



Universidad de Oviedo

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**PAPEL DEL HIERRO Y SU METABOLISMO EN LA INSTAURACIÓN Y  
PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

**SUSANA JUNCEDA ANTUÑA**

Oviedo, OCTUBRE 2024

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**



**Departamento de Morfología y Biología Celular**  
**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**PAPEL DEL HIERRO Y SU METABOLISMO EN LA INSTAURACIÓN Y  
PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

**SUSANA JUNCEDA ANTUÑA**

**Directoras: Ana María Navarro Incio y Eva Martínez Pinilla**

Oviedo, OCTUBRE 2024





## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Papel del hierro y su metabolismo en la instauración y progresión de la enfermedad de Alzheimer	Inglés: Role of iron and its metabolism in the onset and progression of Alzheimer's disease.
2.- Autor	
Nombre: Susana Junceda Antuña	
Programa de Doctorado: Ciencias de la Salud	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado	

### RESUMEN (en español)

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo caracterizado por un deterioro cognitivo progresivo y severo. A nivel histopatológico, la EA se asocia con disfunción sináptica y procesos degenerativos que incluyen la presencia de marcadores neuropatológicos distintivos, como las placas de  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) y los ovillos neurofibrilares (ONF) de proteína Tau. Aunque la causa precisa de la EA sigue siendo desconocida, investigaciones recientes sugieren que un metabolismo anormal del hierro podría desempeñar un papel crucial en la patogénesis de la enfermedad. En este sentido, se han detectado concentraciones elevadas de hierro en el cerebro tanto en condiciones patológicas como en el envejecimiento. Sin embargo, aún no está claramente definida la cantidad y distribución espacial exacta del hierro, ni el papel de algunas proteínas clave implicadas en su transporte, como la ferroportina (FPN) y la hepcidina (HPC), en el cerebro.

La hipótesis central de este trabajo es que FPN y HPC están involucradas en la acumulación de hierro en la EA y que la desregulación de estas proteínas contribuye al desarrollo y progresión de la enfermedad. Para investigar esta hipótesis, el estudio se centró en analizar el papel de estas proteínas en relación con la acumulación de hierro y la progresión de la EA. Se emplearon técnicas histoquímicas, inmunohistoquímicas y analíticas avanzadas como la espectrometría de masas acoplada a ablación láser (LA-ICP-MS) para estudiar varias regiones del cerebro, incluyendo el hipocampo, la corteza entorrinal y los ganglios basales de sujetos control y pacientes con EA en estadios leve, moderado y severo, según la clasificación de Braak.

Los resultados indicaron una acumulación significativa de hierro en los cerebros de pacientes con EA en comparación con los controles. Sin embargo, la expresión de FPN no coincidió con la distribución del hierro, ni mostró una correlación significativa con los estadios de la enfermedad, aunque sí se observó una relación con la edad. Hallazgos similares se obtuvieron con respecto a la expresión de HPC. Además, los datos no revelaron una correlación entre estas dos proteínas transportadoras. Tampoco se encontró una asociación entre los principales marcadores histopatológicos de la EA, como las placas de  $A\beta$  y los ovillos de Tau, y la expresión de FPN o HPC.

En conclusión, la falta de correlación entre la cantidad y distribución de hierro y el eje regulador FPN/HPC sugiere que existen mecanismos de control más complejos en el metabolismo y depósito de hierro en la EA como podrían ser la inflamación o el deterioro en la eliminación de solutos acumulados en el cerebro. Estos resultados subrayan la complejidad de la desregulación del hierro en la EA, sugiriendo que otros factores, además de las proteínas transportadoras, podrían estar influyendo en la homeostasis del hierro en este contexto patológico.



## RESUMEN (en Inglés)

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by progressive and severe cognitive decline. At the histopathological level, AD is associated with synaptic dysfunction and degenerative processes, as well as the presence of specific neuropathological markers such as  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) plaques and Tau protein neurofibrillary tangles (NFTs). Although the exact cause of AD remains unknown, recent evidence suggests that abnormal iron metabolism may play a key role in the pathogenesis of the disease. In this context, high concentrations of this ion have been observed in the brain in both pathological and aging-related conditions. However, the precise amount and spatial distribution of iron, as well as the role of certain transport molecules that regulate its entry and exit from the cell, such as ferroportin (FPN) and hepcidin (HPC), in the brain, remain unclear.

The central hypothesis of this study was that these proteins play an important role in iron accumulation in AD and that the development or progression of the disease is related to the dysregulation of their function. The aim of this work was to study the role of these proteins in relation to iron accumulation and AD progression, using histochemical, immunohistochemical, and analytical techniques such as LA-ICP-MS, developed for this purpose, in several brain regions, including the hippocampus, entorhinal cortex, and basal ganglia of control subjects and AD patients. These cases were classified into mild, moderate, and severe stages according to Braak stages.

The results showed that iron accumulation was significantly higher in AD brains compared to controls. The expression of FPN did not correlate with iron accumulation, nor was a significant relationship found with disease stages, but rather with age; similar findings were observed for the HPC transporter. The data revealed no relationship between the two proteins. Additionally, there was no correlation between the main histopathological markers of AD and the transporters mentioned.

In conclusion, the lack of correlation between the amount and distribution of iron and the FPN/HPC axis suggests complex regulatory mechanisms in iron metabolism and deposition in AD. These findings highlight the complexity of iron dysregulation in AD and suggest that other factors, beyond transport proteins, may influence iron regulation in this context.

