres, B. A. (2017). Diverse Requirements for Microglial Survival, Specification, and Function Revealed by Defined-Medium Cultures. *Neuron*, *94*(4), 759-773. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.04.043>
- Bondareff, W., Mountjoy, C. Q., & Roth, M. (1981). Selective loss of neurones of origin of adrenergic projection to cerebral cortex (nucleus locus coeruleus) in senile dementia. *Lancet*, *1*(8223), 783-784. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(81\)92657-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(81)92657-x)
- Bondareff, W., Mountjoy, C. Q., Roth, M., Rossor, M. N., Iversen, L. L., Reynolds, G. P., & Hauser, D. L. (1987). Neuronal degeneration in locus ceruleus and cortical correlates of Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, *1*(4), 256-262. <https://doi.org/10.1097/00002093-198701040-00005>
- Bose, S., & Cho, J. (2013). Role of chemokine CCL2 and its receptor CCR2 in neurodegenerative diseases. *Arch Pharm Res*, *36*(9), 1039-1050. <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0161-z>
- Braak, H., Alafuzoff, I., Arzberger, T., Kretschmar, H., & Del Tredici, K. (2006). Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol*, *112*(4), 389-404. <https://doi.org/10.1007/s00401-006-0127-z>
- Braak, H., & Braak, E. (1991a). Demonstration of amyloid deposits and neurofibrillary changes in whole brain sections. *Brain Pathol*, *1*(3), 213-216. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1991.tb00661.x>
- Braak, H., & Braak, E. (1991b). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, *82*(4), 239-259. <https://doi.org/10.1007/bf00308809>
- Braak, H., & Braak, E. (1996). Development of Alzheimer-related neurofibrillary changes in the neocortex inversely recapitulates cortical myelogenesis. *Acta Neuropathol*, *92*(2), 197-201. <https://doi.org/10.1007/s004010050508>
- Braak, H., & Braak, E. (1997). Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories. *Neurobiol Aging*, *18*(4), 351-357. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(97\)00056-0](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(97)00056-0)
- Braak, H., & Del Tredici, K. (2011). The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. *Acta Neuropathol*, *121*(2), 171-181. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0789-4>
- Braak, H., Thal, D. R., Ghebremedhin, E., & Del Tredici, K. (2011). Stages of the pathologic process in Alzheimer disease: age categories from 1 to 100 years. *J Neuropathol Exp Neurol*, *70*(11), 960-969. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e318232a379>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1), 248-254. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Braun, D., & Feinstein, D. L. (2019). The locus coeruleus neuroprotective drug vindeburnol normalizes behavior in the 5xFAD transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Res*, *1702*, 29-37. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.12.028>
- Braun, D., Madrigal, J. L., & Feinstein, D. L. (2014). Noradrenergic regulation of glial activation: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Curr Neuropharmacol*, *12*(4), 342-352. <https://doi.org/10.2174/1570159X12666140828220938>
- Briggs, D. I., Defensor, E., Memar Ardestani, P., Yi, B., Halpain, M., Seabrook, G., & Shamloo, M. (2017). Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Learning and Memory Impairment and Alzheimer's Disease-Like Neuropathology in the PS19 and APP(Swe) Mouse Models of Tauopathy and Amyloidosis. *eNeuro*, *4*(4). <https://doi.org/10.1523/eneuro.0025-17.2017>
- Britschgi, M., & Wyss-Coray, T. (2007). Systemic and acquired immune responses in Alzheimer's disease. *Int Rev Neurobiol*, *82*, 205-233. [https://doi.org/10.1016/s0074-7742\(07\)82011-3](https://doi.org/10.1016/s0074-7742(07)82011-3)
- Brodsky, H., Seeher, K., & Gibson, L. (2012). Dementia time to death: a systematic literature review on survival time and years of life lost in people with dementia. *Int Psychogeriatr*, *24*(7), 1034-1045. <https://doi.org/10.1017/S1041610211002924>

- Bruno, V., Copani, A., Besong, G., Scoto, G., & Nicoletti, F. (2000). Neuroprotective activity of chemokines against N-methyl-D-aspartate or beta-amyloid-induced toxicity in culture. *Eur J Pharmacol*, 399(2-3), 117-121. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(00\)00367-8](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(00)00367-8)
- Burda, J. E., & Sofroniew, M. V. (2014). Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*, 81(2), 229-248. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.034>
- Butterfield, D. A., & Halliwell, B. (2019). Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*, 20(3), 148-160. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0132-6>
- Calvo, B., Rubio, F., Fernández, M., & Tranque, P. (2020). Dissociation of neonatal and adult mice brain for simultaneous analysis of microglia, astrocytes and infiltrating lymphocytes by flow cytometry. *IBRO Reports*, 8, 36-47. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibror.2019.12.004>
- Cao, S., Fisher, D. W., Rodriguez, G., Yu, T., & Dong, H. (2021). Comparisons of neuroinflammation, microglial activation, and degeneration of the locus coeruleus-norepinephrine system in APP/PS1 and aging mice. *J Neuroinflammation*, 18(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-02054-2>
- Cao, S., Fisher, D. W., Yu, T., & Dong, H. (2019). The link between chronic pain and Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 204. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1608-z>
- Cardona, A. E., Piro, E. P., Sasse, M. E., Kostenko, V., Cardona, S. M., Dijkstra, I. M., Huang, D., Kidd, G., Dombrowski, S., Dutta, R., Lee, J. C., Cook, D. N., Jung, S., Lira, S. A., Littman, D. R., & Ransohoff, R. M. (2006). Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci*, 9(7), 917-924. <https://doi.org/10.1038/nn1715>
- Carmona, S., Zahs, K., Wu, E., Dakin, K., Bras, J., & Guerreiro, R. (2018). The role of TREM2 in Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol*, 17(8), 721-730. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(18\)30232-1](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(18)30232-1)
- Carnevale, D., De Simone, R., & Minghetti, L. (2007). Microglia-neuron interaction in inflammatory and degenerative diseases: role of cholinergic and noradrenergic systems. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 6(6), 388-397. <https://doi.org/10.2174/187152707783399193>
- Carter, S. F., Schöll, M., Almkvist, O., Wall, A., Engler, H., Långström, B., & Nordberg, A. (2012). Evidence for astrogliosis in prodromal Alzheimer disease provided by ¹¹C-deuterium-L-deprenyl: a multitracers PET paradigm combining ¹¹C-Pittsburgh compound B and ¹⁸F-FDG. *J Nucl Med*, 53(1), 37-46. <https://doi.org/10.2967/jnumed.110.087031>
- Cassidy, C. M., Therriault, J., Pascoal, T. A., Cheung, V., Savard, M., Tuominen, L., Chamoun, M., McCall, A., Celebi, S., Lussier, F., Massarweh, G., Soucy, J. P., Weinshenker, D., Tardif, C., Ismail, Z., Gauthier, S., & Rosa-Neto, P. (2022). Association of locus coeruleus integrity with Braak stage and neuropsychiatric symptom severity in Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology*, 47(5), 1128-1136. <https://doi.org/10.1038/s41386-022-01293-6>
- Caughey, B., & Lansbury, P. T. (2003). Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci*, 26, 267-298. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.010302.081142>
- Cédile, O., Wlodarczyk, A., & Owens, T. (2017). CCL2 recruits T cells into the brain in a CCR2-independent manner. *Apmis*, 125(11), 945-956. <https://doi.org/10.1111/apm.12740>
- Chai, G. S., Wang, Y. Y., Zhu, D., Yasheng, A., & Zhao, P. (2017). Activation of $\beta(2)$ -adrenergic receptor promotes dendrite ramification and spine generation in APP/PS1 mice. *Neurosci Lett*, 636, 158-164. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.11.022>
- Chalermpananupap, T., Kinkead, B., Hu, W. T., Kummer, M. P., Hammerschmidt, T., Heneka, M. T., Weinshenker, D., & Levey, A. I. (2013). Targeting norepinephrine in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*, 5(2), 21. <https://doi.org/10.1186/alzrt175>
- Chalermpananupap, T., Kinkead, B., Hu, W. T., Kummer, M. P., Hammerschmidt, T., Heneka, M. T., Weinshenker, D., & Levey, A. I. (2013). Targeting norepinephrine in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, 5(2), 21. <https://doi.org/10.1186/alzrt175>

- Chalermपालanupap, T., Schroeder, J. P., Rorabaugh, J. M., Liles, L. C., Lah, J. J., Levey, A. I., & Weinshenker, D. (2018). Locus Coeruleus Ablation Exacerbates Cognitive Deficits, Neuropathology, and Lethality in P301S Tau Transgenic Mice. *The Journal of Neuroscience*, 38(1), 74-92. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1483-17.2017>
- Chalermपालanupap, T., Schroeder, J. P., Rorabaugh, J. M., Liles, L. C., Lah, J. J., Levey, A. I., & Weinshenker, D. (2018). Locus Coeruleus Ablation Exacerbates Cognitive Deficits, Neuropathology, and Lethality in P301S Tau Transgenic Mice. *J Neurosci*, 38(1), 74-92. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1483-17.2017>
- Chan-Palay, V., & Asan, E. (1989). Alterations in catecholamine neurons of the locus coeruleus in senile dementia of the Alzheimer type and in Parkinson's disease with and without dementia and depression. *J Comp Neurol*, 287(3), 373-392. <https://doi.org/10.1002/cne.902870308>
- Chan, E., Fogler, J. M., & Hammerness, P. G. (2016). Treatment of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder in Adolescents: A Systematic Review. *JAMA*, 315(18), 1997-2008. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.5453>
- Chen, G. F., Xu, T. H., Yan, Y., Zhou, Y. R., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2017). Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Acta Pharmacol Sin*, 38(9), 1205-1235. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.28>
- Chen, Y., Chen, T., & Hou, R. (2022). Locus coeruleus in the pathogenesis of Alzheimer's disease: A systematic review. *Alzheimers Dement (N Y)*, 8(1), e12257. <https://doi.org/10.1002/trc2.12257>
- Chen, Y., & Colonna, M. (2021). Microglia in Alzheimer's disease at single-cell level. Are there common patterns in humans and mice? *J Exp Med*, 218(9). <https://doi.org/10.1084/jem.20202717>
- Chen, Y., Peng, Y., Che, P., Gannon, M., Liu, Y., Li, L., Bu, G., van Groen, T., Jiao, K., & Wang, Q. (2014). alpha(2A) adrenergic receptor promotes amyloidogenesis through disrupting APP-SorLA interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(48), 17296-17301. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409513111>
- Chiang, N., & Serhan, C. N. (2017). Structural elucidation and physiologic functions of specialized pro-resolving mediators and their receptors. *Mol Aspects Med*, 58, 114-129. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.03.005>
- Chun, H., & Lee, C. J. (2018). Reactive astrocytes in Alzheimer's disease: A double-edged sword. *Neurosci Res*, 126, 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2017.11.012>
- Ciampa, C. J., Parent, J. H., Harrison, T. M., Fain, R. M., Betts, M. J., Maass, A., Winer, J. R., Baker, S. L., Janabi, M., Furman, D. J., D'Esposito, M., Jagust, W. J., & Berry, A. S. (2022). Associations among locus coeruleus catecholamines, tau pathology, and memory in aging. *Neuropsychopharmacology*, 47(5), 1106-1113. <https://doi.org/10.1038/s41386-022-01269-6>
- Cirrito, J. R., Yamada, K. A., Finn, M. B., Sloviter, R. S., Bales, K. R., May, P. C., Schoepp, D. D., Paul, S. M., Mennerick, S., & Holtzman, D. M. (2005). Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo. *Neuron*, 48(6), 913-922. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.10.028>
- Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R. A., Abramowski, D., Frank, S., Probst, A., Fraser, G., Stalder, A. K., Beibel, M., Staufenbiel, M., Jucker, M., Goedert, M., & Tolnay, M. (2009). Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol*, 11(7), 909-913. <https://doi.org/10.1038/ncb1901>
- Cleary, J. P., Walsh, D. M., Hofmeister, J. J., Shankar, G. M., Kuskowski, M. A., Selkoe, D. J., & Ashe, K. H. (2005). Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat Neurosci*, 8(1), 79-84. <https://doi.org/10.1038/nn1372>
- Colombo, E., & Farina, C. (2016). Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends Immunol*, 37(9), 608-620. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.06.006>
- Conductier, G., Blondeau, N., Guyon, A., Nahon, J. L., & Rovère, C. (2010). The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases. *J Neuroimmunol*, 224(1-2), 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.05.010>

- Corrada, M. M., Berlau, D. J., & Kawas, C. H. (2012). A population-based clinicopathological study in the oldest-old: the 90+ study. *Curr Alzheimer Res*, 9(6), 709-717. <https://doi.org/10.2174/156720512801322537>
- Cosentino, M., Zaffaroni, M., Marino, F., Bombelli, R., Ferrari, M., Rasini, E., Lecchini, S., Ghezzi, A., & Frigo, G. (2002). Catecholamine production and tyrosine hydroxylase expression in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients: effect of cell stimulation and possible relevance for activation-induced apoptosis. *J Neuroimmunol*, 133(1-2), 233-240. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(02\)00372-7](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(02)00372-7)
- Coulson, E. J. (2006). Does the p75 neurotrophin receptor mediate Abeta-induced toxicity in Alzheimer's disease? *J Neurochem*, 98(3), 654-660. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03905.x>
- Counts, S. E., & Mufson, E. J. (2010). Noradrenaline activation of neurotrophic pathways protects against neuronal amyloid toxicity. *J Neurochem*, 113(3), 649-660. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06622.x>
- Counts, S. E., Perez, S. E., & Mufson, E. J. (2008). Galanin in Alzheimer's disease: neuroinhibitory or neuroprotective? *Cell Mol Life Sci*, 65(12), 1842-1853. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8159-2>
- Craft, J. M., Watterson, D. M., & Van Eldik, L. J. (2006). Human amyloid beta-induced neuroinflammation is an early event in neurodegeneration. *Glia*, 53(5), 484-490. <https://doi.org/10.1002/glia.20306>
- Crean, D., & Godson, C. (2015). Specialised lipid mediators and their targets. *Seminars in Immunology*, 27(3), 169-176. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.05.002>
- Cribbs, D. H., Berchtold, N. C., Perreau, V., Coleman, P. D., Rogers, J., Tenner, A. J., & Cotman, C. W. (2012). Extensive innate immune gene activation accompanies brain aging, increasing vulnerability to cognitive decline and neurodegeneration: a microarray study. *J Neuroinflammation*, 9, 179. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-179>
- Cummings, J., Lee, G., Nahed, P., Kambar, M., Zhong, K., Fonseca, J., & Taghva, K. (2022). Alzheimer's disease drug development pipeline: 2022. *Alzheimers Dement (N Y)*, 8(1), e12295. <https://doi.org/10.1002/trc2.12295>
- Dahl, M. J., Mather, M., Werkle-Bergner, M., Kennedy, B. L., Guzman, S., Hurth, K., Miller, C. A., Qiao, Y., Shi, Y., Chui, H. C., & Ringman, J. M. (2022). Locus coeruleus integrity is related to tau burden and memory loss in autosomal-dominant Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 112, 39-54. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2021.11.006>
- Dahl, M. J., Mather, M., Werkle-Bergner, M., Kennedy, B. L., Guzman, S., Hurth, K., Miller, C. A., Qiao, Y., Shi, Y., Chui, H. C., & Ringman, J. M. (2022). Locus coeruleus integrity is related to tau burden and memory loss in autosomal-dominant Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 112, 39-54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2021.11.006>
- Dahlström, A., & Fuxe, K. (1964). Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, 20(7), 398-399. <https://doi.org/10.1007/bf02147990>
- Daubner, S. C., Le, T., & Wang, S. (2011). Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys*, 508(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.017>
- David, M., & Malhotra, P. A. (2022). New approaches for the quantification and targeting of noradrenergic dysfunction in Alzheimer's disease. *Ann Clin Transl Neurol*, 9(4), 582-596. <https://doi.org/10.1002/acn3.51539>
- de Leeuw, S., & Tackenberg, C. (2019). Alzheimer's in a dish - induced pluripotent stem cell-based disease modeling. *Transl Neurodegener*, 8, 21. <https://doi.org/10.1186/s40035-019-0161-0>
- De Strooper, B. (2003). Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex. *Neuron*, 38(1), 9-12. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00205-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00205-8)
- De Strooper, B., Iwatsubo, T., & Wolfe, M. S. (2012). Presenilins and γ -secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(1), a006304. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006304>

- De Strooper, B., & Karran, E. (2016). The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell*, 164(4), 603-615. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.056>
- Del Cerro, I., Villarreal, M. F., Abulafia, C., Duarte-Abritta, B., Sanchez, S. M., Castro, M. N., Bocaccio, H., Ferrer, I., Menchon, J. M., Sevlever, G., Nemeroff, C. B., Soriano-Mas, C., & Guinjoan, S. M. (2020). Disrupted functional connectivity of the locus coeruleus in healthy adults with parental history of Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res*, 123, 81-88. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2020.01.018>
- Dello Russo, C., Boullerne, A. I., Gavrilyuk, V., & Feinstein, D. L. (2004). Inhibition of microglial inflammatory responses by norepinephrine: effects on nitric oxide and interleukin-1beta production. *J Neuroinflammation*, 1(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-1-9>
- Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., & Sawaya, B. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*, 29(6), 313-326. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>
- Dibner, M. D., & Insel, P. A. (1981). Serum catecholamines desensitize beta-adrenergic receptors of cultured C6 glioma cells. *J Biol Chem*, 256(14), 7343-7346.
- Dibner, M. D., Wolfe, R. A., & Insel, P. A. (1981). Replacement of serum with a defined medium increases β -adrenergic receptor number in cultured glioma cells. *Experimental Cell Research*, 131(2), 424-427. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-4827\(81\)90249-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-4827(81)90249-4)
- DiSabato, D. J., Quan, N., & Godbout, J. P. (2016). Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem*, 139 Suppl 2(Suppl 2), 136-153. <https://doi.org/10.1111/jnc.13607>
- Dobarro, M., Gerenu, G., & Ramirez, M. J. (2013). Propranolol reduces cognitive deficits, amyloid and tau pathology in Alzheimer's transgenic mice. *Int J Neuropsychopharmacol*, 16(10), 2245-2257. <https://doi.org/10.1017/S1461145713000631>
- Dobarro, M., Orejana, L., Aguirre, N., & Ramirez, M. J. (2013). Propranolol restores cognitive deficits and improves amyloid and Tau pathologies in a senescence-accelerated mouse model. *Neuropharmacology*, 64, 137-144. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.06.047>
- Dobarro, M., Orejana, L., Aguirre, N., & Ramírez, M. J. (2013). Propranolol restores cognitive deficits and improves amyloid and Tau pathologies in a senescence-accelerated mouse model. *Neuropharmacology*, 64, 137-144. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.06.047>
- Drummond, E., & Wisniewski, T. (2017). Alzheimer's disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*, 133(2), 155-175. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1662-x>
- Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., Cummings, J. L., Dekosky, S. T., Barberger-Gateau, P., Delacourte, A., Frisoni, G., Fox, N. C., Galasko, D., Gauthier, S., Hampel, H., Jicha, G. A., Meguro, K., O'Brien, J., Pasquier, F., Robert, P., Rossor, M., Salloway, S., . . . Scheltens, P. (2010). Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol*, 9(11), 1118-1127. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(10\)70223-4](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(10)70223-4)
- Dubois, B., Feldman, H. H., Jacova, C., Dekosky, S. T., Barberger-Gateau, P., Cummings, J., Delacourte, A., Galasko, D., Gauthier, S., Jicha, G., Meguro, K., O'Brien, J., Pasquier, F., Robert, P., Rossor, M., Salloway, S., Stern, Y., Visser, P. J., & Scheltens, P. (2007). Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet Neurol*, 6(8), 734-746. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(07\)70178-3](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(07)70178-3)
- Dutt, S., Li, Y., Mather, M., Nation, D. A., & Alzheimer's Disease Neuroimaging, I. (2020). Brainstem Volumetric Integrity in Preclinical and Prodromal Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 77(4), 1579-1594. <https://doi.org/10.3233/JAD-200187>
- Dzenko, K. A., Song, L., Ge, S., Kuziel, W. A., & Pachter, J. S. (2005). CCR2 expression by brain microvascular endothelial cells is critical for macrophage transendothelial migration in response to CCL2. *Microvasc Res*, 70(1-2), 53-64. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2005.04.005>
- Eiden, L. E., Schafer, M. K., Weihe, E., & Schutz, B. (2004). The vesicular amine transporter family (SLC18): amine/proton antiporters required for vesicular accumulation and regulated exocytotic secretion of monoamines and acetylcholine. *Pflugers Arch*, 447(5), 636-640. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1100-5>