## ABREVIATURAS

**A $\beta$** : beta-amiloide

**Apo E**: apolipoproteína E

**Au**: ion de oro

**BHE**: barrera hematoencefálica

**BSLCR**: barrera sangre-líquido cefalorraquídeo

**BSA**: *bovine serum albumin*, albúmina de suero bovino

**CA1**: zona *Cornus Ammonis* 1 hipocampal

**CENT**: corteza entorrinal

**CP**: ceruloplasmina

**DCL**: deterioro cognitivo leve

**DFO**: desferrioxamina

**DFP**: deferiprona

**DFT**: demencia fronto-temporal

**DFX**: deferasirox

**DMT1**: *divalent metal transporter*, simportador de metal divalente 1

**DTA**: demencia tipo Alzheimer

**EA**: enfermedad de Alzheimer

**eEA**: enfermedad de Alzheimer de tipo esporádica

**ENs**: enfermedades neurodegenerativas

**EP**: enfermedad de Parkinson

**Fe**: ion de hierro

**fEA**: enfermedad de Alzheimer de tipo familiar

**FLH**: forma lábil de hierro

**FPH**: filamentos pareados helicoidales

**FPN**: ferroportina

**FSC**: flujo sanguíneo cerebral

**Ft**: ferritina

**GP**: globo pálido

**GPI**: glicosilfosfatidilinositol

**GPX4**: glutatión peroxidasa 4

**HNE**: *4-hydroxynonenal*, 4-hidroxinonenal

**HP**: *hephestin*, hefestina

**HPC**: hepcidina

**Hs**: hemosiderina

**IHQ**: inmunohistoquímica

**IL-6:** interleucina-6

**IRE:** *iron response element*, elemento de respuesta a hierro

**LCR:** líquido cefalorraquídeo

**LI:** líquido intersticial

**LOAD:** *late onset Alzheimer's disease*, enfermedad de Alzheimer de inicio tardío

**LRP1:** *low-density lipoprotein receptor*, receptor de lipoproteínas de baja densidad

**MAPK:** *mitogen-activated protein kinase*, proteína quinasa activada por mitógenos

**MIS:** *memory impairment screen*, detección del deterioro de la memoria

**MMSE:** *mini-mental state examination*, mini examen del estado mental

**NP:** nanopartícula

**NTBI:** *non-transferrin-bound iron*, hierro no unido a transferrina

**ONF:** ovillos neurofibrilares

**PSEN1:** presenilina 1

**PSEN2:** presenilina 2

**PBS:** *phosphate buffer saline*, tampón fosfato salino

**PET:** *positron emission tomography*, tomografía de emisión de positrones

**PLH:** hierro plasmático lábil

**PPA:** precursor de la proteína amiloide

**PPA-tg:** ratones transgénicos para precursor de proteína amiloide

**prSN:** *pars reticulata* de la sustancia negra

**PS:** placas seniles

**PSP:** parálisis supranuclear progresiva

**QMS:** *quantitative susceptibility mapping*, mapeo cuantitativo de susceptibilidad

**RAGE:** *receptor for advanced glycation end products*, receptor para productos finales de glicación avanzada

**ROS:** *reactive oxygen species*, especies reactivas de oxígeno

**RTf:** receptor de transferrina

**SN:** *substantia nigra*, sustancia negra

**SNC:** sistema nervioso central

**Tf:** transferrina

**TNF- $\alpha$ :** *tumoral necrosis factor-alfa*, factor de necrosis tumoral alfa

**UNV:** unidad neurovascular

## ÍNDICE

<b>1.-INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
1.1.- Etiología, patogenia y patocronia.....	8
1.2.- Diagnóstico diferencial de la Enfermedad de Alzheimer.....	12
1.3.- Criterios de diagnóstico anatomopatológicos de la Enfermedad de Alzheimer.....	13
1.4.- Teorías sobre el origen de la Enfermedad de Alzheimer.....	21
1.4.1.- Papel del péptido amiloide en la progresión de la Enfermedad de Alzheimer.....	22
1.4.2.- Papel de la proteína Tau en la Enfermedad de Alzheimer.....	27
1.4.3.- Teoría vascular de la EA.....	30
1.4.4.- Teoría de la clarificación de productos tóxicos en la Enfermedad de Alzheimer.....	32
1.5.- Importancia del ion hierro en la progresión de Enfermedad de Alzheimer.....	34
1.5.1.- El hierro como molécula imprescindible en el sistema nervioso.....	34
1.5.2.-Metabolismo y transporte del hierro en el sistema nervioso central.....	36
1.5.3.- Regulación del hierro.....	38
1.5.4.-Distribución del hierro en el cerebro.....	40
1.5.5.-Regulación del hierro en la Enfermedad de Alzheimer.....	41
1.5.6.- Técnicas para cuantificar el hierro en el sistema nervioso central.....	44
<b>2.-HIPÓTESIS DE PARTIDA Y OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
<b>3.-MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
3.1.-Obtención de muestras.....	47
3.2.-Procesamiento de muestras.....	49
3.3.- Histoquímica.....	50
3.4.- Inmunohistoquímica.....	50
3.5.- Registro del hierro utilizando LA-ICP-MS.....	50

3.6.- Observación de muestras y captación de imágenes.....	53
3.7.- Análisis de imágenes inmunohistoquímicas.....	54
3.8.- Análisis estadístico.....	55
<b>4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>57</b>
4.1.- Detección de hierro cerebral mediante técnicas histoquímicas.....	57
4.2.- La cantidad de hierro, medida con técnicas analíticas, se incrementa en la CA1 de cerebros con Enfermedad de Alzheimer, pero su distribución es diferente entre capas.....	61
4.3.- La expresión de la FPN aumenta en la corteza temporal y los ganglios basales con la edad y en la enfermedad de Alzheimer.....	67
4.4.- La mayor cantidad de hierro en la CA1 del hipocampo no se correlaciona con una mayor cantidad de FPN en la enfermedad de Alzheimer.....	77
4.5.- La expresión de la HPC aumenta en la corteza temporal y los ganglios basales con la edad, pero no en la enfermedad de Alzheimer.....	80
4.6.- Colocalización del hierro, las proteínas transportadoras y los marcadores clásicos de la enfermedad de Alzheimer.....	87
<b>5.- DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>103</b>
<b>6.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>115</b>
<b>7.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>117</b>
<b>8.- ANEXOS.....</b>	<b>133</b>

## 1.-INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno del cerebro que se caracteriza por destruir de forma paulatina la memoria y las habilidades del pensamiento, llegando a impedir la capacidad de realizar las tareas de la vida cotidiana y, finalmente, producir el fallecimiento de la persona que la sufre. La EA fue descubierta por Alois Alzheimer en 1906, al identificar y describir las lesiones encefálicas que padecía una paciente que falleció a causa de un trastorno mental (Graeber 1999). En la actualidad la EA es la forma más común de demencia y está detrás de aproximadamente el 75% de las personas que sufren daños cerebrales relacionados con la senilidad. A nivel mundial, se estima que entre 18 y 22 millones de personas están afectadas, con una prevalencia que oscila entre el 3% y el 15%, y una incidencia anual que va del 0,3% al 0,7% (Tahami-Monfared et al. 2022). Estudios recientes señalan que en 2050 la prevalencia de la EA podría llegar a duplicarse en Europa, e incluso a triplicarse a nivel mundial (Anon 2018).

La EA se diagnostica basándose en el historial médico, pruebas del estado mental, hallazgos clínicos e imágenes cerebrales. Los individuos que albergan los cambios descritos pueden ser asintomáticos o pueden presentar manifestaciones clínicas que van desde lapsos de memoria hasta una pérdida grave y debilitante de ésta, así como de la función cognitiva. A medida que avanza la EA pueden aparecer síntomas neuropsiquiátricos adicionales, incluidos períodos de confusión, desorientación, cambios de humor, agresión/agitación y, finalmente, delirios/alucinaciones en etapas posteriores. La demencia es pues, uno de los síntomas más comunes, siendo compartido por otras enfermedades neurodegenerativas (ENs), un conjunto de trastornos neurológicos que como su nombre indica llevan a la pérdida y/o disfunción de las células del sistema nervioso central (SNC) de una forma progresiva (Wilson et al. 2023). La pérdida neuronal, junto con la de las redes de comunicación establecidas entre ellas, es lo que culmina en las manifestaciones clínicas de características propias de cada tipo de demencia. Por ello se hace importante ahondar en la clasificación tanto de las demencias como de las ENs, lo cual nos ayudará a entender mejor lo que ocurre en la EA.

A pesar de todo, la confirmación diagnóstica de la EA solo puede realizarse después de la muerte, relacionando los datos clínicos con el estudio anatómico del órgano e histológico de sus diferentes áreas cerebrales en el momento de la autopsia (Uddin et al. 2020). En términos generales, el cerebro de un paciente de EA presenta una atrofia significativa y un aumento de los ventrículos cerebrales. Además, El rasgo anatomopatológico característico de esta enfermedad incluye la pérdida de neuronas y sinapsis, la presencia de ovillos neurofibrilares intraneuronales (ONF) y placas seniles (PS)

(Derry et al. 2020; Lei, Ayton, and Bush 2021). Los ONF consisten en acumulaciones de filamentos helicoidales de proteína tau hiperfosforilada. Las PS están compuestas por depósitos extracelulares de filamentos de  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), rodeados por procesos neuríticos y gliales alterados. Además, contienen trazas de metales como zinc, cobre, aluminio y hierro en concentraciones variables, que también se encuentran cerca de los ovillos. Dado que resulta complejo establecer una secuencia temporal clara de estos cambios patológicos, se han propuesto dos hipótesis sobre el origen de la EA basadas en estos procesos (Derry et al. 2020).

Teniendo esto en cuenta, resulta muy complicado establecer una secuencia temporal de los cambios fisiopatológicos, por ello se han formulado varias hipótesis del origen de la EA relacionadas con ellos, de las que hablaremos a continuación.

### **1.1.- Etiología, patogenia y patocronia**

La EA es considerada una enfermedad multifactorial asociada con numerosos factores de riesgo tales como la edad, la genética, infecciones, patologías vasculares, daños cerebrales previos, y factores medioambientales como la exposición a metales pesados. No obstante, los cambios cerebrales en los pacientes con EA no tienen una causa conocida aún (Breijyeh and Karaman 2020).

Desde el punto de vista etiológico la EA se puede clasificar en dos tipos:

- La EA de tipo familiar (fEA) o genética ocurre en alrededor del 10% de los casos. Se caracteriza por una herencia autosómica dominante de presentación temprana, por lo que se le conoce también como EOAD (del inglés *early onset Alzheimer's disease*). Se produce como consecuencia de mutaciones en diversos genes que promueven el acúmulo descontrolado de la  $A\beta$ , y que llevan a padecer la patología. Algunos de los genes afectados son el gen de la proteína precursora amiloide (PPA) que se sitúa en el cromosoma 21, el gen de la presenilina 1 (PSEN1) localizado en el cromosoma 14, y el gen de la presenilina 2 (PSEN2) en el cromosoma 1 (Guimerà, Gironès, and Cruz-sánchez 2002).
- La EA de tipo esporádica (eEA) es el tipo más común de EA. La etiopatogenia sigue siendo compleja y se reconoce como multifactorial, ya que, aunque puede existir cierta predisposición genética en algunos casos, no ocurre así en otros, y además su desarrollo se encuentra influenciado por factores ambientales conocidos. El factor de riesgo más relevante para esta neuropatología es la edad, aunque la patología puede comenzar posiblemente 20-30 años antes del inicio de la clínica (Derry et al. 2020; Lei et al. 2021). Los casos que se

presentan en personas mayores de 65 años se engloban en lo que se conoce como Demencia Senil tipo Alzheimer, y se corresponde también con el llamado Alzheimer senil o tardío o LOAD (del inglés *late onset Alzheimer's disease*). No obstante, se han identificado diversos factores genéticos que aumentan el riesgo de padecerla, como por ejemplo la presencia del alelo  $\epsilon 4$  de la apolipoproteína E (gen *APOE*), que se encuentra en el cromosoma 19 humano (Blom et al. 2008). Entre otros factores de riesgo destacan el sexo (más frecuente en mujeres), los traumatismos craneoencefálicos, hábitos de vida no saludables, inactividad física y síndromes metabólicos (que incluyen diabetes, hipertensión, y obesidad), todos ellos actuando negativamente sobre dianas del parénquima cerebral, y la salud vascular y metabólica del cerebro (Livingston et al. 2020). Las similitudes anatomopatológicas entre las formas autosómica dominante y esporádica sugieren una etiología compartida, pero la evidencia bibliográfica indica que la eEA podría tener un origen diferente (Arnsten et al. 2021).

La EA es una enfermedad neurodegenerativa devastadora, caracterizada por una pérdida progresiva de la memoria y otras capacidades mentales a medida que las células nerviosas (sobre todo neuronas) mueren y diferentes áreas del cerebro se deterioran. Clínicamente, se manifiesta de manera lenta y gradual. Los primeros síntomas están relacionados con el deterioro cognitivo leve que cursa con una pérdida de la "memoria reciente". Posteriormente, se presentan dificultades en la ejecución de los movimientos corporales, confusión, desorientación temporal y espacial, y trastornos del sueño, entre otros (Rojo 2014; Sacuiu 2016). Es común, también, que los pacientes desarrollen anomalías a nivel del lenguaje y cambios en su comportamiento y personalidad, incluyendo depresión, ansiedad o apatía. Por último, de forma ocasional, pueden presentarse características neuropatológicas adicionales tales como convulsiones, mioclonías y paraparesia espástica (Proaño and Aguilar 2004).

El deterioro progresivo de la función cognitiva en personas con EA varía según los elementos cognitivos afectados. Una revisión sistemática en la que se examinaron los puntos de aceleración del deterioro cognitivo, mostró que los déficits de memoria verbal aparecieron primero, seguidos de los relacionados con la capacidad visuoespacial, para finalmente afectar a las funciones ejecutivas, a la fluidez y el coeficiente intelectual verbal (Tahami-Monfared et al. 2022).

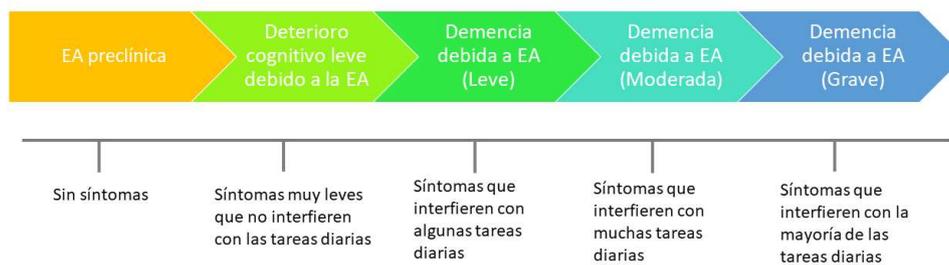
Los síntomas característicos de la EA como las dificultades con la memoria, el lenguaje, la resolución de problemas y otras habilidades de pensamiento que afectan la capacidad de una persona para realizar las actividades de la vida cotidiana son, no obstante, comunes a muchas demencias (Sacuiu

2016). La demencia, por tanto, es un término general que engloba un grupo particular de síntomas que afectan a la función cerebral y que puede ser debidas a varias causas. Se puede, en primera instancia, distinguir entre demencias primarias y secundarias, siendo las primarias degenerativas y progresivas y las secundarias causadas por otras patologías subyacentes (Tabla I). A nivel clínico, es importante realizar un diagnóstico diferencial ante un paciente con sospecha de EA, ya que las demencias secundarias presentan síntomas similares pero la causa de éstas podría ser reversible si se detecta a tiempo (Conde, Navarro, and Olazarán 2015).

*Tabla I.- Causas comunes de demencia en orden de importancia y sus características asociadas. Tomado de "Alzheimer's and Dementia". The Journal of the Alzheimer's Association.*

Causa de la demencia	Características
<b>Enfermedad de Alzheimer (EA)</b>	<p>La EA es la causa más común de demencia y se estima que representa entre el 60% y el 80% de los casos.</p> <p>Las patologías características de la EA son la acumulación del fragmento de proteína beta-amiloide (placas) fuera de las neuronas del cerebro y hebras retorcidas de la proteína Tau (ovillos) dentro de las neuronas.</p>
<b>Demencia cerebrovascular</b>	<p>Se dice que las personas con demencia cuyos cerebros muestran evidencia de enfermedad cerebrovascular tienen demencia vascular. Alrededor del 5 % al 10 % de las personas con demencia muestran evidencia de demencia vascular únicamente.</p>
<b>Demencia de cuerpos de Lewy (DCL)</b>	<p>Las personas con DCL tienen algunos de los síntomas comunes del Alzheimer, pero es más probable que tengan síntomas iniciales o tempranos de alteraciones del sueño, alucinaciones visuales bien formadas y deterioro visuoespacial. Alrededor del 5% de las personas con demencia muestran evidencia de ECL únicamente, pero la mayoría de las personas con DCL también tienen patología de la EA.</p> <p>Presenta cuerpos de Lewy que son agregaciones anormales de la proteína <math>\alpha</math>-sinucleína en las neuronas.</p>
<b>Degeneración del lóbulo frontotemporal (DLFT)</b>	<p>La DLFT incluye demencias como la DLFT variante conductual, la afasia primaria progresiva, la enfermedad de Pick, la degeneración corticobasal y la parálisis supranuclear progresiva.</p> <p>Los primeros síntomas típicos incluyen cambios marcados en la personalidad y el comportamiento y/o dificultad para producir o comprender el lenguaje. A diferencia de la EA, la memoria normalmente se conserva en las primeras etapas de la enfermedad.</p> <p>Presenta inclusiones anormales de proteínas (generalmente proteína Tau o la proteína de unión al ADN de respuesta transactiva, TDP-43)</p>
<b>Enfermedad de Parkinson (EP)</b>	<p>Presenta problemas de movimiento (lentitud, rigidez, temblores y cambios en la marcha) pero también síntomas cognitivos que se desarrollan justo antes de los comentados o más adelante en la enfermedad.</p> <p>Son característicos los cuerpos de Lewy en las neuronas de la sustancia negra.</p>
<b>Esclerosis del hipocampo (EH)</b>	<p>El síntoma más pronunciado de la EH es la pérdida de memoria de hecho, las personas pueden ser diagnosticadas erróneamente con la EA.</p> <p>Los cambios cerebrales de EH suelen ir acompañados de acumulaciones de una forma mal plegada de una proteína llamada TDP-43.</p>
<b>Patologías mixtas</b>	<p>Cuando un individuo presenta cambios cerebrales de más de una causa de demencia, se considera que existe comorbilidad. Cuando estas patologías derivan en síntomas de demencia durante la vida, se dice que la persona tiene demencia mixta.</p>

En este continuo de la enfermedad, se reconocen tres fases: la EA preclínica, el deterioro cognitivo leve (DCL) debido a la EA y demencia debido a la EA (Mayo Clinic 2019). La fase de demencia se divide a su vez en tres etapas (leve, moderada y grave) que reflejan el grado en que los síntomas interfieren con la capacidad de realizar las actividades cotidianas. Si bien se sabe que el continuo comienza con la EA preclínica y termina con la demencia de EA grave, el tiempo que los individuos pasan en cada etapa de la enfermedad varía (Ilustración 1). De hecho, la duración de cada fase del continuo está influenciada por la edad, la genética, el sexo biológico y otros factores (Alzheimer's and Dementia 2021).