- 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. *Nat Med*, 13(4), 432-438. <https://doi.org/10.1038/nm1555>
- Elman, J. A., Panizzon, M. S., Hagler, D. J., Jr., Eyler, L. T., Granholm, E. L., Fennema-Notestine, C., Lyons, M. J., McEvoy, L. K., Franz, C. E., Dale, A. M., & Kremen, W. S. (2017). Task-evoked pupil dilation and BOLD variance as indicators of locus coeruleus dysfunction. *Cortex*, 97, 60-69. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2017.09.025>
- Elrod, R., Peskind, E. R., DiGiacomo, L., Brodtkin, K. I., Veith, R. C., & Raskind, M. A. (1997). Effects of Alzheimer's disease severity on cerebrospinal fluid norepinephrine concentration. *Am J Psychiatry*, 154(1), 25-30. <https://doi.org/10.1176/ajp.154.1.25>
- Eme-Scolan, E., & Dando, S. J. (2020). Tools and Approaches for Studying Microglia In vivo. *Front Immunol*, 11, 583647. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583647>
- Emre, C., Arroyo-García, L. E., Do, K. V., Jun, B., Ohshima, M., Alcalde, S. G., Cothorn, M. L., Maioli, S., Nilsson, P., Hjorth, E., Fisahn, A., Bazan, N. G., & Schultzberg, M. (2022). Intranasal delivery of pro-resolving lipid mediators rescues memory and gamma oscillation impairment in App(NL-G-F/NL-G-F) mice. *Commun Biol*, 5(1), 245. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03169-3>
- Etminan, M., Gill, S., & Samii, A. (2003). Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on risk of Alzheimer's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Bmj*, 327(7407), 128. <https://doi.org/10.1136/bmj.327.7407.128>
- Eugenin, E. A., D'Aversa, T. G., Lopez, L., Calderon, T. M., & Berman, J. W. (2003). MCP-1 (CCL2) protects human neurons and astrocytes from NMDA or HIV-tat-induced apoptosis. *J Neurochem*, 85(5), 1299-1311. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01775.x>
- Evans, A. K., Ardestani, P. M., Yi, B., Park, H. H., Lam, R. K., & Shamloo, M. (2020). Beta-adrenergic receptor antagonism is proinflammatory and exacerbates neuroinflammation in a mouse model of Alzheimer's Disease. *Neurobiol Dis*, 146, 105089. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105089>
- Farber, K., Pannasch, U., & Kettenmann, H. (2005). Dopamine and noradrenaline control distinct functions in rodent microglial cells. *Mol Cell Neurosci*, 29(1), 128-138. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.01.003>
- Färber, K., Pannasch, U., & Kettenmann, H. (2005). Dopamine and noradrenaline control distinct functions in rodent microglial cells. *Mol Cell Neurosci*, 29(1), 128-138. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2005.01.003>
- Fattorelli, N., Martinez-Muriana, A., Wolfs, L., Geric, I., De Strooper, B., & Mancuso, R. (2021). Stem-cell-derived human microglia transplanted into mouse brain to study human disease. *Nat Protoc*, 16(2), 1013-1033. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-00447-4>
- Fei, L., Ren, X., Yu, H., & Zhan, Y. (2021). Targeting the CCL2/CCR2 Axis in Cancer Immunotherapy: One Stone, Three Birds? *Front Immunol*, 12, 771210. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.771210>
- Feinstein, D. L., Heneka, M. T., Gavrilyuk, V., Dello Russo, C., Weinberg, G., & Galea, E. (2002). Noradrenergic regulation of inflammatory gene expression in brain. *Neurochem Int*, 41(5), 357-365. [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(02\)00049-9](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(02)00049-9)
- Feinstein, D. L., Kalinin, S., & Braun, D. (2016). Causes, consequences, and cures for neuroinflammation mediated via the locus coeruleus: noradrenergic signaling system. *J Neurochem*, 139 Suppl 2, 154-178. <https://doi.org/10.1111/jnc.13447>
- Ferreira-Vieira, T. H., Guimaraes, I. M., Silva, F. R., & Ribeiro, F. M. (2016). Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System. *Curr Neuropharmacol*, 14(1), 101-115. <https://doi.org/10.2174/1570159x13666150716165726>
- Ferreira, D., Nordberg, A., & Westman, E. (2020). Biological subtypes of Alzheimer disease. A systematic review and meta-analysis, 94(10), 436-448. <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000009058>

- Ferretti, M. T., Iulita, M. F., Cavedo, E., Chiesa, P. A., Schumacher Dimech, A., Santuccione Chadha, A., Baracchi, F., Girouard, H., Misoch, S., Giacobini, E., Depypere, H., Hampel, H., for the Women's Brain, P., & the Alzheimer Precision Medicine, I. (2018). Sex differences in Alzheimer disease — the gateway to precision medicine. *Nature Reviews Neurology*, *14*(8), 457-469. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0032-9>
- Flores-Aguilar, L., Hall, H., Orciani, C., Foret, M. K., Kovacs, O., Ducatenzeiler, A., & Cuello, A. C. (2022). Early loss of locus coeruleus innervation promotes cognitive and neuropathological changes before amyloid plaque deposition in a transgenic rat model of Alzheimer's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *48*(6), e12835. <https://doi.org/10.1111/nan.12835>
- Follesa, P., Biggio, F., Gorini, G., Caria, S., Talani, G., Dazzi, L., Puligheddu, M., Marrosu, F., & Biggio, G. (2007). Vagus nerve stimulation increases norepinephrine concentration and the gene expression of BDNF and bFGF in the rat brain. *Brain Res*, *1179*, 28-34. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.08.045>
- Forstl, H., Levy, R., Burns, A., Luthert, P., & Cairns, N. (1994). Disproportionate loss of noradrenergic and cholinergic neurons as cause of depression in Alzheimer's disease--a hypothesis. *Pharmacopsychiatry*, *27*(1), 11-15. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1014267>
- Fowler, J. H., McCracken, E., Dewar, D., & McCulloch, J. (2003). Intracerebral injection of AMPA causes axonal damage in vivo. *Brain Res*, *991*(1-2), 104-112. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.08.004>
- Fraga, V. G., Carvalho, M. d. G., Caramelli, P., de Sousa, L. P., & Gomes, K. B. (2017). Resolution of inflammation, n-3 fatty acid supplementation and Alzheimer disease: A narrative review. *Journal of Neuroimmunology*, *310*, 111-119. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2017.07.005>
- Francis, P. T., Palmer, A. M., Snape, M., & Wilcock, G. K. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *66*(2), 137. <https://doi.org/10.1136/jnnp.66.2.137>
- Frandemiche, M. L., De Seranno, S., Rush, T., Borel, E., Elie, A., Arnal, I., Lanté, F., & Buisson, A. (2014). Activity-dependent tau protein translocation to excitatory synapse is disrupted by exposure to amyloid-beta oligomers. *J Neurosci*, *34*(17), 6084-6097. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4261-13.2014>
- Franke, T. F., Hornik, C. P., Segev, L., Shostak, G. A., & Sugimoto, C. (2003). PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene*, *22*(56), 8983-8998. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207115>
- Frohman, E. M., Vayuvegula, B., Gupta, S., & van den Noort, S. (1988). Norepinephrine inhibits gamma-interferon-induced major histocompatibility class II (Ia) antigen expression on cultured astrocytes via beta-2-adrenergic signal transduction mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *85*(4), 1292-1296. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.4.1292>
- Frontzkowski, L., Ewers, M., Brendel, M., Biel, D., Ossenkoppele, R., Hager, P., Steward, A., Dewenter, A., Römer, S., Rubinski, A., Buerger, K., Janowitz, D., Binette, A. P., Smith, R., Strandberg, O., Carlgren, N. M., Dichgans, M., Hansson, O., & Franzmeier, N. (2022). Earlier Alzheimer's disease onset is associated with tau pathology in brain hub regions and facilitated tau spreading. *Nat Commun*, *13*(1), 4899. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32592-7>
- Frost, B., Jacks, R. L., & Diamond, M. I. (2009). Propagation of tau misfolding from the outside to the inside of a cell. *J Biol Chem*, *284*(19), 12845-12852. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808759200>
- Fujita, H., Tanaka, J., Maeda, N., & Sakanaka, M. (1998). Adrenergic agonists suppress the proliferation of microglia through beta 2-adrenergic receptor. *Neurosci Lett*, *242*(1), 37-40. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(98\)00003-2](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(98)00003-2)
- Fujita, H., Tanaka, J., Toku, K., Tateishi, N., Suzuki, Y., Matsuda, S., Sakanaka, M., & Maeda, N. (1996). Effects of GM-CSF and ordinary supplements on the ramification of microglia in culture: a morphometrical study. *Glia*, *18*(4), 269-281. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-1136\(199612\)18:4<269::aid-glia2>3.0.co;2-t](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-1136(199612)18:4<269::aid-glia2>3.0.co;2-t)

- Galgani, A., Lombardo, F., Martini, N., Vergallo, A., Bastiani, L., Hampel, H., Hlavata, H., Baldacci, F., Tognoni, G., De Marchi, D., Ghicopulos, I., De Cori, S., Biagioni, F., Busceti, C. L., Ceravolo, R., Bonuccelli, U., Chiappino, D., Siciliano, G., Fornai, F., . . . Giorgi, F. S. (2022). Magnetic resonance imaging Locus Coeruleus abnormality in amnesic Mild Cognitive Impairment is associated with future progression to dementia. *Eur J Neurol*. <https://doi.org/10.1111/ene.15556>
- Galimberti, D., Fenoglio, C., Lovati, C., Venturelli, E., Guidi, I., Corrà, B., Scalabrini, D., Clerici, F., Mariani, C., Bresolin, N., & Scarpini, E. (2006). Serum MCP-1 levels are increased in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 27(12), 1763-1768. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.10.007>
- Ganguli, M., Dodge, H. H., Shen, C., Pandav, R. S., & DeKosky, S. T. (2005). Alzheimer disease and mortality: a 15-year epidemiological study. *Arch Neurol*, 62(5), 779-784. <https://doi.org/10.1001/archneur.62.5.779>
- Gannon, M., Che, P., Chen, Y., Jiao, K., Roberson, E. D., & Wang, Q. (2015). Noradrenergic dysfunction in Alzheimer's disease. *Front Neurosci*, 9, 220. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00220>
- Gannon, M., & Wang, Q. (2019). Complex noradrenergic dysfunction in Alzheimer's disease: Low norepinephrine input is not always to blame. *Brain Res*, 1702, 12-16. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.01.001>
- Gao, L., Zhang, Y., Sterling, K., & Song, W. (2022). Brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer's disease and its pharmaceutical potential. *Transl Neurodegener*, 11(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s40035-022-00279-0>
- Gao, L., Zhang, Y., Sterling, K., & Song, W. (2022). Brain-derived neurotrophic factor in Alzheimer's disease and its pharmaceutical potential. *Translational Neurodegeneration*, 11(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s40035-022-00279-0>
- Garcia, C., Marcel, D., Le Cavorsin, M., Pujol, J. F., & Weissmann, D. (1994). Phenotypic characteristics of expressed tyrosine hydroxylase protein in the adult rat nucleus tractus solitarius: plasticity revealed by RU24722 treatment. *Neuroscience*, 62(4), 1201-1205. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90353-0](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90353-0)
- Ge, S., Song, L., Serwanski, D. R., Kuziel, W. A., & Pachter, J. S. (2008). Transcellular transport of CCL2 across brain microvascular endothelial cells. *J Neurochem*, 104(5), 1219-1232. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05056.x>
- Geffen, L. B., & Livett, B. G. (1971). Synaptic vesicles in sympathetic neurons. *Physiol Rev*, 51(1), 98-157. <https://doi.org/10.1152/physrev.1971.51.1.98>
- Genin, E., Hannequin, D., Wallon, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Bullido, M. J., Engelborghs, S., De Deyn, P., Berr, C., Pasquier, F., Dubois, B., Tognoni, G., Fiévet, N., Brouwers, N., Bettens, K., Arosio, B., Coto, E., Del Zompo, M., . . . Campion, D. (2011). APOE and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance. *Mol Psychiatry*, 16(9), 903-907. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.52>
- Gerard, C., & Rollins, B. J. (2001). Chemokines and disease. *Nat Immunol*, 2(2), 108-115. <https://doi.org/10.1038/84209>
- German, D. C., Manaye, K. F., White, C. L., 3rd, Woodward, D. J., McIntire, D. D., Smith, W. K., Kalaria, R. N., & Mann, D. M. (1992). Disease-specific patterns of locus coeruleus cell loss. *Ann Neurol*, 32(5), 667-676. <https://doi.org/10.1002/ana.410320510>
- Gilgun-Sherki, Y., Panet, H., Holdengreber, V., Mosberg-Galili, R., & Offen, D. (2003). Axonal damage is reduced following glatiramer acetate treatment in C57/bl mice with chronic-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neurosci Res*, 47(2), 201-207. [https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(03\)00217-7](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(03)00217-7)
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M., & Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, 330(6005), 841-845. <https://doi.org/10.1126/science.1194637>

- Gittis, A. H., & Brasier, D. J. (2015). NEUROSCIENCE. Astrocytes tell neurons when to listen up. *Science*, 349(6249), 690-691. <https://doi.org/10.1126/science.aad0678>
- Glabe, C. G. (2008). Structural classification of toxic amyloid oligomers. *J Biol Chem*, 283(44), 29639-29643. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800016200>
- Glabinski, A. R., Balasingam, V., Tani, M., Kunkel, S. L., Strieter, R. M., Yong, V. W., & Ransohoff, R. M. (1996). Chemokine monocyte chemoattractant protein-1 is expressed by astrocytes after mechanical injury to the brain. *J Immunol*, 156(11), 4363-4368.
- Glabinski, A. R., & Ransohoff, R. M. (1999). Chemokines and chemokine receptors in CNS pathology. *J Neurovirol*, 5(1), 3-12. <https://doi.org/10.3109/13550289909029740>
- Godefroy, D., Gosselin, R. D., Yasutake, A., Fujimura, M., Combadière, C., Maury-Brachet, R., Laclau, M., Rakwal, R., Melik-Parsadaniantz, S., Bourdineaud, J. P., & Rostène, W. (2012). The chemokine CCL2 protects against methylmercury neurotoxicity. *Toxicol Sci*, 125(1), 209-218. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr252>
- Goedert, M. (1993). Tau protein and the neurofibrillary pathology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*, 16(11), 460-465. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(93\)90078-z](https://doi.org/10.1016/0166-2236(93)90078-z)
- Goedert, M. (2015). NEURODEGENERATION. Alzheimer's and Parkinson's diseases: The prion concept in relation to assembled A β , tau, and α -synuclein. *Science*, 349(6248), 1255555. <https://doi.org/10.1126/science.1255555>
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Hasegawa, M., Jakes, R., Crowther, R. A., & Klug, A. (1996). Molecular dissection of the neurofibrillary lesions of Alzheimer's disease. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 61, 565-573.
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D., & Crowther, R. A. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*, 3(4), 519-526. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90210-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90210-9)
- Gold, C. A., & Budson, A. E. (2008). Memory loss in Alzheimer's disease: implications for development of therapeutics. *Expert Rev Neurother*, 8(12), 1879-1891. <https://doi.org/10.1586/14737175.8.12.1879>
- Goldstein, M., Fuxe, K., & Hokfelt, T. (1972). Characterization and tissue localization of catecholamine synthesizing enzymes. *Pharmacol Rev*, 24(2), 293-309. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4564603>
- Gomes, G. M., Dalmolin, G. D., Bär, J., Karpova, A., Mello, C. F., Kreutz, M. R., & Rubin, M. A. (2014). Inhibition of the polyamine system counteracts β -amyloid peptide-induced memory impairment in mice: involvement of extrasynaptic NMDA receptors. *PLoS One*, 9(6), e99184. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099184>
- Gomez-Isla, T., & Frosch, M. P. (2022). Lesions without symptoms: understanding resilience to Alzheimer disease neuropathological changes. *Nat Rev Neurol*, 18(6), 323-332. <https://doi.org/10.1038/s41582-022-00642-9>
- Gong, C. X., & Iqbal, K. (2008). Hyperphosphorylation of microtubule-associated protein tau: a promising therapeutic target for Alzheimer disease. *Curr Med Chem*, 15(23), 2321-2328. <https://doi.org/10.2174/092986708785909111>
- Gong, C. X., Liu, F., Grundke-Iqbal, I., & Iqbal, K. (2005). Post-translational modifications of tau protein in Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)*, 112(6), 813-838. <https://doi.org/10.1007/s00702-004-0221-0>
- González, A., Calfío, C., Churruca, M., & Maccioni, R. B. (2022). Glucose metabolism and AD: evidence for a potential diabetes type 3. *Alzheimer's Research & Therapy*, 14(1), 56. <https://doi.org/10.1186/s13195-022-00996-8>
- Greenberg, S. M., Gurol, M. E., Rosand, J., & Smith, E. E. (2004). Amyloid angiopathy-related vascular cognitive impairment. *Stroke*, 35(11 Suppl 1), 2616-2619. <https://doi.org/10.1161/01.Str.0000143224.36527.44>