*Ilustración 1.-Evolución de enfermedad de Alzheimer (EA). Aunque las flechas son del mismo tamaño, los componentes del continuo EA no tienen la misma duración. Modificado de Alzheimer's and Dementia, 2021.*

Debido a que el envejecimiento normal también implica un deterioro cognitivo sutil, a menudo puede ser difícil distinguir el deterioro cognitivo debido a la EA de aquel asociado con la edad. Síntomas como la disminución de la velocidad de procesamiento, pérdida de ciertas habilidades relacionadas con la memoria o el lenguaje, y alteraciones en las funciones visuoespaciales y ejecutivas, pueden darse en el transcurso del proceso de envejecimiento normal. El deterioro cognitivo leve es una patología que hace que las personas que lo padecen tengan más problemas de memoria o alteraciones del pensamiento que lo esperable para alguien de su edad. Es un proceso relacionado con la pérdida de la "memoria reciente" y los síntomas son comunes a la EA inicial y a otras demencias no Alzheimer (Pettersen 2016).

## 1.2.- Diagnóstico diferencial de la Enfermedad de Alzheimer

Como resultado de los desafíos del diagnóstico y de una percepción histórica de la falta de beneficio de este debido a la ausencia de una terapia eficaz para la enfermedad, el subdiagnóstico es muy común. De hecho, algunas pruebas sugieren que más de la mitad de los pacientes que desarrollan demencia por EA nunca serán diagnosticados formalmente (Tahami-Monfared et al. 2022). Son

muchos y muy variados los tipos de demencia que pueden presentarse, pero ni la clínica ni las marcas anatomopatológicas permiten un diagnóstico claro (Tabla I). La clasificación etiológica de diferentes tipos de demencia ha demostrado ser una tarea difícil, tanto en el ámbito clínico como en el de investigación (Sacuiu 2016). Por ello, el objetivo final de las revisiones continuas de los criterios diagnósticos ha sido siempre el de mejorar la detección de la demencia en estadios leves.

Ya que no existe una prueba única para detectar la demencia debida a la EA, a nivel clínico su diagnóstico se realiza de forma multidisciplinar incluyendo a diferentes especialistas como neurólogos, neuropsicólogos, geriatras y psiquiatras geriátricos. Unas de las demencias que pueden interferir en un correcto diagnóstico de EA son las demencias secundarias a una patología vascular que ocurren como resultado de diferentes lesiones en vasos sanguíneos cerebrales y que disminuyen o interrumpen el flujo de sangre hacia el tejido cerebral. La hipertensión, las alteraciones del ritmo cardiaco, la diabetes y niveles alterados de colesterol son factores de riesgo para la demencia vascular. Los síntomas son muy similares los producidos por la EA en estadios iniciales, por ello es tan importante incluirlas en el diagnóstico diferencial ante la primera sospecha de EA. Además de una anamnesis pormenorizada, historial clínico y estudio sobre el estilo del vida del paciente, el diagnóstico en estos casos se apoya en pruebas de imagen que son clave para determinar si la causa de los síntomas depende de una patología vascular (Garre-Olmo 2018).

Hoy en día, existen test de cribado de demencia, estudiados y validados, que se caracterizan por su brevedad (tiempo de realización menor de 10 minutos) y la posibilidad de ser aplicados en Atención Primaria. Estas pruebas son de gran ayuda para realizar un primer cribado de la posible enfermedad, son sencillos de realizar para el paciente y de fácil aplicación desde un punto de vista clínico. Se pueden dividir en dos grupos, por un lado los test cognitivos breves y por otro lado las escalas funcionales (Villarejo and Puertas-Martín 2011). Del primer grupo destaca el test *Mini-Mental State Examination* o MMSE, utilizado por primera vez en 1975 por Folstein y colaboradores (Folstein, Folstein, and McHugh 1975). Entre ellos también están el *Memory Impairment Screen* (MIS), Fototest, y el Test del reloj. Las escalas funcionales, por su parte, se utilizan para determinar la capacidad de un paciente para realizar ciertas actividades de la vida cotidiana (Martín and Gil 2006). Dentro de ellas encontramos la escala de Lawton y Brody (IADL) que valora 8 áreas funcionales (cuidado del hogar, alimentación, compras, capacidad de usar el teléfono, realizar la colada, medio de transporte, toma de medicación y manejo de las finanzas), la Escala Bayer de actividades de la vida diaria (Bayer-ADL), o el Cuestionario de Actividades Instrumentales (Villarejo and Puertas-Martín 2011).

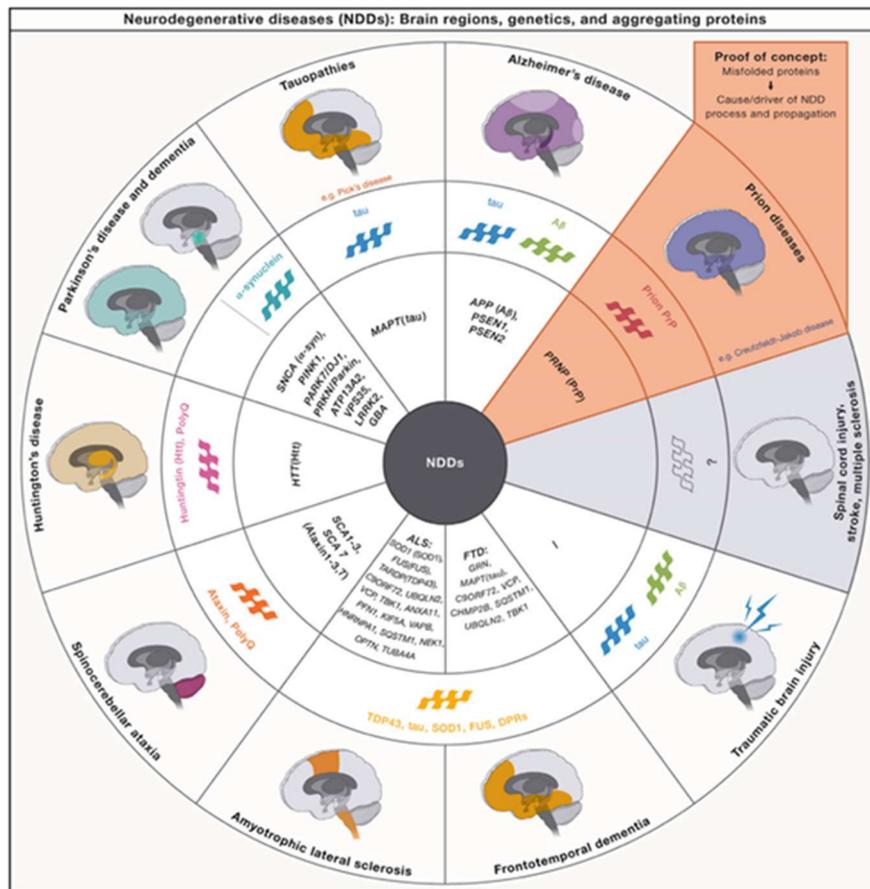
Tradicionalmente y desde un punto de vista únicamente sintomatológico, la EA se ha diagnosticado según los siguientes criterios (Jack et al. 2011):

- a) Demencia clínicamente establecida y documentada mediante un examen formal del estado mental.
- b) Déficits en  $\geq 2$  áreas de la cognición.
- c) Inicio gradual (es decir, de meses a años) y empeoramiento progresivo de la memoria y otras funciones cognitivas, sin alteración en el nivel de consciencia.
- d) Inicio después de los 40 años, generalmente después de los 65.
- e) Sin trastornos sistémicos ni encefálicos (tumores, accidentes cerebrovasculares...) que puedan explicar los síntomas.

### 1.3.- Criterios de diagnóstico anatomopatológicos de la Enfermedad de Alzheimer

Clínicamente y en base a la sintomatología se puede determinar si una persona tiene demencia, sin embargo, resulta difícil identificar el origen exacto. La EA es la causa más común de demencia, pero hay que matizar que los pacientes muestran normalmente síntomas mixtos y superpuestos poniendo de manifiesto, no solo la complejidad y heterogeneidad de la patología, sino los puntos en común con otras ENs (Tabla I). En estos casos, la herramienta que permite el diagnóstico más acertado es el análisis neuropatológico del tejido cerebral *post-mortem*.

A lo largo de los años se han ido describiendo varios tipos de marcadores, más y menos específicos de cada una, que permiten la clasificación de las ENs y su identificación. Uno de los marcadores distintivos de estas patologías es la agregación aberrante de algunas proteínas. Desde el punto de vista patológico, estos trastornos se caracterizan por la presencia de agregados proteicos específicos en las neuronas o las células de glía, denominándose **proteinopatías**. Muchas ENs muestran una posición de la misma proteína, depositada de forma anormal. en regiones anatómicamente distintas, lo que da lugar a patrones específicos con fenotipos clínicos, cognitivos y motores diferentes (Wilson et al. 2023). Las proteínas agregantes características en las ENs incluyen a los péptidos A $\beta$  formados por escisión de la proteína precursora amiloide (PPA) (gen *APP*), la Tau (gen *MAPT*), la  $\alpha$ -sinucleína (gen *SNCA*), la proteína de unión al ADN TAR 43 (TDP-43) (gen *TARDBP*), la superóxido dismutasa [Cu-Zn] (*SOD1*) (gen *SOD1*), las proteínas de repetición de dipéptidos (DPR) (gen *C9orf72*), la proteína de unión al ARN FUS (gen *FUS*), las poliglutaminopatías huntingtina (gen *HTT*) y ataxinas (gen *ATXN*), ) y la proteína priónica celular (PrPC) (gen *PRNP*) [revisión de (Wilson et al. 2023)] (Ilustración 2).



*Ilustración 2.- Proteínas agregantes más características, genes vinculados y regiones cerebrales afectadas en las Enfermedades Neurodegenerativas (ENS). En el círculo interior (mayúscula, cursiva) se indica una lista no exhaustiva de genes causales y de mayor riesgo vinculados a las diferentes ENS. Tomado de Wilson et al. 2023.*

Actualmente, se sabe que las combinaciones de una o más proteinopatías, con o sin enfermedad cerebrovascular, se dan con frecuencia en un mismo individuo. Además, algunos estudios longitudinales han descrito que esta mezcla de marcadores también se relacionan con los procesos de envejecimiento (Forrest and Kovacs 2023; Wilson et al. 2023). La coexistencia de proteínas agregantes, características de diferentes ENS, en un mismo individuo se llama “copatología” (Forrest and Kovacs 2023). No obstante, aun teniendo en cuenta este detalle, la mayoría de las ENS se caracterizan, como hemos dicho, por el predominio de una o dos proteínas agregadas; en el caso de la EA por la agregación de Aβ y Tau, entre las que pueden establecerse interacciones que de alguna forma aceleran el proceso neurodegenerativo (Tahami-Monfared et al. 2022).

Por ejemplo, la demencia con cuerpos de Lewy (DCL) es la tercera demencia en prevalencia, por detrás de la EA y las demencias vasculares. La causa de ésta es la acumulación intracitoplasmática de agregados esféricos y eosinofílicos de α-sinucleína que forman los cuerpos de Lewy. Estos cuerpos también se identifican en cerebros de pacientes con enfermedad de Parkinson (EP), los cuales desarrollan demencia en estadios avanzados. A veces, los cuerpos de Lewy pueden aparecer en

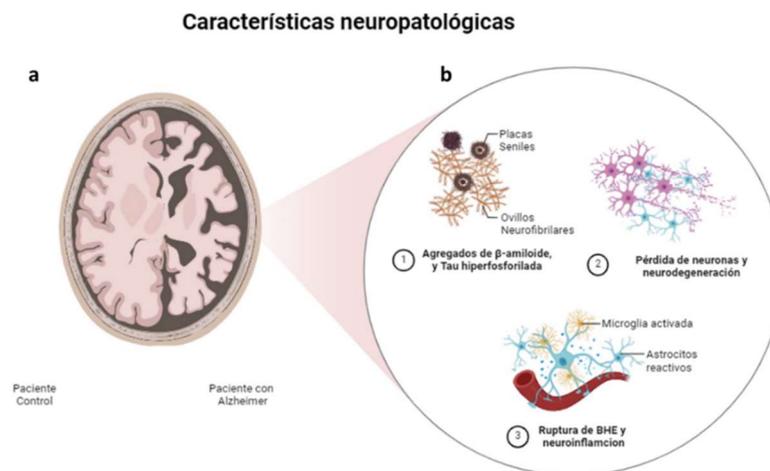
cerebros de pacientes con EA, al igual que en pacientes con DCL se pueden identificar PS y ONF (Forrest and Kovacs 2023). Los síntomas de la DCL incluyen síntomas extrapiramidales (rigidez, bradicinesia o inestabilidad en la marcha), fluctuaciones en las funciones cognitivas (periodos de alerta y orientación que se intercalan con periodos de confusión de forma habitual), o alteración de la memoria y de la capacidad visuoespacial de forma más intensa que en otras demencias, siendo habituales las alucinaciones visuales (Conde et al. 2015).

Las **taupatías** son un grupo clínica y neuropatológicamente heterogéneo de trastornos neurodegenerativos caracterizados por agregados anormales de Tau. Las taupatías pueden ser primarias o secundarias. Las primarias se clasifican según la isoforma Tau y los tipos de células donde ésta se acumule. Entre ellas se incluyen la enfermedad de Pick, la degeneración corticobasal, la parálisis supranuclear progresiva y la enfermedad del grano argirofílico. Las taupatías ambientales o secundarias incluyen la encefalopatía traumática crónica y taupatías geográficamente aisladas, como el complejo Guam-Parkinsoniano-demencia. En ellas, el *splicing* alternativo del gen de la proteína Tau, localizado en el cromosoma 17, da lugar a seis isoformas diferentes. En función de cuál de las seis isoformas se acumule, la enfermedad será y se comportará de forma diferente. En general, la presentación clínica de las taupatías varía según las áreas cerebrales afectadas, aunque, normalmente, se presenta con una combinación de síntomas cognitivos y motores. Como los síntomas se superponen y a menudo coexisten, el diagnóstico clínico preciso de taupatías como la EA y la enfermedad del grano argirófilo, es un desafío al no disponer de biomarcadores específicos (Devi 2023).

La demencia lobar frontotemporal (DLFT) comprende un grupo de síndromes clínicos que se caracterizan por cambios progresivos en el comportamiento, la función ejecutiva o el lenguaje. Las demencias frontotemporales son proteinopatías que afectan, sobre todo, a los lóbulos frontales y temporales (Boeve et al. 2022). Hoy en día se clasifican en tres grupos patológicos según las proteínas agregadas que predominen: DLFT asociada a Tau (DLFT-Tau), DLFT asociada a la proteína fijadora de ADN TAR-43 (DLFT-TDP), y DLFT asociada a la proteína de fusión en sarcoma (DLFT-FUS) (MacKenzie et al. 2010).