- Guan, P. P., & Wang, P. (2019). Integrated communications between cyclooxygenase-2 and Alzheimer's disease. *Faseb j*, 33(1), 13-33. <https://doi.org/10.1096/fj.201800355RRRR>
- Guo, F., Xu, D., Lin, Y., Wang, G., Wang, F., Gao, Q., Wei, Q., & Lei, S. (2020). Chemokine CCL2 contributes to BBB disruption via the p38 MAPK signaling pathway following acute intracerebral hemorrhage. *Faseb j*, 34(1), 1872-1884. <https://doi.org/10.1096/fj.201902203RR>
- Gupta, P. K., Prabhakar, S., Sharma, S., & Anand, A. (2011). Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and chemokine ligand-2 (CCL2) in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients. *J Neuroinflammation*, 8, 47. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-8-47>
- Gutierrez, I. L., Dello Russo, C., Novellino, F., Caso, J. R., Garcia-Bueno, B., Leza, J. C., & Madrigal, J. L. M. (2022). Noradrenaline in Alzheimer's Disease: A New Potential Therapeutic Target. *Int J Mol Sci*, 23(11). <https://doi.org/10.3390/ijms23116143>
- Gutierrez, I. L., Gonzalez-Prieto, M., Garcia-Bueno, B., Caso, J. R., Leza, J. C., & Madrigal, J. L. M. (2018). Alternative Method to Detect Neuronal Degeneration and Amyloid beta Accumulation in Free-Floating Brain Sections With Fluoro-Jade. *ASN Neuro*, 10, 1759091418784357. <https://doi.org/10.1177/1759091418784357>
- Guyon, A., Skrzydelski, D., De Giry, I., Rovère, C., Conductier, G., Trocello, J. M., Daugé, V., Kitabgi, P., Rostène, W., Nahon, J. L., & Mélik Parsadaniantz, S. (2009). Long term exposure to the chemokine CCL2 activates the nigrostriatal dopamine system: a novel mechanism for the control of dopamine release. *Neuroscience*, 162(4), 1072-1080. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.05.048>
- Gyoneva, S., & Traynelis, S. F. (2013). Norepinephrine modulates the motility of resting and activated microglia via different adrenergic receptors. *J Biol Chem*, 288(21), 15291-15302. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.458901>
- Hajek, I., Subbarao, K. V., & Hertz, L. (1996). Acute and chronic effects of potassium and noradrenaline on Na⁺, K⁺-ATPase activity in cultured mouse neurons and astrocytes. *Neurochem Int*, 28(3), 335-342. [https://doi.org/10.1016/0197-0186\(95\)00081-x](https://doi.org/10.1016/0197-0186(95)00081-x)
- Hajjar, I., Catoe, H., Sixta, S., Boland, R., Johnson, D., Hirth, V., Wieland, D., & Eleazer, P. (2005). Cross-sectional and longitudinal association between antihypertensive medications and cognitive impairment in an elderly population. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 60(1), 67-73. <https://doi.org/10.1093/gerona/60.1.67>
- Hammerschmidt, T., Kummer, M. P., Terwel, D., Martinez, A., Gorji, A., Pape, H. C., Rommelfanger, K. S., Schroeder, J. P., Stoll, M., Schultze, J., Weinshenker, D., & Heneka, M. T. (2013). Selective loss of noradrenaline exacerbates early cognitive dysfunction and synaptic deficits in APP/PS1 mice. *Biol Psychiatry*, 73(5), 454-463. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2012.06.013>
- Hanseeuw, B. J., Betensky, R. A., Jacobs, H. I. L., Schultz, A. P., Sepulcre, J., Becker, J. A., Cosio, D. M. O., Farrell, M., Quiroz, Y. T., Mormino, E. C., Buckley, R. F., Papp, K. V., Amariglio, R. A., Dewachter, I., Ivanoiu, A., Huijbers, W., Hedden, T., Marshall, G. A., Chhatwal, J. P., . . . Johnson, K. (2019). Association of Amyloid and Tau With Cognition in Preclinical Alzheimer Disease: A Longitudinal Study. *JAMA Neurol*, 76(8), 915-924. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2019.1424>
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580), 353-356. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054), 184-185. <https://doi.org/10.1126/science.1566067>
- Harman, D. (2006). Alzheimer's disease pathogenesis: role of aging. *Ann N Y Acad Sci*, 1067, 454-460. <https://doi.org/10.1196/annals.1354.065>
- Headland, S. E., & Norling, L. V. (2015). The resolution of inflammation: Principles and challenges. *Semin Immunol*, 27(3), 149-160. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.03.014>

- Hebert, L. E., Scherr, P. A., Beckett, L. A., Albert, M. S., Pilgrim, D. M., Chown, M. J., Funkenstein, H. H., & Evans, D. A. (1995). Age-specific incidence of Alzheimer's disease in a community population. *Jama*, *273*(17), 1354-1359.
- Heneka, M. T., Galea, E., Gavrilyuk, V., Dumitrescu-Ozimek, L., Daeschner, J., O'Banion, M. K., Weinberg, G., Klockgether, T., & Feinstein, D. L. (2002). Noradrenergic depletion potentiates beta -amyloid-induced cortical inflammation: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci*, *22*(7), 2434-2442. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-07-02434.2002>
- Heneka, M. T., Kummer, M. P., & Latz, E. (2014). Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol*, *14*(7), 463-477. <https://doi.org/10.1038/nri3705>
- Heneka, M. T., Kummer, M. P., Stutz, A., Delekate, A., Schwartz, S., Vieira-Saecker, A., Griep, A., Axt, D., Remus, A., Tzeng, T.-C., Gelpi, E., Halle, A., Korte, M., Latz, E., & Golenbock, D. T. (2013). NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature*, *493*(7434), 674-678. <https://doi.org/10.1038/nature11729>
- Heneka, M. T., Nadrigny, F., Regen, T., Martinez-Hernandez, A., Dumitrescu-Ozimek, L., Terwel, D., Jardanhazi-Kurutz, D., Walter, J., Kirchhoff, F., Hanisch, U. K., & Kummer, M. P. (2010). Locus ceruleus controls Alzheimer's disease pathology by modulating microglial functions through norepinephrine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(13), 6058-6063. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909586107>
- Heneka, M. T., & O'Banion, M. K. (2007). Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroimmunology*, *184*(1), 69-91. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.11.017>
- Heneka, M. T., Ramanathan, M., Jacobs, A. H., Dumitrescu-Ozimek, L., Bilkei-Gorzo, A., Debeir, T., Sastre, M., Galldikis, N., Zimmer, A., Hoehn, M., Heiss, W. D., Klockgether, T., & Staufenbiel, M. (2006). Locus ceruleus degeneration promotes Alzheimer pathogenesis in amyloid precursor protein 23 transgenic mice. *J Neurosci*, *26*(5), 1343-1354. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4236-05.2006>
- Heneka, M. T., Sastre, M., Dumitrescu-Ozimek, L., Dewachter, I., Walter, J., Klockgether, T., & Van Leuven, F. (2005). Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice. *J Neuroinflammation*, *2*, 22. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-2-22>
- Heneka, M. T., Wiesinger, H., Dumitrescu-Ozimek, L., Riederer, P., Feinstein, D. L., & Klockgether, T. (2001). Neuronal and glial coexpression of argininosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, *60*(9), 906-916. <https://doi.org/10.1093/jnen/60.9.906>
- Herregodts, P., Bruyland, M., De Keyser, J., Solheid, C., Michotte, Y., & Ebinger, G. (1989). Monoaminergic neurotransmitters in Alzheimer's disease. An HPLC study comparing presenile familial and sporadic senile cases. *J Neurol Sci*, *92*(1), 101-116. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(89\)90179-2](https://doi.org/10.1016/0022-510x(89)90179-2)
- Hertz, L., Lovatt, D., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2010). Adrenoceptors in brain: cellular gene expression and effects on astrocytic metabolism and [Ca(2+)]i. *Neurochem Int*, *57*(4), 411-420. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.03.019>
- Hetier, E., Ayala, J., Bousseau, A., & Prochiantz, A. (1991). Modulation of interleukin-1 and tumor necrosis factor expression by beta-adrenergic agonists in mouse amoeboid microglial cells. *Exp Brain Res*, *86*(2), 407-413. <https://doi.org/10.1007/bf00228965>
- Hinojosa, A. E., Caso, J. R., Garcia-Bueno, B., Leza, J. C., & Madrigal, J. L. (2013). Dual effects of noradrenaline on astroglial production of chemokines and pro-inflammatory mediators. *J Neuroinflammation*, *10*, 81. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-10-81>
- Ho, L., Pieroni, C., Winger, D., Purohit, D. P., Aisen, P. S., & Pasinetti, G. M. (1999). Regional distribution of cyclooxygenase-2 in the hippocampal formation in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*, *57*(3), 295-303. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4547\(19990801\)57:3<295::Aid-jnr1>3.0.Co;2-0](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4547(19990801)57:3<295::Aid-jnr1>3.0.Co;2-0)

- Holland, N., Robbins, T. W., & Rowe, J. B. (2021). The role of noradrenaline in cognition and cognitive disorders. *Brain*, 144(8), 2243-2256. <https://doi.org/10.1093/brain/awab111>
- Holm, P. C., Rodríguez, F. J., Kresse, A., Canals, J. M., Silos-Santiago, I., & Arenas, E. (2003). Crucial role of TrkB ligands in the survival and phenotypic differentiation of developing locus coeruleus noradrenergic neurons. *Development*, 130(15), 3535-3545. <https://doi.org/10.1242/dev.00565>
- Hoogendijk, W. J., Pool, C. W., Troost, D., van Zwieten, E., & Swaab, D. F. (1995). Image analyser-assisted morphometry of the locus coeruleus in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 118 (Pt 1), 131-143. <https://doi.org/10.1093/brain/118.1.131>
- Howe, C. L., LaFrance-Corey, R. G., Goddery, E. N., Johnson, R. K., & Mirchia, K. (2017). Neuronal CCL2 expression drives inflammatory monocyte infiltration into the brain during acute virus infection. *J Neuroinflammation*, 14(1), 238. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-1015-2>
- Hughes, C. E., & Nibbs, R. J. B. (2018). A guide to chemokines and their receptors. *Febs j*, 285(16), 2944-2971. <https://doi.org/10.1111/febs.14466>
- Hughes, P. M., Allegrini, P. R., Rudin, M., Perry, V. H., Mir, A. K., & Wiessner, C. (2002). Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency is protective in a murine stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22(3), 308-317. <https://doi.org/10.1097/00004647-200203000-00008>
- Iannitelli, A. F., Kelberman, M. A., Lustberg, D. J., Korukonda, A., McCann, K. E., Mulvey, B., Segal, A., Liles, L. C., Sloan, S. A., Dougherty, J. D., & Weinschenker, D. (2022). The Neurotoxin DSP-4 Dysregulates the Locus Coeruleus-Norepinephrine System and Recapitulates Molecular and Behavioral Aspects of Prodromal Neurodegenerative Disease. *bioRxiv*, 2022.2009.2027.509797. <https://doi.org/10.1101/2022.09.27.509797>
- Igbavboa, U., Johnson-Anuna, L. N., Rossello, X., Butterick, T. A., Sun, G. Y., & Wood, W. G. (2006). Amyloid beta-protein1-42 increases cAMP and apolipoprotein E levels which are inhibited by beta1 and beta2-adrenergic receptor antagonists in mouse primary astrocytes. *Neuroscience*, 142(3), 655-660. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.06.056>
- Ingalhalikar, M., Smith, A., Parker, D., Satterthwaite, T. D., Elliott, M. A., Ruparel, K., Hakonarson, H., Gur, R. E., Gur, R. C., & Verma, R. (2014). Sex differences in the structural connectome of the human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(2), 823-828. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316909110>
- Iqbal, K., Liu, F., & Gong, C. X. (2016). Tau and neurodegenerative disease: the story so far. *Nat Rev Neurol*, 12(1), 15-27. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2015.225>
- Ishizuka, K., Kimura, T., Igata-yi, R., Katsuragi, S., Takamatsu, J., & Miyakawa, T. (1997). Identification of monocyte chemoattractant protein-1 in senile plaques and reactive microglia of Alzheimer's disease. *Psychiatry Clin Neurosci*, 51(3), 135-138. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1819.1997.tb02375.x>
- Iversen, L. L., Rossor, M. N., Reynolds, G. P., Hills, R., Roth, M., Mountjoy, C. Q., Foote, S. L., Morrison, J. H., & Bloom, F. E. (1983). Loss of pigmented dopamine-beta-hydroxylase positive cells from locus coeruleus in senile dementia of Alzheimer's type. *Neurosci Lett*, 39(1), 95-100. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(83\)90171-4](https://doi.org/10.1016/0304-3940(83)90171-4)
- Jack, C. R., Jr., Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Dunn, B., Haeberlein, S. B., Holtzman, D. M., Jagust, W., Jessen, F., Karlawish, J., Liu, E., Molinuevo, J. L., Montine, T., Phelps, C., Rankin, K. P., Rowe, C. C., Scheltens, P., Siemers, E., Snyder, H. M., & Sperling, R. (2018). NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 14(4), 535-562. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.02.018>
- Jacobs, H. I. L., Becker, J. A., Kwong, K., Engels-Dominguez, N., Prokopiou, P. C., Papp, K. V., Properzi, M., Hampton, O. L., d'Oleire Uquillas, F., Sanchez, J. S., Rentz, D. M., El Fakhri, G., Normandin, M. D., Price, J. C., Bennett, D. A., Sperling, R. A., & Johnson, K. A. (2021). In vivo and neuropathology data support locus coeruleus integrity as indicator of Alzheimer's disease pathology and cognitive decline. *Sci Transl Med*, 13(612), eabj2511. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abj2511>

- James, T., Kula, B., Choi, S., Khan, S. S., Bekar, L. K., & Smith, N. A. (2021). Locus coeruleus in memory formation and Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci*, *54*(8), 6948-6959. <https://doi.org/10.1111/ejn.15045>
- Jankowsky, J. L., & Zheng, H. (2017). Practical considerations for choosing a mouse model of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, *12*(1), 89. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0231-7>
- Jansen, I. E., Savage, J. E., Watanabe, K., Bryois, J., Williams, D. M., Steinberg, S., Sealock, J., Karlsson, I. K., Hägg, S., Athanasiu, L., Voyle, N., Proitsi, P., Witoelar, A., Stringer, S., Aarsland, D., Almdahl, I. S., Andersen, F., Bergh, S., Bettella, F., . . . Posthuma, D. (2019). Genome-wide meta-analysis identifies new loci and functional pathways influencing Alzheimer's disease risk. *Nat Genet*, *51*(3), 404-413. <https://doi.org/10.1038/s41588-018-0311-9>
- Janssen, K., Rickert, M., Clarner, T., Beyer, C., & Kipp, M. (2016). Absence of CCL2 and CCL3 Ameliorates Central Nervous System Grey Matter But Not White Matter Demyelination in the Presence of an Intact Blood-Brain Barrier. *Mol Neurobiol*, *53*(3), 1551-1564. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9113-6>
- Jardanhazi-Kurutz, D., Kummer, M. P., Terwel, D., Vogel, K., Dyrks, T., Thiele, A., & Heneka, M. T. (2010). Induced LC degeneration in APP/PS1 transgenic mice accelerates early cerebral amyloidosis and cognitive deficits. *Neurochem Int*, *57*(4), 375-382. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.02.001>
- Jardanhazi-Kurutz, D., Kummer, M. P., Terwel, D., Vogel, K., Thiele, A., & Heneka, M. T. (2011). Distinct adrenergic system changes and neuroinflammation in response to induced locus ceruleus degeneration in APP/PS1 transgenic mice. *Neuroscience*, *176*, 396-407. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.11.052>
- Jiang, Y., Tabak, L. A., Valente, A. J., & Graves, D. T. (1991). Initial characterization of the carbohydrate structure of MCP-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *178*(3), 1400-1404. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-291X\(91\)91049-I](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0006-291X(91)91049-I)
- Joly-Amado, A., Hunter, J., Quadri, Z., Zamudio, F., Rocha-Rangel, P. V., Chan, D., Kesarwani, A., Nash, K., Lee, D. C., Morgan, D., Gordon, M. N., & Selenica, M. B. (2020). CCL2 Overexpression in the Brain Promotes Glial Activation and Accelerates Tau Pathology in a Mouse Model of Tauopathy. *Front Immunol*, *11*, 997. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00997>
- Jonsson, T., Stefansson, H., Steinberg, S., Jonsdottir, I., Jonsson, P. V., Snaedal, J., Bjornsson, S., Huttenlocher, J., Levey, A. I., Lah, J. J., Rujescu, D., Hampel, H., Giegling, I., Andreassen, O. A., Engedal, K., Ulstein, I., Djurovic, S., Ibrahim-Verbaas, C., Hofman, A., . . . Stefansson, K. (2013). Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, *368*(2), 107-116. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211103>
- Josephs, K. A., Whitwell, J. L., Weigand, S. D., Murray, M. E., Tosakulwong, N., Liesinger, A. M., Petrucelli, L., Senjem, M. L., Knopman, D. S., Boeve, B. F., Ivnik, R. J., Smith, G. E., Jack, C. R., Jr., Parisi, J. E., Petersen, R. C., & Dickson, D. W. (2014). TDP-43 is a key player in the clinical features associated with Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, *127*(6), 811-824. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1269-z>
- Jung, H., Toth, P. T., White, F. A., & Miller, R. J. (2008). Monocyte chemoattractant protein-1 functions as a neuromodulator in dorsal root ganglia neurons. *J Neurochem*, *104*(1), 254-263. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04969.x>
- Juric, D. M., Loncar, D., & Carman-Krzan, M. (2008). Noradrenergic stimulation of BDNF synthesis in astrocytes: mediation via alpha1- and beta1/beta2-adrenergic receptors. *Neurochem Int*, *52*(1-2), 297-306. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2007.06.035>
- Kalaria, R. N. (1989). Characterization of [125I]HEAT binding to alpha 1-receptors in human brain: assessment in aging and Alzheimer's disease. *Brain Res*, *501*(2), 287-294. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)90645-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)90645-8)
- Kalaria, R. N., Andorn, A. C., Tabaton, M., Whitehouse, P. J., Harik, S. I., & Unnerstall, J. R. (1989). Adrenergic receptors in aging and Alzheimer's disease: increased beta 2-receptors in prefrontal

- cortex and hippocampus. *J Neurochem*, 53(6), 1772-1781. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1989.tb09242.x>
- Kalinin, S., Gavriilyuk, V., Polak, P. E., Vasser, R., Zhao, J., Heneka, M. T., & Feinstein, D. L. (2007). Noradrenaline deficiency in brain increases beta-amyloid plaque burden in an animal model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 28(8), 1206-1214. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.06.003>
- Kalinin, S., Polak, P. E., Lin, S. X., Sakharkar, A. J., Pandey, S. C., & Feinstein, D. L. (2012). The noradrenaline precursor L-DOPS reduces pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 33(8), 1651-1663. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2011.04.012>
- Kalinin, S., Polak, P. E., Madrigal, J. L., Gavriilyuk, V., Sharp, A., Chauhan, N., Marien, M., Colpaert, F., & Feinstein, D. L. (2006). Beta-amyloid-dependent expression of NOS2 in neurons: prevention by an alpha2-adrenergic antagonist. *Antioxid Redox Signal*, 8(5-6), 873-883. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.873>
- Kametani, F., & Hasegawa, M. (2018). Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*, 12, 25. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00025>
- Kang, S. S., Ahn, E. H., Liu, X., Bryson, M., Miller, G. W., Weinshenker, D., & Ye, K. (2021). ApoE4 inhibition of VMAT2 in the locus coeruleus exacerbates Tau pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 142(1), 139-158. <https://doi.org/10.1007/s00401-021-02315-1>
- Kang, S. S., Liu, X., Ahn, E. H., Xiang, J., Manfredsson, F. P., Yang, X., Luo, H. R., Liles, L. C., Weinshenker, D., & Ye, K. (2020). Norepinephrine metabolite DOPEGAL activates AEP and pathological Tau aggregation in locus coeruleus. *J Clin Invest*, 130(1), 422-437. <https://doi.org/10.1172/JCI1130513>
- Kang, S. S., Meng, L., Zhang, X., Wu, Z., Mancieri, A., Xie, B., Liu, X., Weinshenker, D., Peng, J., Zhang, Z., & Ye, K. (2022). Tau modification by the norepinephrine metabolite DOPEGAL stimulates its pathology and propagation. *Nat Struct Mol Biol*, 29(4), 292-305. <https://doi.org/10.1038/s41594-022-00745-3>
- Kantarci, A., Aytan, N., Palaska, I., Stephens, D., Crabtree, L., Benincasa, C., Jenkins, B. G., Carreras, I., & Dedeoglu, A. (2018). Combined administration of resolvin E1 and lipoxin A4 resolves inflammation in a murine model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol*, 300, 111-120. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.11.005>
- Kantzer, C. G., Boutin, C., Herzig, I. D., Wittwer, C., Reiß, S., Tiveron, M. C., Drewes, J., Rockel, T. D., Ohlig, S., Ninkovic, J., Cremer, H., Pennartz, S., Jungblut, M., & Bosio, A. (2017). Anti-ACSA-2 defines a novel monoclonal antibody for prospective isolation of living neonatal and adult astrocytes. *Glia*, 65(6), 990-1004. <https://doi.org/10.1002/glia.23140>
- Kato, T. A., Yamauchi, Y., Horikawa, H., Monji, A., Mizoguchi, Y., Seki, Y., Hayakawa, K., Utsumi, H., & Kanba, S. (2013). Neurotransmitters, psychotropic drugs and microglia: clinical implications for psychiatry. *Curr Med Chem*, 20(3), 331-344. <https://doi.org/10.2174/0929867311320030003>
- Katsouri, L., Vizcaychipi, M. P., McArthur, S., Harrison, I., Suarez-Calvet, M., Lleo, A., Lloyd, D. G., Ma, D., & Sastre, M. (2013). Prazosin, an alpha(1)-adrenoceptor antagonist, prevents memory deterioration in the APP23 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 34(4), 1105-1115. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.09.010>
- Katsumoto, A., Lu, H., Miranda, A. S., & Ransohoff, R. M. (2014). Ontogeny and functions of central nervous system macrophages. *J Immunol*, 193(6), 2615-2621. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400716>
- Kelder, W., McArthur, J. C., Nance-Sproson, T., McClernon, D., & Griffin, D. E. (1998). Beta-chemokines MCP-1 and RANTES are selectively increased in cerebrospinal fluid of patients with human immunodeficiency virus-associated dementia. *Ann Neurol*, 44(5), 831-835. <https://doi.org/10.1002/ana.410440521>
- Kelly, S. C., He, B., Perez, S. E., Ginsberg, S. D., Mufson, E. J., & Counts, S. E. (2017). Locus coeruleus cellular and molecular pathology during the progression of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun*, 5(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s40478-017-0411-2>

- Kennedy, B. P., Ziegler, M. G., Alford, M., Hansen, L. A., Thal, L. J., & Masliah, E. (2003). Early and persistent alterations in prefrontal cortex MAO A and B in Alzheimer's disease. *J Neural Transm (Vienna)*, *110*(7), 789-801. <https://doi.org/10.1007/s00702-003-0828-6>
- Khachaturian, A. S., Zandi, P. P., Lyketsos, C. G., Hayden, K. M., Skoog, I., Norton, M. C., Tschanz, J. T., Mayer, L. S., Welsh-Bohmer, K. A., & Breitner, J. C. (2006). Antihypertensive medication use and incident Alzheimer disease: the Cache County Study. *Arch Neurol*, *63*(5), 686-692. <https://doi.org/10.1001/archneur.63.5.noc60013>
- Kim, H. J., Kim, W., & Kong, S. Y. (2013). Antidepressants for neuro-regeneration: from depression to Alzheimer's disease. *Arch Pharm Res*, *36*(11), 1279-1290. <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0238-8>
- Kimura, A., Yoshikura, N., Hayashi, Y., & Inuzuka, T. (2018). Cerebrospinal Fluid C-C Motif Chemokine Ligand 2 Correlates with Brain Atrophy and Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, *61*(2), 581-588. <https://doi.org/10.3233/jad-170519>
- Kimura, R., & Ohno, M. (2009). Impairments in remote memory stabilization precede hippocampal synaptic and cognitive failures in 5XFAD Alzheimer mouse model. *Neurobiol Dis*, *33*(2), 229-235. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.10.006>
- Kinney, J. W., Bemiller, S. M., Murtishaw, A. S., Leisgang, A. M., Salazar, A. M., & Lamb, B. T. (2018). Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y)*, *4*, 575-590. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2018.06.014>
- Kitahama, K., Pearson, J., Denoroy, L., Kopp, N., Ulrich, J., Maeda, T., & Jouvett, M. (1985). Adrenergic neurons in human brain demonstrated by immunohistochemistry with antibodies to phenylethanolamine-N-methyltransferase (PNMT): discovery of a new group in the nucleus tractus solitarius. *Neurosci Lett*, *53*(3), 303-308. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(85\)90555-5](https://doi.org/10.1016/0304-3940(85)90555-5)
- Kitano, T., Eguchi, R., Okamoto-Ogura, Y., Yamaguchi, S., & Otsuguro, K.-i. (2021). Opposing functions of α - and β -adrenoceptors in the formation of processes by cultured astrocytes. *Journal of Pharmacological Sciences*, *145*(3), 228-240. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpsh.2020.12.005>
- Kivipelto, M., Mangialasche, F., & Ngandu, T. (2018). Lifestyle interventions to prevent cognitive impairment, dementia and Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*, *14*(11), 653-666. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0070-3>
- Kiyota, T., Gendelman, H. E., Weir, R. A., Higgins, E. E., Zhang, G., & Jain, M. (2013). CCL2 affects β -amyloidosis and progressive neurocognitive dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, *34*(4), 1060-1068. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.08.009>
- Kiyota, T., Morrison, C. M., Tu, G., Dyavarshetty, B., Weir, R. A., Zhang, G., Xiong, H., & Gendelman, H. E. (2015). Presenilin-1 familial Alzheimer's disease mutation alters hippocampal neurogenesis and memory function in CCL2 null mice. *Brain Behav Immun*, *49*, 311-321. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.06.014>
- Kiyota, T., Yamamoto, M., Xiong, H., Lambert, M. P., Klein, W. L., Gendelman, H. E., Ransohoff, R. M., & Ikezu, T. (2009). CCL2 accelerates microglia-mediated Abeta oligomer formation and progression of neurocognitive dysfunction. *PLoS One*, *4*(7), e6197. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006197>
- Knopman, D. S., Parisi, J. E., Salviati, A., Floriach-Robert, M., Boeve, B. F., Ivnik, R. J., Smith, G. E., Dickson, D. W., Johnson, K. A., Petersen, L. E., McDonald, W. C., Braak, H., & Petersen, R. C. (2003). Neuropathology of cognitively normal elderly. *J Neuropathol Exp Neurol*, *62*(11), 1087-1095. <https://doi.org/10.1093/jnen/62.11.1087>
- Kong, Y., Ruan, L., Qian, L., Liu, X., & Le, Y. (2010). Norepinephrine promotes microglia to uptake and degrade amyloid beta peptide through upregulation of mouse formyl peptide receptor 2 and induction of insulin-degrading enzyme. *J Neurosci*, *30*(35), 11848-11857. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2985-10.2010>

- Koppel, J., Jimenez, H., Adrien, L., E, H. C., Malhotra, A. K., & Davies, P. (2019). Increased tau phosphorylation follows impeded dopamine clearance in a P301L and novel P301L/COMT-deleted (DM) tau mouse model. *J Neurochem*, *148*(1), 127-135. <https://doi.org/10.1111/jnc.14593>
- Kowalska, A. (2004). Genetic aspects of amyloid beta-protein fibrillogenesis in Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol*, *42*(4), 235-237.
- Kowalski, K., & Mulak, A. (2019). Brain-Gut-Microbiota Axis in Alzheimer's Disease. *J Neurogastroenterol Motil*, *25*(1), 48-60. <https://doi.org/10.5056/jnm18087>
- Kroner, Z. (2009). The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: Type 3 diabetes? *Altern Med Rev*, *14*(4), 373-379.
- Kummer, M. P., Hammerschmidt, T., Martinez, A., Terwel, D., Eichele, G., Witten, A., Figura, S., Stoll, M., Schwartz, S., Pape, H. C., Schultze, J. L., Weinschenker, D., Heneka, M. T., & Urban, I. (2014). Ear2 deletion causes early memory and learning deficits in APP/PS1 mice. *J Neurosci*, *34*(26), 8845-8854. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4027-13.2014>
- Lacor, P. N., Buniel, M. C., Furlow, P. W., Clemente, A. S., Velasco, P. T., Wood, M., Viola, K. L., & Klein, W. L. (2007). Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, *27*(4), 796-807. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3501-06.2007>
- Laing, K. J., & Secombes, C. J. (2004). Chemokines. *Dev Comp Immunol*, *28*(5), 443-460. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2003.09.006>
- Lambert, J. C., Ibrahim-Verbaas, C. A., Harold, D., Naj, A. C., Sims, R., Bellenguez, C., DeStafano, A. L., Bis, J. C., Beecham, G. W., Grenier-Boley, B., Russo, G., Thorton-Wells, T. A., Jones, N., Smith, A. V., Chouraki, V., Thomas, C., Ikram, M. A., Zelenika, D., Vardarajan, B. N., . . . Amouyel, P. (2013). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet*, *45*(12), 1452-1458. <https://doi.org/10.1038/ng.2802>
- Lanctot, K. L., Amatniek, J., Ancoli-Israel, S., Arnold, S. E., Ballard, C., Cohen-Mansfield, J., Ismail, Z., Lyketsos, C., Miller, D. S., Musiek, E., Osorio, R. S., Rosenberg, P. B., Satlin, A., Steffens, D., Tariot, P., Bain, L. J., Carrillo, M. C., Hendrix, J. A., Jurgens, H., & Boot, B. (2017). Neuropsychiatric signs and symptoms of Alzheimer's disease: New treatment paradigms. *Alzheimers Dement (N Y)*, *3*(3), 440-449. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2017.07.001>
- Lanctot, K. L., Chau, S. A., Herrmann, N., Drye, L. T., Rosenberg, P. B., Scherer, R. W., Black, S. E., Vaidya, V., Bachman, D. L., & Mintzer, J. E. (2014). Effect of methylphenidate on attention in apathetic AD patients in a randomized, placebo-controlled trial. *Int Psychogeriatr*, *26*(2), 239-246. <https://doi.org/10.1017/S1041610213001762>
- Lara-Doña, A., Torres-Sanchez, S., Priego-Torres, B., Berrocoso, E., & Sanchez-Morillo, D. (2021). Automated Mouse Pupil Size Measurement System to Assess Locus Coeruleus Activity with a Deep Learning-Based Approach. *Sensors (Basel)*, *21*(21). <https://doi.org/10.3390/s21217106>
- Law, C. S. W., & Yeong, K. Y. (2021). Repurposing Antihypertensive Drugs for the Management of Alzheimer's Disease. *Curr Med Chem*, *28*(9), 1716-1730. <https://doi.org/10.2174/0929867327666200312114223>
- Lee, W. J., Liao, Y. C., Wang, Y. F., Lin, I. F., Wang, S. J., & Fuh, J. L. (2018). Plasma MCP-1 and Cognitive Decline in Patients with Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment: A Two-year Follow-up Study. *Sci Rep*, *8*(1), 1280. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19807-y>
- Lemmer, B., Langer, L., Ohm, T., & Bohl, J. (1993). Beta-adrenoceptor density and subtype distribution in cerebellum and hippocampus from patients with Alzheimer's disease. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, *347*(2), 214-219. <https://doi.org/10.1007/BF00169270>
- Leng, F., & Edison, P. (2021). Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nat Rev Neurol*, *17*(3), 157-172. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y>

- Leng, F., & Edison, P. (2021). Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nature Reviews Neurology*, 17(3), 157-172. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-00435-y>
- Levey, A. I., Qiu, D., Zhao, L., Hu, W. T., Duong, D. M., Higginbotham, L., Dammer, E. B., Seyfried, N. T., Wingo, T. S., Hales, C. M., Gamez Tansey, M., Goldstein, D. S., Abrol, A., Calhoun, V. D., Goldstein, F. C., Hajjar, I., Fagan, A. M., Galasko, D., Edland, S. D., . . . Weinschenker, D. (2022). A phase II study repurposing atomoxetine for neuroprotection in mild cognitive impairment. *Brain*, 145(6), 1924-1938. <https://doi.org/10.1093/brain/awab452>
- Levy, F. (2009). Dopamine vs noradrenaline: inverted-U effects and ADHD theories. *Aust N Z J Psychiatry*, 43(2), 101-108. <https://doi.org/10.1080/00048670802607238>
- Li, C., Wu, X., Liu, S., Shen, D., Zhu, J., & Liu, K. (2020). Role of Resolvins in the Inflammatory Resolution of Neurological Diseases. *Front Pharmacol*, 11, 612. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00612>
- Li, J., Pan, L., Pembroke, W. G., Rexach, J. E., Godoy, M. I., Condro, M. C., Alvarado, A. G., Harteni, M., Chen, Y.-W., Stiles, L., Chen, A. Y., Wanner, I. B., Yang, X., Goldman, S. A., Geschwind, D. H., Kornblum, H. I., & Zhang, Y. (2021). Conservation and divergence of vulnerability and responses to stressors between human and mouse astrocytes. *Nature Communications*, 12(1), 3958. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24232-3>
- Li, L., Acioglu, C., Heary, R. F., & Elkabes, S. (2021). Role of astroglial toll-like receptors (TLRs) in central nervous system infections, injury and neurodegenerative diseases. *Brain Behav Immun*, 91, 740-755. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.10.007>
- Li, R., & Singh, M. (2014). Sex differences in cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Front Neuroendocrinol*, 35(3), 385-403. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.01.002>
- Lithfous, S., Dufour, A., & Després, O. (2013). Spatial navigation in normal aging and the prodromal stage of Alzheimer's disease: insights from imaging and behavioral studies. *Ageing Res Rev*, 12(1), 201-213. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.04.007>
- Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Hart, G. W., & Gong, C. X. (2004). O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(29), 10804-10809. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400348101>
- Liu, H., Leak, R. K., & Hu, X. (2016). Neurotransmitter receptors on microglia. *Stroke Vasc Neurol*, 1(2), 52-58. <https://doi.org/10.1136/svn-2016-000012>
- Liu, X., Ye, K., & Weinschenker, D. (2015). Norepinephrine Protects against Amyloid- β Toxicity via TrkB. *J Alzheimers Dis*, 44(1), 251-260. <https://doi.org/10.3233/jad-141062>
- Liu, X. S., Zhang, Z. G., Zhang, R. L., Gregg, S. R., Wang, L., Yier, T., & Chopp, M. (2007). Chemokine ligand 2 (CCL2) induces migration and differentiation of subventricular zone cells after stroke. *J Neurosci Res*, 85(10), 2120-2125. <https://doi.org/10.1002/jnr.21359>
- Liu, Y. U., Ying, Y., Li, Y., Eyo, U. B., Chen, T., Zheng, J., Umpierre, A. D., Zhu, J., Bosco, D. B., Dong, H., & Wu, L. J. (2019). Neuronal network activity controls microglial process surveillance in awake mice via norepinephrine signaling. *Nat Neurosci*, 22(11), 1771-1781. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0511-3>
- Livingston, G., Huntley, J., Sommerlad, A., Ames, D., Ballard, C., Banerjee, S., Brayne, C., Burns, A., Cohen-Mansfield, J., Cooper, C., Costafreda, S. G., Dias, A., Fox, N., Gitlin, L. N., Howard, R., Kales, H. C., Kivimäki, M., Larson, E. B., Ogunniyi, A., . . . Mukadam, N. (2020). Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *Lancet*, 396(10248), 413-446. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30367-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30367-6)
- Lleó, A., Núñez-Llaves, R., Alcolea, D., Chiva, C., Balateu-Paños, D., Colom-Cadena, M., Gomez-Giro, G., Muñoz, L., Querol-Vilaseca, M., Pegueroles, J., Rami, L., Lladó, A., Molinuevo, J. L., Tainta, M., Clarimón, J., Spires-Jones, T., Blesa, R., Fortea, J., Martínez-Lage, P., . . . Belbin, O. (2019). Changes in Synaptic Proteins Precede Neurodegeneration Markers in Preclinical Alzheimer's Disease Cerebrospinal Fluid*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 18(3), 546-560. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/mcp.RA118.001290>

- Loughlin, S. E., Foote, S. L., & Grzanna, R. (1986). Efferent projections of nucleus locus coeruleus: morphologic subpopulations have different efferent targets. *Neuroscience*, *18*(2), 307-319. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(86\)90156-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(86)90156-9)
- Lue, L. F., Brachova, L., Civin, W. H., & Rogers, J. (1996). Inflammation, A beta deposition, and neurofibrillary tangle formation as correlates of Alzheimer's disease neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol*, *55*(10), 1083-1088. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8858005>
- Luong, K., & Nguyen, L. T. (2013). The role of Beta-adrenergic receptor blockers in Alzheimer's disease: potential genetic and cellular signaling mechanisms. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*, *28*(5), 427-439. <https://doi.org/10.1177/1533317513488924>
- Luster, A. D. (1998). Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*, *338*(7), 436-445. <https://doi.org/10.1056/nejm199802123380706>
- Madrigal, J. L., & Caso, J. R. (2014). The chemokine (C-C motif) ligand 2 in neuroinflammation and neurodegeneration. *Adv Exp Med Biol*, *824*, 209-219. https://doi.org/10.1007/978-3-319-07320-0_15
- Madrigal, J. L., Feinstein, D. L., & Dello Russo, C. (2005). Norepinephrine protects cortical neurons against microglial-induced cell death. *J Neurosci Res*, *81*(3), 390-396. <https://doi.org/10.1002/jnr.20481>
- Madrigal, J. L., Leza, J. C., Polak, P., Kalinin, S., & Feinstein, D. L. (2009). Astrocyte-derived MCP-1 mediates neuroprotective effects of noradrenaline. *J Neurosci*, *29*(1), 263-267. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4926-08.2009>
- Magdesian, M. H., Carvalho, M. M., Mendes, F. A., Saraiva, L. M., Juliano, M. A., Juliano, L., Garcia-Abreu, J., & Ferreira, S. T. (2008). Amyloid-beta binds to the extracellular cysteine-rich domain of Frizzled and inhibits Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Chem*, *283*(14), 9359-9368. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707108200>
- Mahad, D. J., & Ransohoff, R. M. (2003). The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Semin Immunol*, *15*(1), 23-32. [https://doi.org/10.1016/s1044-5323\(02\)00125-2](https://doi.org/10.1016/s1044-5323(02)00125-2)
- MahmoudianDehkordi, S., Arnold, M., Nho, K., Ahmad, S., Jia, W., Xie, G., Louie, G., Kueider-Paisley, A., Moseley, M. A., Thompson, J. W., St John Williams, L., Tenenbaum, J. D., Blach, C., Baillie, R., Han, X., Bhattacharyya, S., Toledo, J. B., Schafferer, S., Klein, S., . . . Kaddurah-Daouk, R. (2019). Altered bile acid profile associates with cognitive impairment in Alzheimer's disease-An emerging role for gut microbiome. *Alzheimers Dement*, *15*(1), 76-92. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2018.07.217>
- Malatt, C., & Tagliati, M. (2022). The role of the locus coeruleus/norepinephrine system in the pathogenesis of neurodegenerative disorders: An update. *Curr Opin Neurol*, *35*(2), 220-229. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000001042>
- Malhotra, P. A. (2019). Impairments of attention in Alzheimer's disease. *Curr Opin Psychol*, *29*, 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.copsyc.2018.11.002>
- Mann, D. M., & Yates, P. O. (1983). Pathological basis for neurotransmitter changes in Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *9*(1), 3-19. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1983.tb00320.x>
- Mann, D. M., Yates, P. O., & Marcyniuk, B. (1984). A comparison of changes in the nucleus basalis and locus caeruleus in Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *47*(2), 201-203. <https://doi.org/10.1136/jnnp.47.2.201>
- Marien, M. R., Colpaert, F. C., & Rosenquist, A. C. (2004). Noradrenergic mechanisms in neurodegenerative diseases: a theory. *Brain Res Brain Res Rev*, *45*(1), 38-78. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2004.02.002>
- Markianos, M., Koutsis, G., Evangelopoulos, M. E., Mandellos, D., Karahalios, G., & Sfagos, C. (2009). Relationship of CSF neurotransmitter metabolite levels to disease severity and disability in multiple sclerosis. *J Neurochem*, *108*(1), 158-164. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05750.x>