En el caso de la EA, las marcas histopatológicas más importantes, relacionadas con una agregación proteica defectuosa, son las PS y los ONF (Ilustración 3). Las PS son depósitos extracelulares de A $\beta$  en la sustancia gris del cerebro con un tamaño de entre 50-200  $\mu$ m. Se forman por el depósito de productos del procesamiento de la PPA que se acumulan en forma tóxicas para el tejido cerebral. En

cambio, los ONF son acúmulos intracitoplasmáticos de proteína Tau hiperfosforilada. En las neuronas la proteína Tau es esencial para la estabilidad de los microtúbulos, sin embargo, al agregarse de forma patológica causa la muerte neuronal debido a la inestabilidad de estos elementos del citoesqueleto. En este contexto, los métodos de diagnóstico neuropatológico de la EA incluyen técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas que persiguen poner de relieve las PS y/o los ONF y también el acúmulo de A $\beta$  (Hyman et al. 2012).



**Ilustración 3.-** Características macroscópicas y microscópicas clásicas de la enfermedad de Alzheimer. (a) Cambios macroscópicos de atrofia cerebral y aumento de los ventrículos. (b) Cambios microscópicos. 1. Agregación de las proteínas Tau y A $\beta$ . 2. Pérdida neuronal, de prolongaciones y de sinapsis. 3. Ruptura de la barrera hematoencefálica y neuroinflamación asociadas. Creación propia con Biorender.com.

En este contexto, los métodos de diagnóstico neuropatológico de la EA incluyen técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas que persiguen poner de relieve las PS y/o los ONF y también el acúmulo de A $\beta$  (Hyman et al. 2012).

Las técnicas de hematoxilina-eosina y de Nissl son utilizadas para visualizar la arquitectura general del tejido cerebral muestreado, sin embargo, no permiten observar en detalle las lesiones típicas y características de la EA. Algunos tipos de impregnaciones con sales de plata se han desarrollado y utilizado, clásicamente, para la detección tanto de ONF como de PS, ya que con ellas se impregnan específicamente los microtúbulos y los microfilamentos del citoesqueleto neuronal. Entre ellas destacan la que utilizan la Metenamina de Plata (PAM) y también la técnica de Reusche (Reusche 1991).

En la localización de las lesiones de la EA también se ha utilizado, tradicionalmente, el colorante Rojo Congo, debido a que es capaz de intercalarse entre las proteínas plegadas; en el caso de los ONF se intercala entre la proteína Tau, y en el de las PS hace lo propio con las hojas plegadas  $\beta$  del amiloide. La técnica original recurre a la luz polarizada para visualizar las lesiones en verde manzana, pero

mediante un protocolo de Rojo Congo modificado se consigue la visualización de las lesiones mediante la fluorescencia emitida por el depósito del amiloide (Navarro et al., 1999; Navarro et al., 2013). Otras técnicas que tienen como base la utilización de fluorocromos, como la tioflavina S, son también útiles para poner de relieve las señales histológicas de la patología. Además de todos estos métodos de detección, las técnicas inmunohistoquímicas para muchas de las moléculas implicadas de algún modo en la patología, como Tau y A $\beta$ , son actualmente claves a la hora de detectar las PS y los ONF, y realizar un diagnóstico fiable.

Microscópicamente, la EA se diagnostica, además de por las PS y los ONF descritos, por otras alteraciones tales como degeneración neuronal, depósito de amiloide en vasos sanguíneos cerebrales y meníngeos, presencia de cuerpos de Hirano, aumento del número de células gliales y degeneración gránulo-vacuolar en las células piramidales del hipocampo. Las zonas más afectadas, en este sentido, son el hipocampo, el subículo, las amígdalas y las áreas de asociación neocorticales (Guimerà et al. 2002; Lei et al. 2021).

Pero, además de estos cambios a nivel microscópico, en la EA también se observan cambios anatomopatológicos *post-mortem* característicos a nivel macroscópico (Ilustración 3). El principal es la reducción del volumen y peso de los hemisferios cerebrales, debido a la atrofia del encéfalo, a expensas de la atrofia de la sustancia gris de la corteza cerebral. Se identifican, por ello, circunvoluciones más separadas y una mayor profundidad de los surcos interhemisféricos, así como un aumento de la dilatación del sistema ventricular, derivada posiblemente de la pérdida de corteza cerebral (Iov et al. 2019; Lei et al. 2021) (Ilustración 3). El volumen reducido del hipocampo es uno de los biomarcadores más fiables de la EA, ya que se ha encontrado que la atrofia no es una medida específica de esta enfermedad (van Oostveen, de Lange, and Orzechowski 2021).

Una vez conocidas las formas de detección de las señales anatomopatológicas, quedaba por normalizar y protocolizar unos criterios fiables para determinar cuándo un paciente presentaba o no EA. Unos de los primeros criterios de diagnóstico clínico para la EA, fueron publicados por la Asociación de Trastornos Neurológicos y Comunicativos y Accidentes Cerebrovasculares y la Asociación de Enfermedad de Alzheimer y Trastornos Relacionados (NINCDS-ADRDA) en 1984 (McKhann et al. 1984). Estos eran criterios de exclusión clínica para la EA en la etapa de demencia, que evidenciaban la necesidad de un examen neuropatológico *post-mortem* para hacer un diagnóstico definitivo. **Los criterios CERAD** (*Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*) fueron establecidos en 1991 con el objetivo de establecer unas pautas generales para la

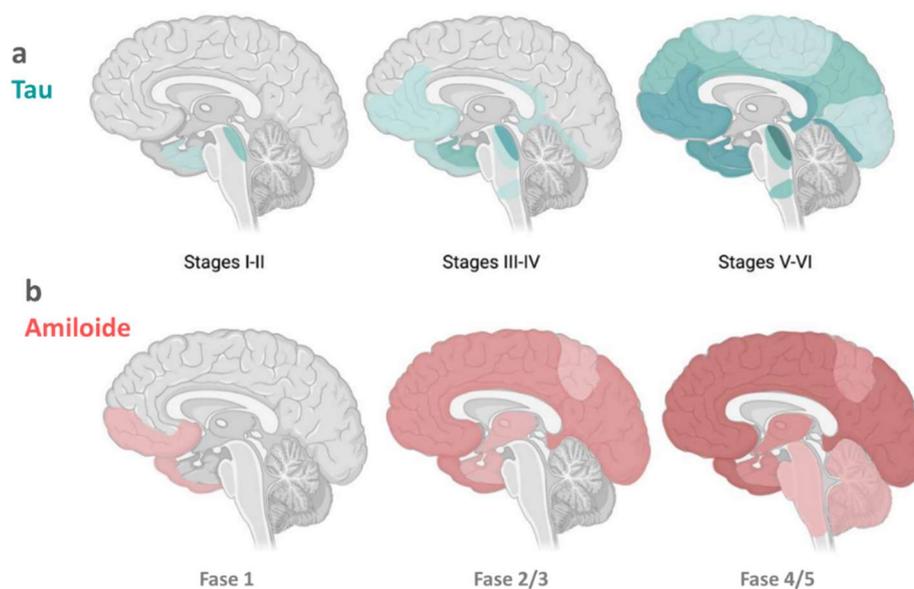
detección de la EA. Se basan en la cuantificación de PS neocorticales en preparaciones fijadas con parafina y teñidas, además de con hematoxilina-eosina, con técnicas argénticas como el Bielschowsky, tioflavina o Rojo Congo. El proceso de recuento se realiza en tres pasos, de modo que se determina un índice de PS relativo a la edad a la que falleció el paciente, que posteriormente se valora junto con el historial clínico del mismo. Así pues, se obtiene una tabla que permite diagnosticar la enfermedad como definitiva, probable o posible (Mirra, 1997).