- Markx, D., Schuhholz, J., Abadier, M., Beier, S., Lang, M., & Moepps, B. (2019). Arginine 313 of the putative 8th helix mediates Gαq/14 coupling of human CC chemokine receptors CCR2a and CCR2b. *Cellular Signalling*, 53, 170-183. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.10.007>
- Marques, S., van Bruggen, D., Vanichkina, D. P., Floriddia, E. M., Munguba, H., Våremo, L., Giacomello, S., Falcão, A. M., Meijer, M., Björklund Å, K., Hjerling-Leffler, J., Taft, R. J., & Castelo-Branco, G. (2018). Transcriptional Convergence of Oligodendrocyte Lineage Progenitors during Development. *Dev Cell*, 46(4), 504-517.e507. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.07.005>
- Martignoni, E., Blandini, F., Petraglia, F., Pacchetti, C., Bono, G., & Nappi, G. (1992). Cerebrospinal fluid norepinephrine, 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol and neuropeptide Y levels in Parkinson's disease, multiple system atrophy and dementia of the Alzheimer type. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*, 4(3), 191-205. <https://doi.org/10.1007/BF02260903>
- Masliah, E. (1995). Mechanisms of synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Histol Histopathol*, 10(2), 509-519.
- Masliah, E., Iwai, A., Mallory, M., Uéda, K., & Saitoh, T. (1996). Altered presynaptic protein NACP is associated with plaque formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 148(1), 201-210.
- Masliah, E., Mallory, M., Alford, M., DeTeresa, R., Hansen, L. A., McKeel, D. W., Jr., & Morris, J. C. (2001). Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology*, 56(1), 127-129. <https://doi.org/10.1212/wnl.56.1.127>
- Matchett, B. J., Grinberg, L. T., Theofilas, P., & Murray, M. E. (2021). The mechanistic link between selective vulnerability of the locus coeruleus and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 141(5), 631-650. <https://doi.org/10.1007/s00401-020-02248-1>
- Mather, M., Clewett, D., Sakaki, M., & Harley, C. W. (2016). Norepinephrine ignites local hotspots of neuronal excitation: How arousal amplifies selectivity in perception and memory. *Behav Brain Sci*, 39, e200. <https://doi.org/10.1017/S0140525X15000667>
- Mathys, H., Davila-Velderrain, J., Peng, Z., Gao, F., Mohammadi, S., Young, J. Z., Menon, M., He, L., Abdurrob, F., Jiang, X., Martorell, A. J., Ransohoff, R. M., Hafler, B. P., Bennett, D. A., Kellis, M., & Tsai, L. H. (2019). Single-cell transcriptomic analysis of Alzheimer's disease. *Nature*, 570(7761), 332-337. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1195-2>
- Matthews, D. C., Ritter, A., Thomas, R. G., Andrews, R. D., Lukic, A. S., Revta, C., Kinney, J. W., Tousi, B., Leverenz, J. B., Fillit, H., Zhong, K., Feldman, H. H., & Cummings, J. (2021). Rasagiline effects on glucose metabolism, cognition, and tau in Alzheimer's dementia. *Alzheimers Dement (N Y)*, 7(1), e12106. <https://doi.org/10.1002/trc2.12106>
- Matthews, K. L., Chen, C. P., Esiri, M. M., Keene, J., Minger, S. L., & Francis, P. T. (2002). Noradrenergic changes, aggressive behavior, and cognition in patients with dementia. *Biol Psychiatry*, 51(5), 407-416. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(01\)01235-5](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(01)01235-5)
- Matti, N., Javanshiri, K., Haglund, M., Saenz-Sarda, X., & Englund, E. (2022). Locus Coeruleus Degeneration Differs Between Frontotemporal Lobar Degeneration Subtypes. *J Alzheimers Dis*, 89(2), 463-471. <https://doi.org/10.3233/JAD-220276>
- McAlpine, C. S., Park, J., Griciuc, A., Kim, E., Choi, S. H., Iwamoto, Y., Kiss, M. G., Christie, K. A., Vinegoni, C., Poller, W. C., Mindur, J. E., Chan, C. T., He, S., Janssen, H., Wong, L. P., Downey, J., Singh, S., Anzai, A., Kahles, F., . . . Swirski, F. K. (2021). Astrocytic interleukin-3 programs microglia and limits Alzheimer's disease. *Nature*, 595(7869), 701-706. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03734-6>
- McKhann, G., Drachman, D., Folstein, M., Katzman, R., Price, D., & Stadlan, E. M. (1984). Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*, 34(7), 939-944. <https://doi.org/10.1212/wnl.34.7.939>
- McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R., Jr., Kawas, C. H., Klunk, W. E., Koroshetz, W. J., Manly, J. J., Mayeux, R., Mohs, R. C., Morris, J. C., Rossor, M. N.,

- Scheltens, P., Carrillo, M. C., Thies, B., Weintraub, S., & Phelps, C. H. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 7(3), 263-269. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005>
- McNamee, E. N., Ryan, K. M., Griffin, E. W., González-Reyes, R. E., Ryan, K. J., Harkin, A., & Connor, T. J. (2010). Noradrenaline acting at central beta-adrenoceptors induces interleukin-10 and suppressor of cytokine signaling-3 expression in rat brain: implications for neurodegeneration. *Brain Behav Immun*, 24(4), 660-671. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.02.005>
- McNamee, E. N., Ryan, K. M., Kilroy, D., & Connor, T. J. (2010). Noradrenaline induces IL-1ra and IL-1 type II receptor expression in primary glial cells and protects against IL-1beta-induced neurotoxicity. *Eur J Pharmacol*, 626(2-3), 219-228. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.09.054>
- Medeiros, R., Kitazawa, M., Passos, G. F., Baglietto-Vargas, D., Cheng, D., Cribbs, D. H., & LaFerla, F. M. (2013). Aspirin-Triggered Lipoxin A4 Stimulates Alternative Activation of Microglia and Reduces Alzheimer Disease-Like Pathology in Mice. *The American Journal of Pathology*, 182(5), 1780-1789. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.01.051>
- Mélik-Parsadaniantz, S., & Rostène, W. (2008). Chemokines and neuromodulation. *J Neuroimmunol*, 198(1-2), 62-68. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.04.022>
- Mendez, M. F. (2019). Early-onset Alzheimer Disease and Its Variants. *Continuum (Minneapolis)*, 25(1), 34-51. <https://doi.org/10.1212/con.0000000000000687>
- Meneses, A., Koga, S., O'Leary, J., Dickson, D. W., Bu, G., & Zhao, N. (2021). TDP-43 Pathology in Alzheimer's Disease. *Mol Neurodegener*, 16(1), 84. <https://doi.org/10.1186/s13024-021-00503-x>
- Mercan, D., & Heneka, M. T. (2022). The Contribution of the Locus Coeruleus-Noradrenaline System Degeneration during the Progression of Alzheimer's Disease. *Biology (Basel)*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/biology11121822>
- Merlini, G. (2017). AL amyloidosis: from molecular mechanisms to targeted therapies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2017(1), 1-12. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2017.1.1>
- Merrill, C. A., Jonsson, M. A., Minthon, L., Egnell, H., H, C. s. S., Blennow, K., Karlsson, M., Nordlund, A., Rolstad, S., Warkentin, S., Ben-Menachem, E., & Sjogren, M. J. (2006). Vagus nerve stimulation in patients with Alzheimer's disease: Additional follow-up results of a pilot study through 1 year. *J Clin Psychiatry*, 67(8), 1171-1178. <https://doi.org/10.4088/jcp.v67n0801>
- Mesulam, M. M. (2013). Cholinergic circuitry of the human nucleus basalis and its fate in Alzheimer's disease. *J Comp Neurol*, 521(18), 4124-4144. <https://doi.org/10.1002/cne.23415>
- Mielke, M. M. (2018). Sex and Gender Differences in Alzheimer's Disease Dementia. *Psychiatr Times*, 35(11), 14-17.
- Mintzer, J., Lanctôt, K. L., Scherer, R. W., Rosenberg, P. B., Herrmann, N., van Dyck, C. H., Padala, P. R., Brawman-Mintzer, O., Porsteinsson, A. P., Lerner, A. J., Craft, S., Levey, A. I., Burke, W., Perin, J., & Shade, D. (2021). Effect of Methylphenidate on Apathy in Patients With Alzheimer Disease: The ADMET 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol*, 78(11), 1324-1332. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2021.3356>
- Misrani, A., Tabassum, S., & Yang, L. (2021). Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease [Review]. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.617588>
- Miyazawa, K., Fukunaga, H., Tatewaki, Y., Takano, Y., Yamamoto, S., Mutoh, T., & Taki, Y. (2020). Alzheimer's Disease and Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators: Do MaR1, RvD1, and NPD1 Show Promise for Prevention and Treatment? *Int J Mol Sci*, 21(16). <https://doi.org/10.3390/ijms21165783>
- Mizwicki, M. T., Liu, G., Fiala, M., Magpantay, L., Sayre, J., Siani, A., Mahanian, M., Weitzman, R., Hayden, E. Y., Rosenthal, M. J., Nemere, I., Ringman, J., & Teplow, D. B. (2013). 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and resolvin D1 retune the balance between amyloid- β phagocytosis and

- inflammation in Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis*, 34(1), 155-170. <https://doi.org/10.3233/jad-121735>
- Moreno-Garcia, A., Kun, A., Calero, M., & Calero, O. (2021). The Neuromelanin Paradox and Its Dual Role in Oxidative Stress and Neurodegeneration. *Antioxidants (Basel)*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/antiox10010124>
- Morgese, M. G., & Trabace, L. (2019). Monoaminergic System Modulation in Depression and Alzheimer's Disease: A New Standpoint? *Front Pharmacol*, 10, 483. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00483>
- Mori, K., Ozaki, E., Zhang, B., Yang, L., Yokoyama, A., Takeda, I., Maeda, N., Sakanaka, M., & Tanaka, J. (2002). Effects of norepinephrine on rat cultured microglial cells that express alpha1, alpha2, beta1 and beta2 adrenergic receptors. *Neuropharmacology*, 43(6), 1026-1034. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(02\)00211-3](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(02)00211-3)
- Motley, S. E. (2018). Relationship Between Neuromodulation and Working Memory in the Prefrontal Cortex: It's Complicated. *Front Neural Circuits*, 12, 31. <https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00031>
- Moussaud, S., Jones, D. R., Moussaud-Lamodière, E. L., Delenclos, M., Ross, O. A., & McLean, P. J. (2014). Alpha-synuclein and tau: teammates in neurodegeneration? *Mol Neurodegener*, 9, 43. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-43>
- Mravec, B., Lejavova, K., & Cubinkova, V. (2014). Locus (coeruleus) minoris resistentiae in pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, 11(10), 992-1001. <https://doi.org/10.2174/1567205011666141107130505>
- Mueller, A., Hong, D. S., Shepard, S., & Moore, T. (2017). Linking ADHD to the Neural Circuitry of Attention. *Trends Cogn Sci*, 21(6), 474-488. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2017.03.009>
- Müller, U. C., Deller, T., & Korte, M. (2017). Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(5), 281-298. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.29>
- Mulvey, B., Bhatti, D. L., Gyawali, S., Lake, A. M., Kriaucionis, S., Ford, C. P., Bruchas, M. R., Heintz, N., & Dougherty, J. D. (2018). Molecular and Functional Sex Differences of Noradrenergic Neurons in the Mouse Locus Coeruleus. *Cell Reports*, 23(8), 2225-2235. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.054>
- Munoz-Moreno, E., Tudela, R., Lopez-Gil, X., & Soria, G. (2018). Early brain connectivity alterations and cognitive impairment in a rat model of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*, 10(1), 16. <https://doi.org/10.1186/s13195-018-0346-2>
- Mustapic, M., Presecki, P., Pivac, N., Mimica, N., Hof, P. R., Simic, G., Folnegovic-Smalc, V., & Muck-Seler, D. (2013). Genotype-independent decrease in plasma dopamine beta-hydroxylase activity in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 44, 94-99. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.02.002>
- 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. *J Neurosci*, 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. *J Mol Cell Biol*, 5(5), 284-293. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjt028>
- Nazarali, A. J., & Reynolds, G. P. (1992). Monoamine neurotransmitters and their metabolites in brain regions in Alzheimer's disease: a postmortem study. *Cell Mol Neurobiol*, 12(6), 581-587. <https://doi.org/10.1007/BF00711237>
- Nelson, P. T., Head, E., Schmitt, F. A., Davis, P. R., Neltner, J. H., Jicha, G. A., Abner, E. L., Smith, C. D., Van Eldik, L. J., Kryscio, R. J., & Scheff, S. W. (2011). Alzheimer's disease is not "brain aging": neuropathological, genetic, and epidemiological human studies. *Acta Neuropathol*, 121(5), 571-587. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0826-y>
- Neuner, S. M., Heuer, S. E., Huentelman, M. J., O'Connell, K. M. S., & Kaczorowski, C. C. (2019). Harnessing Genetic Complexity to Enhance Translatability of Alzheimer's Disease Mouse

- Models: A Path toward Precision Medicine. *Neuron*, 101(3), 399-411.e395. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.11.040>
- Ngandu, T., Lehtisalo, J., Solomon, A., Levälähti, E., Ahtiluoto, S., Antikainen, R., Bäckman, L., Hänninen, T., Jula, A., Laatikainen, T., Lindström, J., Mangialasche, F., Paajanen, T., Pajala, S., Peltonen, M., Rauramaa, R., Stigsdotter-Neely, A., Strandberg, T., Tuomilehto, J., . . . Kivipelto, M. (2015). A 2 year multidomain intervention of diet, exercise, cognitive training, and vascular risk monitoring versus control to prevent cognitive decline in at-risk elderly people (FINGER): a randomised controlled trial. *Lancet*, 385(9984), 2255-2263. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(15\)60461-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(15)60461-5)
- Ni, Y., Zhao, X., Bao, G., Zou, L., Teng, L., Wang, Z., Song, M., Xiong, J., Bai, Y., & Pei, G. (2006). Activation of beta2-adrenergic receptor stimulates gamma-secretase activity and accelerates amyloid plaque formation. *Nat Med*, 12(12), 1390-1396. <https://doi.org/10.1038/nm1485>
- Nilsson, P., Saito, T., & Saido, T. C. (2014). New Mouse Model of Alzheimer's. *ACS Chemical Neuroscience*, 5(7), 499-502. <https://doi.org/10.1021/cn500105p>
- Niu, H., Álvarez-Álvarez, I., Guillén-Grima, F., & Aguinaga-Ontoso, I. (2017). Prevalence and incidence of Alzheimer's disease in Europe: A meta-analysis. *Neurologia*, 32(8), 523-532. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2016.02.016> (Prevalencia e incidencia de la enfermedad de Alzheimer en Europa: metaanálisis.)
- Nordengen, K., Kirsebom, B. E., Henjum, K., Selnes, P., Gísladóttir, B., Wettergreen, M., Torsetnes, S. B., Grøntvedt, G. R., Waterloo, K. K., Aarsland, D., Nilsson, L. N. G., & Fladby, T. (2019). Glial activation and inflammation along the Alzheimer's disease continuum. *J Neuroinflammation*, 16(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1399-2>
- O'Donnell, J., Zeppenfeld, D., McConnell, E., Pena, S., & Nedergaard, M. (2012). Norepinephrine: a neuromodulator that boosts the function of multiple cell types to optimize CNS performance. *Neurochem Res*, 37(11), 2496-2512. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0818-x>
- O'Sullivan, J. B., Ryan, K. M., Curtin, N. M., Harkin, A., & Connor, T. J. (2009). Noradrenaline reuptake inhibitors limit neuroinflammation in rat cortex following a systemic inflammatory challenge: implications for depression and neurodegeneration. *Int J Neuropsychopharmacol*, 12(5), 687-699. <https://doi.org/10.1017/S146114570800967X>
- O'Sullivan, J. B., Ryan, K. M., Harkin, A., & Connor, T. J. (2010). Noradrenaline reuptake inhibitors inhibit expression of chemokines IP-10 and RANTES and cell adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1 in the CNS following a systemic inflammatory challenge. *J Neuroimmunol*, 220(1-2), 34-42. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.12.007>
- Oakley, H., Cole, S. L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Van Eldik, L., Berry, R., & Vassar, R. (2006). Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci*, 26(40), 10129-10140. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1202-06.2006>
- Oh, J., Eser, R. A., Ehrenberg, A. J., Morales, D., Petersen, C., Kudlacek, J., Dunlop, S. R., Theofilas, P., Resende, E., Cosme, C., Alho, E. J. L., Spina, S., Walsh, C. M., Miller, B. L., Seeley, W. W., Bittencourt, J. C., Neylan, T. C., Heinsen, H., & Grinberg, L. T. (2019). Profound degeneration of wake-promoting neurons in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 15(10), 1253-1263. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.06.3916>
- Okamura, N., & Yanai, K. (2017). Brain imaging: Applications of tau PET imaging. *Nat Rev Neurol*, 13(4), 197-198. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.38>
- Oz, M., Lorke, D. E., Yang, K. H., & Petroianu, G. (2013). On the interaction of β -amyloid peptides and $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, 10(6), 618-630. <https://doi.org/10.2174/15672050113109990132>
- Ozgen, H., Spijkerman, R., Noack, M., Holtmann, M., Schellekens, A., Dalsgaard, S., van den Brink, W., & Hendriks, V. (2021). Treatment of Adolescents with Concurrent Substance Use Disorder and Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder: A Systematic Review. *J Clin Med*, 10(17). <https://doi.org/10.3390/jcm10173908>

- Palop, J. J., & Mucke, L. (2010). Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks. *Nat Neurosci*, *13*(7), 812-818. <https://doi.org/10.1038/nn.2583>
- Pamphlett, R. (2014). Uptake of environmental toxicants by the locus ceruleus: a potential trigger for neurodegenerative, demyelinating and psychiatric disorders. *Med Hypotheses*, *82*(1), 97-104. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2013.11.016>
- Pamphlett, R., Bishop, D. P., Kum Jew, S., & Doble, P. A. (2018). Age-related accumulation of toxic metals in the human locus ceruleus. *PLoS One*, *13*(9), e0203627. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203627>
- Paredes-Rodriguez, E., Vegas-Suarez, S., Morera-Herreras, T., De Deurwaerdere, P., & Miguez, C. (2020). The Noradrenergic System in Parkinson's Disease. *Front Pharmacol*, *11*, 435. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00435>
- Pascual, J., Grijalba, B., Garcia-Sevilla, J. A., Zarranz, J. J., & Pazos, A. (1992). Loss of high-affinity alpha 2-adrenoceptors in Alzheimer's disease: an autoradiographic study in frontal cortex and hippocampus. *Neurosci Lett*, *142*(1), 36-40. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90614-d](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90614-d)
- Pasinetti, G. M., & Aisen, P. S. (1998). Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neuroscience*, *87*(2), 319-324. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(98\)00218-8](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(98)00218-8)
- Penney, J., Ralvenius, W. T., & Tsai, L.-H. (2020). Modeling Alzheimer's disease with iPSC-derived brain cells. *Molecular Psychiatry*, *25*(1), 148-167. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0468-3>
- Penney, J., Ralvenius, W. T., & Tsai, L. H. (2020). Modeling Alzheimer's disease with iPSC-derived brain cells. *Mol Psychiatry*, *25*(1), 148-167. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0468-3>
- Perry, R. J., & Hodges, J. R. (1999). Attention and executive deficits in Alzheimer's disease. A critical review. *Brain*, *122* (Pt 3), 383-404. <https://doi.org/10.1093/brain/122.3.383>
- Peskind, E. R., Tsuang, D. W., Bonner, L. T., Pascualy, M., Riekse, R. G., Snowden, M. B., Thomas, R., & Raskind, M. A. (2005). Propranolol for disruptive behaviors in nursing home residents with probable or possible Alzheimer disease: a placebo-controlled study. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, *19*(1), 23-28. <https://doi.org/10.1097/01.wad.0000155067.16313.5e>
- Petersen, R. C., Lopez, O., Armstrong, M. J., Getchius, T. S. D., Ganguli, M., Gloss, D., Gronseth, G. S., Marson, D., Pringsheim, T., Day, G. S., Sager, M., Stevens, J., & Rae-Grant, A. (2018). Practice guideline update summary: Mild cognitive impairment: Report of the Guideline Development, Dissemination, and Implementation Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology*, *90*(3), 126-135. <https://doi.org/10.1212/wnl.0000000000004826>
- Phillips, C., Fahimi, A., Das, D., Mojabi, F. S., Ponnusamy, R., & Salehi, A. (2016). Noradrenergic System in Down Syndrome and Alzheimer's Disease A Target for Therapy. *Curr Alzheimer Res*, *13*(1), 68-83. <https://doi.org/10.2174/1567205012666150921095924>
- Pillet, L. E., Taccola, C., Cotoni, J., Thiriez, H., Andre, K., & Verpillot, R. (2020). Correlation between cognition and plasma noradrenaline level in Alzheimer's disease: a potential new blood marker of disease evolution. *Transl Psychiatry*, *10*(1), 213. <https://doi.org/10.1038/s41398-020-0841-7>
- Pini, L., Pievani, M., Bocchetta, M., Altomare, D., Bosco, P., Cavedo, E., Galluzzi, S., Marizzoni, M., & Frisoni, G. B. (2016). Brain atrophy in Alzheimer's Disease and aging. *Ageing Research Reviews*, *30*, 25-48. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.01.002>
- Pletnikova, O., Kageyama, Y., Rudow, G., LaClair, K. D., Albert, M., Crain, B. J., Tian, J., Fowler, D., & Troncoso, J. C. (2018). The spectrum of preclinical Alzheimer's disease pathology and its modulation by ApoE genotype. *Neurobiol Aging*, *71*, 72-80. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.07.007>
- Plini, E. R. G., O'Hanlon, E., Boyle, R., Sibilia, F., Rikhye, G., Kenney, J., Whelan, R., Melnychuk, M. C., Robertson, I. H., & Dockree, P. M. (2021). Examining the Role of the Noradrenergic Locus Coeruleus for Predicting Attention and Brain Maintenance in Healthy Old Age and Disease: An MRI Structural Study for the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. *Cells*, *10*(7). <https://doi.org/10.3390/cells10071829>

- Polak, P. E., Kalinin, S., & Feinstein, D. L. (2011). Locus coeruleus damage and noradrenaline reductions in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain*, *134*(Pt 3), 665-677. <https://doi.org/10.1093/brain/awq362>
- Potter, P. E., Rauschkolb, P. K., Pandya, Y., Sue, L. I., Sabbagh, M. N., Walker, D. G., & Beach, T. G. (2011). Pre- and post-synaptic cortical cholinergic deficits are proportional to amyloid plaque presence and density at preclinical stages of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, *122*(1), 49-60. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0831-1>
- Prokopiou, P. C., Engels-Dominguez, N., Papp, K. V., Scott, M. R., Schultz, A. P., Schneider, C., Farrell, M. E., Buckley, R. F., Quiroz, Y. T., El Fakhri, G., Rentz, D. M., Sperling, R. A., Johnson, K. A., & Jacobs, H. I. L. (2022). Lower novelty-related locus coeruleus function is associated with Abeta-related cognitive decline in clinically healthy individuals. *Nat Commun*, *13*(1), 1571. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28986-2>
- Proost, P., Struyf, S., Couvreur, M., Lenaerts, J. P., Conings, R., Menten, P., Verhaert, P., Wuyts, A., & Van Damme, J. (1998). Posttranslational modifications affect the activity of the human monocyte chemotactic proteins MCP-1 and MCP-2: identification of MCP-2(6-76) as a natural chemokine inhibitor. *J Immunol*, *160*(8), 4034-4041.
- Pugh, P. L., Vidgeon-Hart, M. P., Ashmeade, T., Culbert, A. A., Seymour, Z., Perren, M. J., Joyce, F., Bate, S. T., Babin, A., Virley, D. J., Richardson, J. C., Upton, N., & Sunter, D. (2007). Repeated administration of the noradrenergic neurotoxin N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP-4) modulates neuroinflammation and amyloid plaque load in mice bearing amyloid precursor protein and presenilin-1 mutant transgenes. *J Neuroinflammation*, *4*, 8. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-4-8>
- Puzzo, D., Lee, L., Palmeri, A., Calabrese, G., & Arancio, O. (2014). Behavioral assays with mouse models of Alzheimer's disease: practical considerations and guidelines. *Biochem Pharmacol*, *88*(4), 450-467. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.01.011>
- Quach, T. T., Duchemin, A. M., Rose, C., & Schwartz, J. C. (1988). [3H]glycogenolysis in brain slices mediated by beta-adrenoceptors: comparison of physiological response and [3H]dihydroalprenolol binding parameters. *Neuropharmacology*, *27*(6), 629-635. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(88\)90185-2](https://doi.org/10.1016/0028-3908(88)90185-2)
- Raichle, M. E., Hartman, B. K., Eichling, J. O., & Sharpe, L. G. (1975). Central noradrenergic regulation of cerebral blood flow and vascular permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *72*(9), 3726-3730. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.9.3726>
- Rajda, C., Bencsik, K., Fuvesi, J., Seres, E., Vecsei, L., & Bergquist, J. (2006). The norepinephrine level is decreased in the lymphocytes of long-term interferon-beta-treated multiple sclerosis patients. *Mult Scler*, *12*(3), 265-270. <https://doi.org/10.1191/135248506ms1269oa>
- Ramos, B. P., & Arnsten, A. F. (2007). Adrenergic pharmacology and cognition: focus on the prefrontal cortex. *Pharmacol Ther*, *113*(3), 523-536. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2006.11.006>
- Rankine, E. L., Hughes, P. M., Botham, M. S., Perry, V. H., & Felton, L. M. (2006). Brain cytokine synthesis induced by an intraparenchymal injection of LPS is reduced in MCP-1-deficient mice prior to leucocyte recruitment. *Eur J Neurosci*, *24*(1), 77-86. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04891.x>
- Ravichandran, K. A., & Heneka, M. T. (2021). Inflammasome activation in neurodegenerative diseases. *Essays Biochem*, *65*(7), 885-904. <https://doi.org/10.1042/ebc20210021>
- Reale, M., Iarlori, C., Thomas, A., Gambi, D., Perfetti, B., Di Nicola, M., & Onofri, M. (2009). Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease. *Brain Behav Immun*, *23*(1), 55-63. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2008.07.003>
- Reinikainen, K. J., Paljarvi, L., Huuskonen, M., Soininen, H., Laakso, M., & Riekkinen, P. J. (1988). A post-mortem study of noradrenergic, serotonergic and GABAergic neurons in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*, *84*(1), 101-116. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(88\)90179-7](https://doi.org/10.1016/0022-510x(88)90179-7)

- Reiss, A. B., Arain, H. A., Stecker, M. M., Siegart, N. M., & Kasselmann, L. J. (2018). Amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *Rev Neurosci*, 29(6), 613-627. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0063>
- Renner, M., Lacor, P. N., Velasco, P. T., Xu, J., Contractor, A., Klein, W. L., & Triller, A. (2010). Deleterious effects of amyloid beta oligomers acting as an extracellular scaffold for mGluR5. *Neuron*, 66(5), 739-754. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.04.029>
- Ries, M., & Sastre, M. (2016). Mechanisms of A β Clearance and Degradation by Glial Cells. *Front Aging Neurosci*, 8, 160. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00160>
- Riley, K. P., Snowdon, D. A., Desrosiers, M. F., & Markesbery, W. R. (2005). Early life linguistic ability, late life cognitive function, and neuropathology: findings from the Nun Study. *Neurobiol Aging*, 26(3), 341-347. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.06.019>
- Riphagen, J. M., van Egroo, M., & Jacobs, H. I. L. (2021). Elevated Norepinephrine Metabolism Gauges Alzheimer's Disease-Related Pathology and Memory Decline. *J Alzheimers Dis*, 80(2), 521-526. <https://doi.org/10.3233/JAD-201411>
- Rizk, P., Salazar, J., Raisman-Vozari, R., Marien, M., Ruberg, M., Colpaert, F., & Debeir, T. (2006). The alpha2-adrenoceptor antagonist dexefaroxan enhances hippocampal neurogenesis by increasing the survival and differentiation of new granule cells. *Neuropsychopharmacology*, 31(6), 1146-1157. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300954>
- Robinson, J. L., Lee, E. B., Xie, S. X., Rennert, L., Suh, E., Bredenberg, C., Caswell, C., Van Deerlin, V. M., Yan, N., Yousef, A., Hurtig, H. I., Siderowf, A., Grossman, M., McMillan, C. T., Miller, B., Duda, J. E., Irwin, D. J., Wolk, D., Elman, L., . . . Trojanowski, J. Q. (2018). Neurodegenerative disease concomitant proteinopathies are prevalent, age-related and APOE4-associated. *Brain*, 141(7), 2181-2193. <https://doi.org/10.1093/brain/awy146>
- Roblek, M., Protsyuk, D., Becker, P. F., Stefanescu, C., Gorzelanny, C., Glaus Garzon, J. F., Knopfova, L., Heikenwalder, M., Luckow, B., Schneider, S. W., & Borsig, L. (2019). CCL2 Is a Vascular Permeability Factor Inducing CCR2-Dependent Endothelial Retraction during Lung Metastasis. *Mol Cancer Res*, 17(3), 783-793. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.Mcr-18-0530>
- Rogers, J., Luber-Narod, J., Styren, S. D., & Civin, W. H. (1988). Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: relationship to the pathology of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 9(4), 339-349. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(88\)80079-4](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(88)80079-4)
- Rommelfanger, K. S., & Weinshenker, D. (2007). Norepinephrine: The redheaded stepchild of Parkinson's disease. *Biochem Pharmacol*, 74(2), 177-190. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.01.036>
- Rorabaugh, J. M., Chalermpananupap, T., Botz-Zapp, C. A., Fu, V. M., Lembeck, N. A., Cohen, R. M., & Weinshenker, D. (2017). Chemogenetic locus coeruleus activation restores reversal learning in a rat model of Alzheimer's disease. *Brain*, 140(11), 3023-3038. <https://doi.org/10.1093/brain/awx232>
- Rosenberg, P. B., Mielke, M. M., Tschanz, J., Cook, L., Corcoran, C., Hayden, K. M., Norton, M., Rabins, P. V., Green, R. C., Welsh-Bohmer, K. A., Breitner, J. C., Munger, R., & Lyketsos, C. G. (2008). Effects of cardiovascular medications on rate of functional decline in Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry*, 16(11), 883-892. <https://doi.org/10.1097/JGP.0b013e318181276a>
- Ross, J. A., McGonigle, P., & Van Bockstaele, E. J. (2015). Locus Coeruleus, norepinephrine and A β peptides in Alzheimer's disease. *Neurobiol Stress*, 2, 73-84. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2015.09.002>
- Ross, S. B., & Stenfors, C. (2015). DSP4, a selective neurotoxin for the locus coeruleus noradrenergic system. A review of its mode of action. *Neurotox Res*, 27(1), 15-30. <https://doi.org/10.1007/s12640-014-9482-z>
- Rossi, D., & Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol*, 18, 217-242. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.217>

- Ruigrok, A. N., Salimi-Khorshidi, G., Lai, M. C., Baron-Cohen, S., Lombardo, M. V., Tait, R. J., & Suckling, J. (2014). A meta-analysis of sex differences in human brain structure. *Neurosci Biobehav Rev*, 39(100), 34-50. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.12.004>
- Ruiz, J., Martin, I., Callado, L. F., Meana, J. J., Barturen, F., & Garcia-Sevilla, J. A. (1993). Non-adrenoceptor [3H]idazoxan binding sites (12-imidazoline sites) are increased in postmortem brain from patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 160(1), 109-112. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(93\)90925-b](https://doi.org/10.1016/0304-3940(93)90925-b)
- Sakono, M., & Zako, T. (2010). Amyloid oligomers: formation and toxicity of Abeta oligomers. *Febs j*, 277(6), 1348-1358. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07568.x>
- Samsonov, A., Yu, J. Z., Rasenick, M., & Popov, S. V. (2004). Tau interaction with microtubules in vivo. *J Cell Sci*, 117(Pt 25), 6129-6141. <https://doi.org/10.1242/jcs.01531>
- Samuels, E. R., & Szabadi, E. (2008). Functional neuroanatomy of the noradrenergic locus coeruleus: its roles in the regulation of arousal and autonomic function part I: principles of functional organisation. *Curr Neuropharmacol*, 6(3), 235-253. <https://doi.org/10.2174/157015908785777229>
- Sanchez-Padilla, J., Guzman, J. N., Ilijic, E., Kondapalli, J., Galtieri, D. J., Yang, B., Schieber, S., Oertel, W., Wokosin, D., Schumacker, P. T., & Surmeier, D. J. (2014). Mitochondrial oxidant stress in locus coeruleus is regulated by activity and nitric oxide synthase. *Nat Neurosci*, 17(6), 832-840. <https://doi.org/10.1038/nn.3717>
- Sara, S. J., & Bouret, S. (2012). Orienting and reorienting: the locus coeruleus mediates cognition through arousal. *Neuron*, 76(1), 130-141. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.09.011>
- Scaduto, P., Lauterborn, J. C., Cox, C. D., Fracassi, A., Zeppillo, T., Gutierrez, B. A., Keene, C. D., Crane, P. K., Mukherjee, S., Russell, W. K., Tagliatela, G., & Limon, A. (2022). Functional excitatory to inhibitory synaptic imbalance and loss of cognitive performance in people with Alzheimer's disease neuropathologic change. *Acta Neuropathol*. <https://doi.org/10.1007/s00401-022-02526-0>
- Scanzano, A., & Cosentino, M. (2015). Adrenergic regulation of innate immunity: a review. *Front Pharmacol*, 6, 171. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00171>
- Scheffer, S., Hermkens, D. M. A., van der Weerd, L., de Vries, H. E., & Daemen, M. (2021). Vascular Hypothesis of Alzheimer Disease: Topical Review of Mouse Models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 41(4), 1265-1283. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.311911>
- Scheltens, P., De Strooper, B., Kivipelto, M., Holstege, H., Chételat, G., Teunissen, C. E., Cummings, J., & van der Flier, W. M. (2021). Alzheimer's disease. *Lancet*, 397(10284), 1577-1590. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)32205-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)32205-4)
- Schlachetzki, J. C., Fiebich, B. L., Haake, E., de Oliveira, A. C., Candelario-Jalil, E., Heneka, M. T., & Hull, M. (2010). Norepinephrine enhances the LPS-induced expression of COX-2 and secretion of PGE2 in primary rat microglia. *J Neuroinflammation*, 7, 2. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-2>
- Schmitz Nunes, V., Rogerio, A. P., & Abrahao, O., Jr. (2020). Insights into the Activation Mechanism of the ALX/FPR2 Receptor. *J Phys Chem Lett*, 11(21), 8952-8957. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.0c02052>
- Schneider, J. A., Aggarwal, N. T., Barnes, L., Boyle, P., & Bennett, D. A. (2009). The neuropathology of older persons with and without dementia from community versus clinic cohorts. *J Alzheimers Dis*, 18(3), 691-701. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1227>
- Schwartz, M., & Baruch, K. (2014). The resolution of neuroinflammation in neurodegeneration: leukocyte recruitment via the choroid plexus. *EMBO J*, 33(1), 7-22. <https://doi.org/10.1002/emboj.201386609>
- Scullion, G. A., Kendall, D. A., Marsden, C. A., Sunter, D., & Pardon, M. C. (2011). Chronic treatment with the alpha2-adrenoceptor antagonist fluparoxan prevents age-related deficits in spatial working memory in APPxPS1 transgenic mice without altering beta-amyloid plaque load or

- astrocytosis. *Neuropharmacology*, 60(2-3), 223-234. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.09.002>
- Seaks, C. E., & Wilcock, D. M. (2020). Infectious hypothesis of Alzheimer disease. *PLoS Pathog*, 16(11), e1008596. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008596>
- Selkoe, D. J. (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*, 298(5594), 789-791. <https://doi.org/10.1126/science.1074069>
- Semple, B. D., Bye, N., Rancan, M., Ziebell, J. M., & Morganti-Kossmann, M. C. (2010). Role of CCL2 (MCP-1) in traumatic brain injury (TBI): evidence from severe TBI patients and CCL2^{-/-} mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 30(4), 769-782. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.262>
- Semple, B. D., Frugier, T., & Morganti-Kossmann, M. C. (2010). CCL2 modulates cytokine production in cultured mouse astrocytes. *Journal of Neuroinflammation*, 7(1), 67. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-7-67>
- Semple, B. D., Kossmann, T., & Morganti-Kossmann, M. C. (2010). Role of chemokines in CNS health and pathology: a focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/CXCR2 networks. *J Cereb Blood Flow Metab*, 30(3), 459-473. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.240>
- Serhan, C. N. (2014). Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*, 510(7503), 92-101. <https://doi.org/10.1038/nature13479>
- Severini, C., Passeri, P. P., Ciotti, M., Florenzano, F., Possenti, R., Zona, C., Di Matteo, A., Guglielmotti, A., Calissano, P., Pachter, J., & Mercanti, D. (2014). Bindarit, inhibitor of CCL2 synthesis, protects neurons against amyloid- β -induced toxicity. *J Alzheimers Dis*, 38(2), 281-293. <https://doi.org/10.3233/jad-131070>
- Shahnawaz, M., & Soto, C. (2012). Microcin amyloid fibrils A are reservoir of toxic oligomeric species. *J Biol Chem*, 287(15), 11665-11676. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.282533>
- Shankle, W. R., Nielson, K. A., & Cotman, C. W. (1995). Low-dose propranolol reduces aggression and agitation resembling that associated with orbitofrontal dysfunction in elderly demented patients. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 9(4), 233-237.
- Shim, K. H., Kang, M. J., Youn, Y. C., An, S. S. A., & Kim, S. (2022). Alpha-synuclein: a pathological factor with A β and tau and biomarker in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*, 14(1), 201. <https://doi.org/10.1186/s13195-022-01150-0>
- Shimohama, S., Taniguchi, T., Fujiwara, M., & Kameyama, M. (1986). Biochemical characterization of alpha-adrenergic receptors in human brain and changes in Alzheimer-type dementia. *J Neurochem*, 47(4), 1295-1301. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3018166>
- Sil, A., Erfani, A., Lamb, N., Copland, R., Riedel, G., & Platt, B. (2022). Sex Differences in Behavior and Molecular Pathology in the 5XFAD Model. *J Alzheimers Dis*, 85(2), 755-778. <https://doi.org/10.3233/jad-210523>
- Singh, S. (2020). Noradrenergic pathways of locus coeruleus in Parkinson's and Alzheimer's pathology. *Int J Neurosci*, 130(3), 251-261. <https://doi.org/10.1080/00207454.2019.1667799>
- Sjogren, M. J., Hellstrom, P. T., Jonsson, M. A., Runnerstam, M., Silander, H. C., & Ben-Menachem, E. (2002). Cognition-enhancing effect of vagus nerve stimulation in patients with Alzheimer's disease: a pilot study. *J Clin Psychiatry*, 63(11), 972-980. <https://doi.org/10.4088/jcp.v63n1103>
- Slater, C., & Wang, Q. (2021). Alzheimer's disease: An evolving understanding of noradrenergic involvement and the promising future of electroceutical therapies. *Clin Transl Med*, 11(4), e397. <https://doi.org/10.1002/ctm2.397>
- Sofroniew, M. V. (2020). Astrocyte Reactivity: Subtypes, States, and Functions in CNS Innate Immunity. *Trends Immunol*, 41(9), 758-770. <https://doi.org/10.1016/j.it.2020.07.004>
- Sokolova, A., Hill, M. D., Rahimi, F., Warden, L. A., Halliday, G. M., & Shepherd, C. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 plays a dominant role in the chronic inflammation observed in Alzheimer's disease. *Brain Pathol*, 19(3), 392-398. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2008.00188.x>