De manera paralela, **Braak & Braak** publicaron en 1991 un estudio que demostraba que los ONF aparecían en el cerebro de pacientes con EA de forma progresiva (Braak & Braak, 1991). Ellos no tenían en cuenta el depósito de A $\beta$  o la formación de PS, porque, aunque en general su incremento avanzaba con el estadio de la enfermedad, su distribución presentaba una mayor variabilidad interindividual. Así, establecieron seis estadios en función de la cantidad de ONF presentes en tres zonas diferentes; la corteza olfatoria, el hipocampo y la corteza occipital, además de algunas zonas de la neocorteza. Este sistema fue revisado posteriormente en 2006, actualizando el procedimiento para facilitar su uso pero manteniendo la misma base (Braak et al., 2006). A continuación, se describen los grados propuestos por Braak (Ilustración 4):

- Estadio I: en estos casos se ve afectada la corteza transentorrinal, una zona situada entre la corteza entorrinal y la temporal. Es la capa celular superficial de la corteza entorrinal (Pre- $\alpha$ ) la primera zona en la que se forman los ONF. Las células con morfología estrellada se transforman en células piramidales. En este estadio I ocurren un número pequeño de estos cambios.
- Estadio II: este estadio se caracteriza por un aumento en los cambios dentro de la corteza transentorrinal, que van decreciendo a medida que se alcanza la zona entorrinal. En la zona CA1 del hipocampo se observa un aumento en el número de ONF, y aparecen algunos aislados en el área neocortical.
- Estadio III: las áreas transentorrinal y entorrinal están ampliamente afectadas, y en ellas aparece un gran número de ONF fantasma. La zona CA1 del hipocampo está parcialmente afectada. Las células piramidales del subículo comienzan a acumular ONF. Algunos aparecen aislados por la neocorteza, siendo más característicos en las zonas III y V de los lóbulos frontal, temporal y occipital.
- Estadio IV: el área Pre- $\alpha$  se ve altamente afectada, de forma que aparecen numerosos ONF fantasma en las zonas transentorrinal y entorrinal. El área CA1 del hipocampo se ve

gravemente alterada por un número elevado de estas lesiones. También comienza a verse afectado el isocórtex.

- Estadio V: se agrava el estado de la capa Pre- $\alpha$ , y comienzan a alterarse las zonas Pre- $\beta$  y Pre- $\gamma$ . Todo el hipocampo se ve afectado, y el neocórtex se ve ampliamente dañado.
- Estadio VI: en esta etapa los cambios comienzan a hacerse más pronunciados. Algunos ONF son degradados y remplazados por células de la glía. El neocórtex se ve gravemente afectado, al igual que el hipocampo; para diferenciar los estadios V y VI se observa el grado de afectación de la *fascia dentata* en este último. En las áreas sensoriales aparecen redes de hilos neurofibrilares, y solo un número reducido ONF, constituyendo esto otra diferencia entre los estadios V y VI. Por último, el núcleo subcortical también se ve muy afectado.



**Ilustración 4.-** (a) En azul, patrón de propagación de Tau por todo el cerebro desde el estadio I-II de Braak hasta el estadio III-IV (regiones límbicas) y el estadio V-VI (áreas isocorticales). (b) El patrón de propagación de la acumulación de A $\beta$  por todo el cerebro (en rojo) comienza en las áreas frontales y se propaga a otras regiones a medida que avanza la enfermedad. Tomado de (van Oostveen et al. 2021).

**Los criterios de Khachaturian** establecen el uso de las mismas tinciones que los CERAD para la determinación de PS y ONF. La diferencia es que las muestras de tejido son tomadas de tres regiones de la neocorteza como son la frontal, la temporal y la parietal. El diagnóstico se basa en el recuento de PS y ONF a un aumento de 200x; según esto, se determina si hay, o no, EA (Khachaturian 2011).

**Los criterios de Reagan**, junto con el NIA (*National Institute on Aging*), establecen una relación entre los propuestos por la CERAD y otros métodos posteriores como los de Braak. Así pues, recomiendan el uso de las técnicas de la CERAD para la fijación, procesamiento y tinción del tejido, además de la determinación del estadio de Braak correspondiente (Hyman et al. 2012; Montine et al. 2012). Estos criterios surgen debido a las críticas a la CERAD, ya que no tienen en cuenta la presencia de ONF para el diagnóstico de la EA.

En 2011, el Grupo de Trabajo Internacional (**IWG**) así como el Instituto Nacional sobre el Envejecimiento de EE.UU.-Asociación de Alzheimer (**NIA-AA**), desarrollaron unos criterios para el diagnóstico de la EA que definen mejor los fenotipos clínicos e integran distintos biomarcadores (*pre-mortem* y *post-mortem*) en el proceso diagnóstico (Dubois et al. 2014). Estos criterios están diseñados para guiar tanto al clínico como al investigador, incorporando avances en el estudio de biomarcadores en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y técnicas de neuroimagen, lo que facilita un diagnóstico más preciso y temprano de la enfermedad. En este caso, el diagnóstico de la EA se divide en: probable, posible o confirmado (Rojo 2014). Los criterios **NIA-AA** de 2018 representan un enfoque más exacto y actualizado para el diagnóstico de la EA, con un fuerte énfasis en la detección y caracterización de la enfermedad mediante biomarcadores (Jack et al. 2018). En este sentido, se ha ideado un sistema de clasificación AT(N), donde A es amiloide, T es la proteína Tau y N la existencia de neurodegeneración. Este sistema ayuda a caracterizar el estado biológico de la EA, y a diferenciarla de otras posibles condiciones neurodegenerativas. También se centra en detectar la fase asintomática de la patología.

En línea con los criterios anteriormente mencionados, y sin quitarle importancia al diagnóstico neuropatológico, en la actualidad también se estudian algunos biomarcadores, que se obtienen normalmente del LCR del paciente, que ayudan a detectar la EA en estado presintomático, lo que supone poder realizar un estudio terapéutico adecuado en cada caso (Janeiro et al. 2021). Los marcadores utilizados, actualmente, para el diagnóstico de la EA son  $A\beta_{42}$ , t-Tau y p-Tau. El primero se detecta en menor cantidad en el LCR de pacientes con EA que en el de individuos sanos, mientras que por el contrario los otros dos se encuentran sobreexpresados en el primero. Esto se debe a que el péptido  $A\beta$  se acumula en el tejido cerebral de pacientes con EA, mientras que la pérdida de neuronas corticales con la enfermedad aumenta la cantidad de t y p-Tau en el LCR (Janeiro et al. 2021). No obstante, cabe resaltar que el análisis conjunto de los tres marcadores aumenta la especificidad y sensibilidad de la prueba, si bien una alteración en los resultados se puede encontrar

también en pacientes con DCL. Podríamos decir que hoy en día no existe un criterio unánime a la hora de decidir los valores de referencia.

Cabe destacar en este punto, que el estudio de estos biomarcadores en plasma sanguíneo es un procedimiento menos invasivo que la obtención de LCR mediante punción lumbar, lo que favorece la toma de muestra. No obstante, la obtención de marcadores de EA en sangre es más compleja que en el LCR, principalmente por el estado de dilución del medio, y porque que solo una pequeña cantidad de esas proteínas pasan del tejido cerebral al torrente sanguíneo. Además, las pocas proteínas liberadas a la sangre, son degradadas por proteasas, y metabolizadas y eliminadas por el propio cuerpo (Janeiro et al. 2021).

#### **1.4.- Teorías sobre el origen de la Enfermedad de Alzheimer**

Las señales características de la EA (ONF y PS) son, para la mayoría de los investigadores, más que unas meras marcas anatomopatológicas, buscando en ellas las causas de la patología. Se sabe que la proteína Tau aberrante se acumula intracelularmente en forma de filamentos helicoidales que dan lugar a los ONF y, finalmente, a la muerte neuronal. Por el contrario, la agregación y fibrilación de los péptidos A $\beta$  que se liberan desde las neuronas y que se acumulan extracelularmente al espacio extracelular es la causante de un ambiente extracelular alterado que, a su vez y según estudios recientes, media la neurofibrilogénesis de la proteína Tau. La disfunción vascular también desempeña un papel crucial en el progreso de la EA, sugiriéndose que las PS y los ONF podrían no ser la causa de la neurodegeneración, sino más bien una consecuencia de ésta, es lo que se conoce como hipótesis vascular. A continuación, se describirán en detalle cada una de las vías moleculares que conducirían a la muerte neuronal por excitotoxicidad y llevarían a los cambios de deterioro cognitivo que caracterizan a la EA.