- Song, L., & Pachter, J. S. (2004). Monocyte chemoattractant protein-1 alters expression of tight junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells. *Microvasc Res*, 67(1), 78-89. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2003.07.001>
- Sozzani, S., Zhou, D., Locati, M., Rieppi, M., Proost, P., Magazin, M., Vita, N., van Damme, J., & Mantovani, A. (1994). Receptors and transduction pathways for monocyte chemotactic protein-2 and monocyte chemotactic protein-3. Similarities and differences with MCP-1. *J Immunol*, 152(7), 3615-3622.
- Sparks, D. L., DeKosky, S. T., & Markesbery, W. R. (1988). Alzheimer's disease. Aminergic-cholinergic alterations in hypothalamus. *Arch Neurol*, 45(9), 994-999. <https://doi.org/10.1001/archneur.1988.00520330084014>
- Speicher, A. M., Wiendl, H., Meuth, S. G., & Pawlowski, M. (2019). Generating microglia from human pluripotent stem cells: novel in vitro models for the study of neurodegeneration. *Mol Neurodegener*, 14(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0347-z>
- Steininger, T. S., Stutz, H., & Kerschbaum, H. H. (2011). Beta-adrenergic stimulation suppresses phagocytosis via Epac activation in murine microglial cells. *Brain Res*, 1407, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.06.050>
- Stowell, R. D., Sipe, G. O., Dawes, R. P., Batchelor, H. N., Lordy, K. A., Whitelaw, B. S., Stoessel, M. B., Bidlack, J. M., Brown, E., Sur, M., & Majewska, A. K. (2019). Noradrenergic signaling in the wakeful state inhibits microglial surveillance and synaptic plasticity in the mouse visual cortex. *Nat Neurosci*, 22(11), 1782-1792. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0514-0>
- Strassnig, M., & Ganguli, M. (2005). About a peculiar disease of the cerebral cortex: Alzheimer's original case revisited. *Psychiatry (Edgmont)*, 2(9), 30-33.
- Strosberg, A. D. (1993). Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. *Protein Sci*, 2(8), 1198-1209. <https://doi.org/10.1002/pro.5560020802>
- Sugama, S., Takenouchi, T., Hashimoto, M., Ohata, H., Takenaka, Y., & Kakinuma, Y. (2019). Stress-induced microglial activation occurs through β -adrenergic receptor: noradrenaline as a key neurotransmitter in microglial activation. *J Neuroinflammation*, 16(1), 266. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1632-z>
- Summers, W. K. (2006). The management of agitation in demented patients with propranolol. *J Alzheimers Dis*, 9(1), 69-75. <https://doi.org/10.3233/jad-2006-9107>
- Svensson, E., Apergis-Schoute, J., Burnstock, G., Nusbaum, M. P., Parker, D., & Schiöth, H. B. (2018). General Principles of Neuronal Co-transmission: Insights From Multiple Model Systems. *Front Neural Circuits*, 12, 117. <https://doi.org/10.3389/fncir.2018.00117>
- Swardfager, W., Lanctôt, K., Rothenburg, L., Wong, A., Cappell, J., & Herrmann, N. (2010). A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*, 68(10), 930-941. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.06.012>
- Swerdlow, R. H. (2011). Brain aging, Alzheimer's disease, and mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1812(12), 1630-1639. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.08.012>
- Swerdlow, R. H., Burns, J. M., & Khan, S. M. (2014). The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives. *Biochim Biophys Acta*, 1842(8), 1219-1231. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.09.010>
- Swerdlow, R. H., & Khan, S. M. (2004). A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease. *Med Hypotheses*, 63(1), 8-20. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2003.12.045>
- Szot, P., White, S. S., Greenup, J. L., Leverenz, J. B., Peskind, E. R., & Raskind, M. A. (2006). Compensatory changes in the noradrenergic nervous system in the locus ceruleus and hippocampus of postmortem subjects with Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *J Neurosci*, 26(2), 467-478. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4265-05.2006>
- Szot, P., White, S. S., Greenup, J. L., Leverenz, J. B., Peskind, E. R., & Raskind, M. A. (2007). Changes in adrenoceptors in the prefrontal cortex of subjects with dementia: evidence of compensatory changes. *Neuroscience*, 146(1), 471-480. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.01.031>

- Takeuchi, H., Iba, M., Inoue, H., Higuchi, M., Takao, K., Tsukita, K., Karatsu, Y., Iwamoto, Y., Miyakawa, T., Suhara, T., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., & Takahashi, R. (2011). P301S mutant human tau transgenic mice manifest early symptoms of human tauopathies with dementia and altered sensorimotor gating. *PLoS One*, *6*(6), e21050. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021050>
- Tanaka, K. F., Kashima, H., Suzuki, H., Ono, K., & Sawada, M. (2002). Existence of functional beta1- and beta2-adrenergic receptors on microglia. *J Neurosci Res*, *70*(2), 232-237. <https://doi.org/10.1002/jnr.10399>
- Tank, A. W., & Lee Wong, D. (2015). Peripheral and central effects of circulating catecholamines. *Compr Physiol*, *5*(1), 1-15. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140007>
- Tarasoff-Conway, J. M., Carare, R. O., Osorio, R. S., Glodzik, L., Butler, T., Fieremans, E., Axel, L., Rusinek, H., Nicholson, C., Zlokovic, B. V., Frangione, B., Blennow, K., Ménard, J., Zetterberg, H., Wisniewski, T., & de Leon, M. J. (2015). Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*, *11*(8), 457-470. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.119>
- Tatulian, S. A. (2022). Challenges and hopes for Alzheimer's disease. *Drug Discovery Today*, *27*(4), 1027-1043. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.01.016>
- Tellechea, P., Pujol, N., Esteve-Belloch, P., Echeveste, B., Garcia-Eulate, M. R., Arbizu, J., & Riverol, M. (2018). Early- and late-onset Alzheimer disease: Are they the same entity? *Neurologia (Engl Ed)*, *33*(4), 244-253. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2015.08.002> (Enfermedad de Alzheimer de inicio precoz y de inicio tardío: ¿invertida la misma entidad?)
- Terry, A. V., Jr., & Buccafusco, J. J. (2003). The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J Pharmacol Exp Ther*, *306*(3), 821-827. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.041616>
- Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., Hansen, L. A., & Katzman, R. (1991). Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann Neurol*, *30*(4), 572-580. <https://doi.org/10.1002/ana.410300410>
- Thal, D. R., Rub, U., Orantes, M., & Braak, H. (2002). Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*, *58*(12), 1791-1800. <https://doi.org/10.1212/wnl.58.12.1791>
- Thal, D. R., Rub, U., Schultz, C., Sassin, I., Ghebremedhin, E., Del Tredici, K., Braak, E., & Braak, H. (2000). Sequence of A beta-protein deposition in the human medial temporal lobe. *J Neuropathol Exp Neurol*, *59*(8), 733-748. <https://doi.org/10.1093/jnen/59.8.733>
- Theofilas, P., Ehrenberg, A. J., Dunlop, S., Di Lorenzo Alho, A. T., Nguy, A., Leite, R. E. P., Rodriguez, R. D., Mejia, M. B., Suemoto, C. K., Ferretti-Rebustini, R. E. L., Polichiso, L., Nascimento, C. F., Seeley, W. W., Nitrini, R., Pasqualucci, C. A., Jacob Filho, W., Rueb, U., Neuhaus, J., Heinsen, H., & Grinberg, L. T. (2017). Locus coeruleus volume and cell population changes during Alzheimer's disease progression: A stereological study in human postmortem brains with potential implication for early-stage biomarker discovery. *Alzheimers Dement*, *13*(3), 236-246. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.06.2362>
- Theofilas, P., Ehrenberg, A. J., Nguy, A., Thackrey, J. M., Dunlop, S., Mejia, M. B., Alho, A. T., Paraizo Leite, R. E., Rodriguez, R. D., Suemoto, C. K., Nascimento, C. F., Chin, M., Medina-Cleghorn, D., Cuervo, A. M., Arkin, M., Seeley, W. W., Miller, B. L., Nitrini, R., Pasqualucci, C. A., . . . Grinberg, L. T. (2018). Probing the correlation of neuronal loss, neurofibrillary tangles, and cell death markers across the Alzheimer's disease Braak stages: a quantitative study in humans. *Neurobiol Aging*, *61*, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.09.007>
- Thomas, S. A., Marck, B. T., Palmiter, R. D., & Matsumoto, A. M. (1998). Restoration of norepinephrine and reversal of phenotypes in mice lacking dopamine beta-hydroxylase. *J Neurochem*, *70*(6), 2468-2476. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70062468.x>
- Tiffany, H. L., Lavigne, M. C., Cui, Y. H., Wang, J. M., Leto, T. L., Gao, J. L., & Murphy, P. M. (2001). Amyloid-beta induces chemotaxis and oxidant stress by acting at formylpeptide receptor 2, a G protein-coupled receptor expressed in phagocytes and brain. *J Biol Chem*, *276*(26), 23645-23652. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101031200>

- Tillement, L., Lecanu, L., & Papadopoulos, V. (2011). Alzheimer's disease: effects of β -amyloid on mitochondria. *Mitochondrion*, 11(1), 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.08.009>
- Tobore, T. O. (2019). On the central role of mitochondria dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurol Sci*, 40(8), 1527-1540. <https://doi.org/10.1007/s10072-019-03863-x>
- Tohgi, H., Ueno, M., Abe, T., Takahashi, S., & Nozaki, Y. (1992). Concentrations of monoamines and their metabolites in the cerebrospinal fluid from patients with senile dementia of the Alzheimer type and vascular dementia of the Binswanger type. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*, 4(1), 69-77. <https://doi.org/10.1007/BF02257623>
- Tom, S. E., Hubbard, R. A., Crane, P. K., Haneuse, S. J., Bowen, J., McCormick, W. C., McCurry, S., & Larson, E. B. (2015). Characterization of dementia and Alzheimer's disease in an older population: updated incidence and life expectancy with and without dementia. *Am J Public Health*, 105(2), 408-413. <https://doi.org/10.2105/ajph.2014.301935>
- Tomlinson, B. E., Irving, D., & Blessed, G. (1981). Cell loss in the locus coeruleus in senile dementia of Alzheimer type. *J Neurol Sci*, 49(3), 419-428. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(81\)90031-9](https://doi.org/10.1016/0022-510x(81)90031-9)
- Tran, P. B., Ren, D., Veldhouse, T. J., & Miller, R. J. (2004). Chemokine receptors are expressed widely by embryonic and adult neural progenitor cells. *J Neurosci Res*, 76(1), 20-34. <https://doi.org/10.1002/jnr.20001>
- Tsunekawa, H., Noda, Y., Mouri, A., Yoneda, F., & Nabeshima, T. (2008). Synergistic effects of selegiline and donepezil on cognitive impairment induced by amyloid beta (25-35). *Behav Brain Res*, 190(2), 224-232. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.03.002>
- Tzioras, M., McGeachan, R. I., Durrant, C. S., & Spires-Jones, T. L. (2023). Synaptic degeneration in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*, 19(1), 19-38. <https://doi.org/10.1038/s41582-022-00749-z>
- Uematsu, A., Tan, B. Z., & Johansen, J. P. (2015). Projection specificity in heterogeneous locus coeruleus cell populations: implications for learning and memory. *Learn Mem*, 22(9), 444-451. <https://doi.org/10.1101/lm.037283.114>
- Ulke, C., Rullmann, M., Huang, J., Luthardt, J., Becker, G. A., Patt, M., Meyer, P. M., Tjepolt, S., Hesse, S., Sabri, O., & Strauss, M. (2019). Adult attention-deficit/hyperactivity disorder is associated with reduced norepinephrine transporter availability in right attention networks: a (S,S)-O-[(11)C]methylreboxetine positron emission tomography study. *Transl Psychiatry*, 9(1), 301. <https://doi.org/10.1038/s41398-019-0619-y>
- V. Euler, U. S. (1945). A Sympathomometric Pressor Substance in Animal Organ Extracts. *Nature*, 156(3949), 18-19. <https://doi.org/10.1038/156018b0>
- van der Lee, S. J., Wolters, F. J., Ikram, M. K., Hofman, A., Ikram, M. A., Amin, N., & van Duijn, C. M. (2018). The effect of APOE and other common genetic variants on the onset of Alzheimer's disease and dementia: a community-based cohort study. *Lancet Neurol*, 17(5), 434-444. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(18\)30053-x](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(18)30053-x)
- Van Egroo, M., van Hooren, R. W. E., & Jacobs, H. I. L. (2021). Associations between locus coeruleus integrity and nocturnal awakenings in the context of Alzheimer's disease plasma biomarkers: a 7T MRI study. *Alzheimers Res Ther*, 13(1), 159. <https://doi.org/10.1186/s13195-021-00902-8>
- van Hooren, R. W. E., Verhey, F. R. J., Ramakers, I., Jansen, W. J., & Jacobs, H. I. L. (2021). Elevated norepinephrine metabolism is linked to cortical thickness in the context of Alzheimer's disease pathology. *Neurobiol Aging*, 102, 17-22. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2021.01.024>
- van Kooten, J., Binnekade, T. T., van der Wouden, J. C., Stek, M. L., Scherder, E. J., Husebo, B. S., Smalbrugge, M., & Hertogh, C. M. (2016). A Review of Pain Prevalence in Alzheimer's, Vascular, Frontotemporal and Lewy Body Dementias. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 41(3-4), 220-232. <https://doi.org/10.1159/000444791>
- van Rees, G. F., Lago, S. G., Cox, D. A., Tomasik, J., Rustogi, N., Weigelt, K., Ozcan, S., Cooper, J., Drexhage, H., Leweke, F. M., & Bahn, S. (2018). Evidence of microglial activation following exposure to serum from first-onset drug-naïve schizophrenia patients. *Brain Behav Immun*, 67, 364-373. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.10.003>

- Van Steenwinckel, J., Reaux-Le Goazigo, A., Pommier, B., Mauborgne, A., Dansereau, M. A., Kitabgi, P., Sarret, P., Pohl, M., & Mélik Parsadaniantz, S. (2011). CCL2 released from neuronal synaptic vesicles in the spinal cord is a major mediator of local inflammation and pain after peripheral nerve injury. *J Neurosci*, *31*(15), 5865-5875. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.5986-10.2011>
- Vargas-Caballero, M., Warming, H., Walker, R., Holmes, C., Cruickshank, G., & Patel, B. (2022). Vagus Nerve Stimulation as a Potential Therapy in Early Alzheimer's Disease: A Review. *Front Hum Neurosci*, *16*, 866434. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2022.866434>
- Vergheze, P. B., Castellano, J. M., Garai, K., Wang, Y., Jiang, H., Shah, A., Bu, G., Frieden, C., & Holtzman, D. M. (2013). ApoE influences amyloid- β (A β) clearance despite minimal apoE/A β association in physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(19), E1807-1816. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220484110>
- Vogt, M. (1954). The concentration of sympathin in different parts of the central nervous system under normal conditions and after the administration of drugs. *J Physiol*, *123*(3), 451-481. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1954.sp005064>
- Vogt, N. M., Kerby, R. L., Dill-McFarland, K. A., Harding, S. J., Merluzzi, A. P., Johnson, S. C., Carlsson, C. M., Asthana, S., Zetterberg, H., Blennow, K., Bendlin, B. B., & Rey, F. E. (2017). Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease. *Sci Rep*, *7*(1), 13537. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13601-y>
- Vojtechova, I., Machacek, T., Kristofikova, Z., Stuchlik, A., & Petrasek, T. (2022). Infectious origin of Alzheimer's disease: Amyloid beta as a component of brain antimicrobial immunity. *PLoS Pathog*, *18*(11), e1010929. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010929>
- Von Euler, U. S. (1946). Sympathin in adrenergic nerve fibres. *J Physiol*, *105*, 26. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21065214>
- Von Euler, U. S. (1948). Preparation, purification and evaluation of noradrenaline and adrenaline in organ extracts. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, *77*(4), 477-485. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18122949>
- Von Euler, U. S. (1951). The nature of adrenergic nerve mediators. *Pharmacol Rev*, *3*(3), 247-277. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14875489>
- Wagner, G., Icks, A., Abholz, H. H., Schroder-Bernhardi, D., Rathmann, W., & Kostev, K. (2012). Antihypertensive treatment and risk of dementia: a retrospective database study. *Int J Clin Pharmacol Ther*, *50*(3), 195-201. <https://doi.org/10.5414/cp201284>
- Wahis, J., & Holt, M. G. (2021). Astrocytes, Noradrenaline, α 1-Adrenoreceptors, and Neuromodulation: Evidence and Unanswered Questions. *Front Cell Neurosci*, *15*, 645691. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.645691>
- Wakamatsu, K., Tabuchi, K., Ojika, M., Zucca, F. A., Zecca, L., & Ito, S. (2015). Norepinephrine and its metabolites are involved in the synthesis of neuromelanin derived from the locus coeruleus. *J Neurochem*, *135*(4), 768-776. <https://doi.org/10.1111/jnc.13237>
- Wake, H., Moorhouse, A. J., & Nabekura, J. (2011). Functions of microglia in the central nervous system-beyond the immune response. *Neuron Glia Biol*, *7*(1), 47-53. <https://doi.org/10.1017/s1740925x12000063>
- Wang, D., Yuen, E. Y., Zhou, Y., Yan, Z., & Xiang, Y. K. (2011). Amyloid beta peptide-(1-42) induces internalization and degradation of beta2 adrenergic receptors in prefrontal cortical neurons. *J Biol Chem*, *286*(36), 31852-31863. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.244335>
- Wang, J., Wright, H. M., Vempati, P., Li, H., Wangsa, J., Dzhan, A., Habbu, K., Knable, L. A., Ho, L., & Pasinetti, G. M. (2013). Investigation of nebivolol as a novel therapeutic agent for the treatment of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, *33*(4), 1147-1156. <https://doi.org/10.3233/jad-2012-120904>
- Wang, J., Zhou, Y., Li, K., Li, X., Guo, M., & Peng, M. (2021). A Noradrenergic Lesion Attenuates Surgery-Induced Cognitive Impairment in Rats by Suppressing Neuroinflammation. *Front Mol Neurosci*, *14*, 752838. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.752838>

- Wang, L. Y., Shofer, J. B., Rohde, K., Hart, K. L., Hoff, D. J., McFall, Y. H., Raskind, M. A., & Peskind, E. R. (2009). Prazosin for the treatment of behavioral symptoms in patients with Alzheimer disease with agitation and aggression. *Am J Geriatr Psychiatry*, 17(9), 744-751. <https://doi.org/10.1097/JGP.0b013e3181ab8c61>
- Wang, Q., Oyarzabal, E. A., Song, S., Wilson, B., Santos, J. H., & Hong, J. S. (2020). Locus coeruleus neurons are most sensitive to chronic neuroinflammation-induced neurodegeneration. *Brain Behav Immun*, 87, 359-368. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.01.003>
- Wang, X., Su, B., Lee, H. G., Li, X., Perry, G., Smith, M. A., & Zhu, X. (2009). Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 29(28), 9090-9103. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.1357-09.2009>
- Wang, X., Su, B., Siedlak, S. L., Moreira, P. I., Fujioka, H., Wang, Y., Casadesus, G., & Zhu, X. (2008). Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(49), 19318-19323. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804871105>
- Wang, Y., Cella, M., Mallinson, K., Ulrich, J. D., Young, K. L., Robinette, M. L., Gilfillan, S., Krishnan, G. M., Sudhakar, S., Zinselmeyer, B. H., Holtzman, D. M., Cirrito, J. R., & Colonna, M. (2015). TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model. *Cell*, 160(6), 1061-1071. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.049>
- Ward, A., Tardiff, S., Dye, C., & Arrighi, H. M. (2013). Rate of conversion from prodromal Alzheimer's disease to Alzheimer's dementia: a systematic review of the literature. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*, 3(1), 320-332. <https://doi.org/10.1159/000354370>
- Waring, S. C., Doody, R. S., Pavlik, V. N., Massman, P. J., & Chan, W. (2005). Survival among patients with dementia from a large multi-ethnic population. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 19(4), 178-183. <https://doi.org/10.1097/01.wad.0000189033.35579.2d>
- Wehrwein, E. A., Orer, H. S., & Barman, S. M. (2016). Overview of the Anatomy, Physiology, and Pharmacology of the Autonomic Nervous System. *Compr Physiol*, 6(3), 1239-1278. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150037>
- Weiler, P. G., Mungas, D., & Bernick, C. (1988). Propranolol for the control of disruptive behavior in senile dementia. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 1(4), 226-230. <https://doi.org/10.1177/089198878800100408>
- Weinshenker, D. (2008). Functional consequences of locus coeruleus degeneration in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, 5(3), 342-345. <https://doi.org/10.2174/156720508784533286>
- Weinshenker, D. (2018). Long Road to Ruin: Noradrenergic Dysfunction in Neurodegenerative Disease. *Trends Neurosci*, 41(4), 211-223. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2018.01.010>
- Weissmann, C., Reyher, H. J., Gauthier, A., Steinhoff, H. J., Junge, W., & Brandt, R. (2009). Microtubule binding and trapping at the tip of neurites regulate tau motion in living neurons. *Traffic*, 10(11), 1655-1668. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00977.x>
- Whitson, H. E., Colton, C., El Khoury, J., Gate, D., Goate, A., Heneka, M. T., Kaddurah-Daouk, R., Klein, R. S., Shinohara, M. L., Sisodia, S., Spudich, S. S., Stevens, B., Tanzi, R., Ting, J. P., Garden, G., Aiello, A., Chiba-Falek, O., Heitman, J., Johnson, K. G., . . . Terrando, N. (2022). Infection and inflammation: New perspectives on Alzheimer's disease. *Brain, Behavior, & Immunity - Health*, 22, 100462. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbih.2022.100462>
- Whittington, R. A., Planel, E., & Terrando, N. (2017). Impaired Resolution of Inflammation in Alzheimer's Disease: A Review. *Front Immunol*, 8, 1464. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01464>
- WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. (2019). In *Risk Reduction of Cognitive Decline and Dementia: WHO Guidelines*. World Health Organization
- © World Health Organization 2019.
- Widera, D., Holtkamp, W., Entschladen, F., Niggemann, B., Zanker, K., Kaltschmidt, B., & Kaltschmidt, C. (2004). MCP-1 induces migration of adult neural stem cells. *Eur J Cell Biol*, 83(8), 381-387. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00403>



- Wilcock, G. K., Birks, J., Whitehead, A., & Evans, S. J. (2002). The effect of selegiline in the treatment of people with Alzheimer's disease: a meta-analysis of published trials. *Int J Geriatr Psychiatry*, *17*(2), 175-183. <https://doi.org/10.1002/gps.545>
- Williams, J. L., Holman, D. W., & Klein, R. S. (2014). Chemokines in the balance: maintenance of homeostasis and protection at CNS barriers. *Front Cell Neurosci*, *8*, 154. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00154>
- Winkler, E. A., Sagare, A. P., & Zlokovic, B. V. (2014). The pericyte: a forgotten cell type with important implications for Alzheimer's disease? *Brain Pathol*, *24*(4), 371-386. <https://doi.org/10.1111/bpa.12152>
- Woodling, N. S., Colas, D., Wang, Q., Minhas, P., Panchal, M., Liang, X., Mhatre, S. D., Brown, H., Ko, N., Zagol-Ikapitte, I., van der Hart, M., Khroyan, T. V., Chuluun, B., Priyam, P. G., Milne, G. L., Rassoulpour, A., Boutaud, O., Manning-Bog, A. B., Heller, H. C., & Andreasson, K. I. (2016). Cyclooxygenase inhibition targets neurons to prevent early behavioural decline in Alzheimer's disease model mice. *Brain*, *139*(Pt 7), 2063-2081. <https://doi.org/10.1093/brain/aww117>
- World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia*. (2019). A. s. D. I. (ADI).
- Wu, M., Zhang, M., Yin, X., Chen, K., Hu, Z., Zhou, Q., Cao, X., Chen, Z., & Liu, D. (2021). The role of pathological tau in synaptic dysfunction in Alzheimer's diseases. *Transl Neurodegener*, *10*(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s40035-021-00270-1>
- Yamada, K., Holth, J. K., Liao, F., Stewart, F. R., Mahan, T. E., Jiang, H., Cirrito, J. R., Patel, T. K., Hochgräfe, K., Mandelkow, E. M., & Holtzman, D. M. (2014). Neuronal activity regulates extracellular tau in vivo. *J Exp Med*, *211*(3), 387-393. <https://doi.org/10.1084/jem.20131685>
- Yamamoto, M., Horiba, M., Buescher, J. L., Huang, D., Gendelman, H. E., Ransohoff, R. M., & Ikezu, T. (2005). Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 in beta-amyloid precursor protein transgenic mice show accelerated diffuse beta-amyloid deposition. *Am J Pathol*, *166*(5), 1475-1485. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)62364-4](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)62364-4)
- Yan, Y. P., Sailor, K. A., Lang, B. T., Park, S. W., Vemuganti, R., & Dempsey, R. J. (2007). Monocyte chemoattractant protein-1 plays a critical role in neuroblast migration after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, *27*(6), 1213-1224. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600432>
- Yang, J. H., Lee, E. O., Kim, S. E., Suh, Y. H., & Chong, Y. H. (2012). Norepinephrine differentially modulates the innate inflammatory response provoked by amyloid- β peptide via action at β -adrenoceptors and activation of cAMP/PKA pathway in human THP-1 macrophages. *Exp Neurol*, *236*(2), 199-206. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.05.008>
- Yokoyama, M., Kobayashi, H., Tatsumi, L., & Tomita, T. (2022). Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Front Mol Neurosci*, *15*, 912995. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.912995>
- Yu, J. T., Wang, N. D., Ma, T., Jiang, H., Guan, J., & Tan, L. (2011). Roles of β -adrenergic receptors in Alzheimer's disease: implications for novel therapeutics. *Brain Res Bull*, *84*(2), 111-117. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2010.11.004>
- Yu, T. W., Lane, H. Y., & Lin, C. H. (2021). Novel Therapeutic Approaches for Alzheimer's Disease: An Updated Review. *Int J Mol Sci*, *22*(15). <https://doi.org/10.3390/ijms22158208>
- Yu, Y., & Ye, R. D. (2015). Microglial A β receptors in Alzheimer's disease. *Cell Mol Neurobiol*, *35*(1), 71-83. <https://doi.org/10.1007/s10571-014-0101-6>
- Zafra, F., Lindholm, D., Castrén, E., Hartikka, J., & Thoenen, H. (1992). Regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor mRNA in primary cultures of hippocampal neurons and astrocytes. *J Neurosci*, *12*(12), 4793-4799. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.12-12-04793.1992>
- Zarow, C., Lyness, S. A., Mortimer, J. A., & Chui, H. C. (2003). Neuronal loss is greater in the locus coeruleus than nucleus basalis and substantia nigra in Alzheimer and Parkinson diseases. *Arch Neurol*, *60*(3), 337-341. <https://doi.org/10.1001/archneur.60.3.337>

- Zecca, L., Stroppolo, A., Gatti, A., Tampellini, D., Toscani, M., Gallorini, M., Giaveri, G., Arosio, P., Santambrogio, P., Fariello, R. G., Karatekin, E., Kleinman, M. H., Turro, N., Hornykiewicz, O., & Zucca, F. A. (2004). The role of iron and copper molecules in the neuronal vulnerability of locus coeruleus and substantia nigra during aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(26), 9843-9848. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403495101>
- Zempel, H., & Mandelkow, E. (2014). Lost after translation: missorting of Tau protein and consequences for Alzheimer disease. *Trends Neurosci*, *37*(12), 721-732. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.08.004>
- Zhang, F., Gannon, M., Chen, Y., Yan, S., Zhang, S., Feng, W., Tao, J., Sha, B., Liu, Z., Saito, T., Saido, T., Keene, C. D., Jiao, K., Roberson, E. D., Xu, H., & Wang, Q. (2020). beta-amyloid redirects norepinephrine signaling to activate the pathogenic GSK3beta/tau cascade. *Sci Transl Med*, *12*(526). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aay6931>
- Zhang, L., Chen, C., Mak, M. S., Lu, J., Wu, Z., Chen, Q., Han, Y., Li, Y., & Pi, R. (2020). Advance of sporadic Alzheimer's disease animal models. *Med Res Rev*, *40*(1), 431-458. <https://doi.org/10.1002/med.21624>
- Zhang, R., Miller, R. G., Madison, C., Jin, X., Honrada, R., Harris, W., Katz, J., Forshew, D. A., & McGrath, M. S. (2013). Systemic immune system alterations in early stages of Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol*, *256*(1-2), 38-42. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2013.01.002>
- Zhang, T., Han, Y., Wang, J., Hou, D., Deng, H., Deng, Y. L., & Song, Z. (2018). Comparative Epidemiological Investigation of Alzheimer's Disease and Colorectal Cancer: The Possible Role of Gastrointestinal Conditions in the Pathogenesis of AD. *Front Aging Neurosci*, *10*, 176. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00176>
- Zhao, Z., Sagare, A. P., Ma, Q., Halliday, M. R., Kong, P., Kisler, K., Winkler, E. A., Ramanathan, A., Kanekiyo, T., Bu, G., Owens, N. C., Rege, S. V., Si, G., Ahuja, A., Zhu, D., Miller, C. A., Schneider, J. A., Maeda, M., Maeda, T., . . . Zlokovic, B. V. (2015). Central role for PICALM in amyloid- β blood-brain barrier transcytosis and clearance. *Nature Neuroscience*, *18*(7), 978-987. <https://doi.org/10.1038/nn.4025>
- Zhou, B., Zuo, Y. X., & Jiang, R. T. (2019). Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS Neurosci Ther*, *25*(6), 665-673. <https://doi.org/10.1111/cns.13123>
- Zhou, Y., Tang, H., Liu, J., Dong, J., & Xiong, H. (2011). Chemokine CCL2 modulation of neuronal excitability and synaptic transmission in rat hippocampal slices. *J Neurochem*, *116*(3), 406-414. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07121.x>
- Zhu, M., Wang, X., Schultzberg, M., & Hjorth, E. (2015). Differential regulation of resolution in inflammation induced by amyloid- β 42 and lipopolysaccharides in human microglia. *J Alzheimers Dis*, *43*(4), 1237-1250. <https://doi.org/10.3233/jad-141233>
- Zisman, D. A., Kunkel, S. L., Strieter, R. M., Tsai, W. C., Bucknell, K., Wilkowski, J., & Standiford, T. J. (1997). MCP-1 protects mice in lethal endotoxemia. *J Clin Invest*, *99*(12), 2832-2836. <https://doi.org/10.1172/JCI119475>
- Zlokovic, B. V. (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat Rev Neurosci*, *12*(12), 723-738. <https://doi.org/10.1038/nrn3114>
- Zubenko, G. S., & Moossy, J. (1988). Major depression in primary dementia. Clinical and neuropathologic correlates. *Arch Neurol*, *45*(11), 1182-1186. <https://doi.org/10.1001/archneur.1988.00520350020008>
- Zuena, A. R., Casolini, P., Lattanzi, R., & Maftai, D. (2019). Chemokines in Alzheimer's Disease: New Insights Into Prokineticins, Chemokine-Like Proteins. *Front Pharmacol*, *10*, 622. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00622>

ANEXOS

10 ANEXOS

10.1 CERTIFICADO DE MANEJO DE ANIMALES

<p>Firmado digitalmente por: ALTOZANO SOLER PABLO Fecha: 2021.06.04 10:32</p>	<div style="text-align: right;">Ref: 10/2815519/21</div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;">  <div style="text-align: right;"> <p>Dirección General de Agricultura, Ganadería y Alimentación CONSEJERÍA DE MEDIO AMBIENTE, ORDENACIÓN DEL TERRITORIO Y SOSTENIBILIDAD</p> </div> </div> <div style="text-align: right; margin-top: 10px;">Ref.: CAP-338.0-21</div> <p style="margin-top: 20px;">RESOLUCIÓN DE RECONOCIMIENTO DE LA CAPACITACIÓN E INCLUSIÓN EN EL REGISTRO DE PERSONAL QUE MANEJA ANIMALES UTILIZADOS, CRIADOS O SUMINISTRADOS CON FINES DE EXPERIMENTACIÓN Y OTROS FINES CIENTÍFICOS, INCLUYENDO LA DOCENCIA (Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo)</p> <p>Vista la solicitud formulada por D/D^a. IRENE LÓPEZ GUTIERREZ, con DNI 53613821Q, de reconocimiento de la capacitación en base a la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.</p> <p>Visto el informe favorable del Área de Protección Animal de la Subdirección General de Producción Agroalimentaria.</p> <p>Considerando que el solicitante cumple los requisitos para estimar su solicitud, por lo dispuesto en la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, por la que se establecen los requisitos de capacitación que debe cumplir el personal que maneje animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.</p> <p>Esta Dirección General ha resuelto reconocer la capacitación a D. IRENE LÓPEZ GUTIERREZ, con DNI 53613821Q, para realizar las funciones de EUTANASIA DE LOS ANIMALES y REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS en ROEDORES.</p> <p>El mantenimiento de esta capacitación se debe demostrar al menos cada ocho años, en los términos que establece el artículo 20 de la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, a partir de la fecha de esta Resolución.</p> <p>Contra esta Resolución, que no agota la vía administrativa, cabe interponer recurso de alzada en el plazo de un mes, contado desde el día siguiente a la recepción de esta notificación, ante el Viceconsejero de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio y Sostenibilidad, conforme a lo establecido en el artículo 121 y siguientes de la Ley 39/2015, de 1 de octubre, del Procedimiento Administrativo Común de las Administraciones Públicas.</p> <p style="text-align: center; margin-top: 20px;">Madrid, a fecha de firma</p> <p style="text-align: center;">EL DIRECTOR GENERAL DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y ALIMENTACIÓN (P.D.F Resolución de 16 de julio de 2020)</p> <p style="text-align: center;">COMISIONADO DEL GOBIERNO DE BIENESTAR ANIMAL (Documento firmado electrónicamente. Huella de firma en el lateral)</p> <div style="text-align: right; margin-top: 20px;">  <p style="font-size: 8px; text-align: left;">La autenticidad de este documento se puede comprobar en www.madrid.org/conte mediante el siguiente código seguro de verificación: 0926172374053401759685</p> </div>
---	--



Dirección General de Agricultura,
Ganadería y Alimentación
CONSEJERÍA DE MEDIO AMBIENTE,
ORDENACIÓN DEL TERRITORIO Y SOSTENIBILIDAD

Certificado de reconocimiento de la capacitación para manejar animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo

D/D^a. IRENE LÓPEZ GUTIERREZ, con DNI 53613821Q, ha obtenido el reconocimiento de la capacitación para realizar las funciones de:

EUTANASIA DE LOS ANIMALES

REALIZACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS

en los siguientes grupos de especies animales: ROEDORES

Nº de certificado: CAP-338.0-21

ORGANISMO QUE EXPIDE EL CERTIFICADO

Dirección General de Agricultura, Ganadería y Alimentación. Consejería de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio y Sostenibilidad. Comunidad de Madrid

El reconocimiento de la capacitación para la realización de las funciones relacionadas en este certificado surtirá efecto en todo el territorio nacional.

El mantenimiento de esta capacitación se debe demostrar al menos cada ocho años, en los términos que establece el artículo 20 de la Orden ECC/566/2015, de 20 de marzo, a partir de la fecha de la firma.

Madrid a fecha de firma

EL DIRECTOR GENERAL DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y ALIMENTACIÓN

(P.D.F Resolución de 16 de julio de 2020)

COMISIONADO DEL GOBIERNO DE BIENESTAR ANIMAL

(Documento firmado electrónicamente. Huella de firma en el lateral)



La autenticidad de este documento se puede comprobar en www.madrid.org/cove mediante el siguiente código de verificación: **10364916885085523473**

Firmado digitalmente por: ALTOZANO SOLER PABLO
Fecha: 2021.06.04 10:32

10.2 PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

Publicaciones asociadas con la presente tesis doctoral

- **Gutiérrez IL**, Dello Russo C, Novellino F, Caso JR, García-Bueno B, Leza JC, Madrigal JLM. Noradrenaline in Alzheimer's Disease: A New Potential Therapeutic Target. *Int J Mol Sci.* 2022 May 30;23(11):6143. doi: 10.3390/ijms23116143 .
- **Gutiérrez IL**, Novellino F, Caso JR, García-Bueno B, Leza JC, Madrigal JLM. CCL2 Inhibition of Pro-Resolving Mediators Potentiates Neuroinflammation in Astrocytes. *Int J Mol Sci.* 2022 Mar 18;23(6):3307. doi: 10.3390/ijms23063307.
- **Gutiérrez, I.L.**, González-Prieto, M., Caso, J.R., García-Bueno, B., Leza, J.C., Madrigal, J.L.M. (2019), Reboxetine treatment reduces neuroinflammation and neurodegeneration in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease: Role of CCL2. *Mol Neurobiol.* doi: 10.1007/s12035-019-01695-6.
- **Gutiérrez, I.L.**, González-Prieto, M., García-Bueno, B., Caso, J.R., Leza, J.C., Madrigal, J.L.M. (2018), Alternative methods to detect neuronal degeneration and amyloid β accumulation in brain homogenates and free floating sections with Fluoro-Jade. *ASN Neuro.* doi: 10.1177/1759091418784357 .

Otras publicaciones

- Church KA, Rodriguez D, Vanegas D, **Gutierrez IL**, Cardona SM, Madrigal JLM, Kaur T, Cardona AE. Models of microglia depletion and replenishment elicit protective effects to alleviate vascular and neuronal damage in the diabetic murine retina. *J Neuroinflammation.* 2022 Dec 14;19(1):300. doi: 10.1186/s12974-022-02659-9.
- Martín-Hernández D, **Gutiérrez IL**, González-Prieto M, MacDowell KS, Robledo-Montaña J, Tendilla-Beltrán H, Calleja-Rodríguez N, Bris ÁG, Ulecia-Morón C, Moreno B, Caso JR, García-Bueno B, RodriguesMascarenhas S, Marín-Jiménez I, Leza JC, Menchén L. Sphk2 deletion is involved in structural abnormalities and Th17 response but does not aggravate colon inflammation induced by sub-chronic stress. *Sci Rep.* 2022 Mar 8;12(1):4073. doi: 10.1038/s41598-022-08011-8.
- González-Prieto M*, **Gutiérrez IL***, García-Bueno B, Caso JR, Leza JC, Ortega-Hernández A, Gómez-Garre D, Madrigal JLM. (2021) Microglial CX3CR1 production increases in Alzheimer's disease and is regulated by noradrenaline. *Glia.* 2021 Jan;69(1):73-90. doi: 10.1002/glia.23885. *Coautores
- Madrigal, J.L., Caso, J.R., García-Bueno, B., **Gutiérrez, I.L.**, Leza, J.C. (2017), Noradrenaline induces CX3CL1 production and release by neurons. *Neuropharmacology.* do: 10.1016/j.neuropharm.2016.12.001.

“...otra diferencia esencial entre el descubrimiento científico y la obra de arte es que esta última es el resultado de la actividad creativa de un solo individuo [...] En cambio, el descubrimiento científico, aun teniendo origen en la feliz intuición de una persona, se convierte enseguida en una obra colectiva que se profundiza y extiende conforme se descubren y conocen nuevas cosas”.

– Rita Levi Montalcini