##### **1.4.1.- Papel del péptido amiloide en la progresión de la Enfermedad de Alzheimer**

La hipótesis de la “cascada del amiloide” ha dominado durante muchos años el campo de la investigación de la EA. Se basa, en gran medida, en datos bastante persuasivos sobre mutaciones de la proteína de PPA de la EA autosómica dominante y datos de modelos genéticos de ratón que parecen corroborarlos (Cheignon et al. 2018; Ferreira et al. 2021). La identificación de una mutación patogénica en el gen de la PPA llevó a John Hardy y David Allsop a plantear la hipótesis de que su incorrecta metabolización provocaría la acumulación de A $\beta$ , siendo este el desencadenante inicial de la patología (Hardy & Higgins, 1992; Hardy & Allsop, 1991). A esto le seguirían el resto de los sucesos

característicos de la EA: hiperfosforilación de Tau, formación de ONF y muerte neuronal (Ilustración 5). Esta hipótesis propone una relación entre ambas proteínas, con A $\beta$  como disparador y Tau como bala. Es una teoría convincente y simple, que, aunque no es válida en todos los casos, probablemente sea cierta para algunas formas genéticas de EA (Arnsten et al. 2021). De este modo, las mutaciones que aumentan la producción y acumulación de A $\beta$  son responsables de desencadenar la enfermedad de Alzheimer, mientras que las alteraciones en la proteína Tau conducen a otras taupatías, pero no provocan EA.

Como decimos, la hipótesis de la cascada amiloide se vio reforzada por el hecho de que la EA puede ocurrir debido a mutaciones autosómicas dominantes en los genes de presenilina (*PSEN1* y *PSEN2*) que codifican las proteínas PSEN1 y PSEN2, las cuales pueden incrementar la generación de A $\beta$  y mediar en la generación de agregados y depósitos de A $\beta$  insolubles en última instancia. Las mutaciones en los genes *PSEN* parecen ser la causa principal de la fEA. Actualmente se han mapeado más de 150 mutaciones causales y la mayoría parecen aumentar la generación de los péptidos amiloides más insolubles (Uddin et al. 2020).

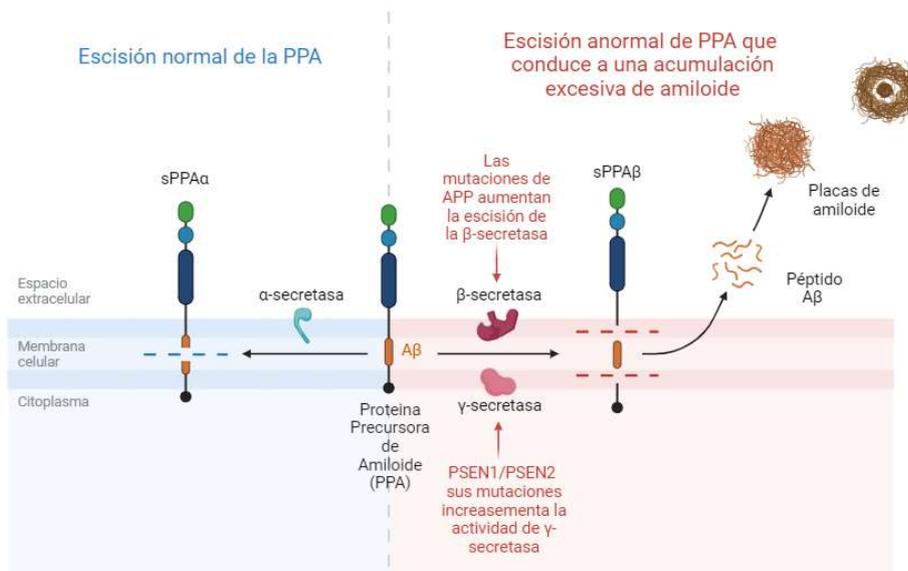
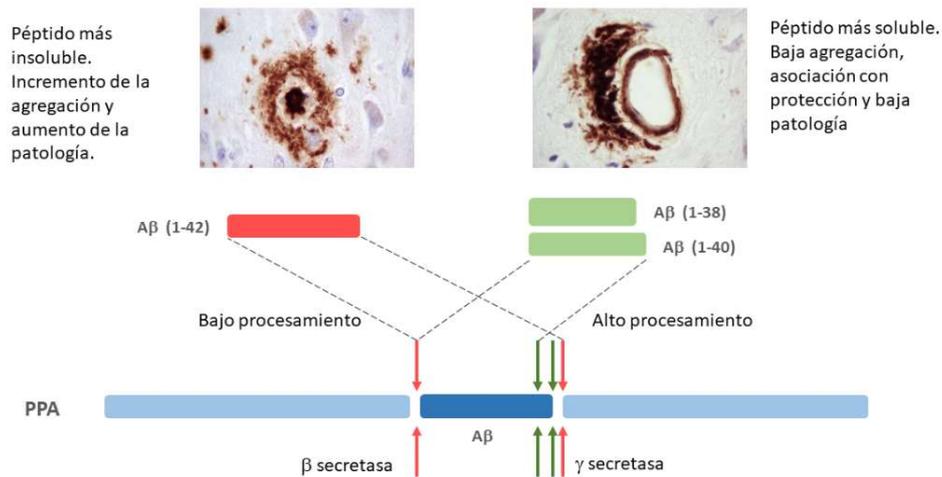


Ilustración 5.- Vías de procesamiento del amiloide. Creación propia con Biorender.com.

El péptido A $\beta$  es el actor principal en la hipótesis de la “cascada del amiloide”, compuesto por entre 39 y 43 aminoácidos, fue descubierto en 1987 (Gravina et al. 1995). Este péptido es un producto derivado de la PPA, una glicoproteína transmembrana de tipo I formada por 695–770 aminoácidos. A pesar de que no se conocen muchos detalles de su fisiología, su función normal parece estar asociada con procesos implicados en el crecimiento de las prolongaciones neuronales y la regulación

sináptica. Su procesamiento involucra a dos proteasas que entran en competencia. En la vía más común, la proteasa  $\alpha$ -secretasa provoca la escisión de PPA, que conduce a la formación de PPA alfa soluble (sPPA $\alpha$ ) y un fragmento C-terminal 83 unido a la membrana celular (CTF83). Esta vía se conoce como no amiloidogénica, ya que los fragmentos producidos no forman depósitos de amiloide insoluble (Ilustración 5). Por otro lado, en la otra vía, la enzima  $\beta$ -secretasa (una aspartil proteasa identificada como BACE 1 y 2), con una alta especificidad de secuencia, puede escindir PPA en el extremo N-terminal del dominio A $\beta$ , en los residuos Glu<sup>682</sup> o Asp<sup>672</sup> generando un PPA  $\beta$  soluble (sPPS $\beta$ ) y un fragmento C-terminal 99 unido a la membrana celular (CTF99). Este fragmento, después de ser procesado por la  $\gamma$ -secretasa, libera el péptido A $\beta$ . La  $\gamma$ -secretasa es un complejo enzimático de cuatro proteínas que incluyen al menos PSEN 1, PSEN 2 y nicastrina que hidroliza la PPA en el medio de su dominio transmembrana (Ilustración 5). A través de esta vía se producen formas más largas de A $\beta$  (A $\beta$ <sub>1-42</sub> y A $\beta$ <sub>1-43</sub>,) que son insolubles y se depositan en forma de amiloide fibrilar, que es el componente principal de las PS.

El A $\beta$  se genera de forma normal en los individuos, pero, en algunos casos, este péptido comienza un proceso de agregación que es el punto de partida de la progresión de la EA. Existen varias isoformas de A $\beta$  con una longitud variable en sus residuos aminoacídicos, incluidos A $\beta$ <sub>1-40</sub> (el más abundante) y A $\beta$ <sub>1-42</sub> (la isoforma menos soluble). La agregación de A $\beta$  desencadena la generación de protofibrillas, fibrillas y oligómeros, que eventualmente pueden conducir a la formación de PS. Se ha descrito la existencia de diferentes tipos de placas en relación con el tipo de A $\beta$  dominante y la agregación de éste en las mismas. Así se reconocen PS difusas y PS maduras o compactas (Ilustración 6). De todas maneras, el depósito de A $\beta$  también se puede producir alrededor de los vasos sanguíneos en los cerebros de pacientes con EA, dando lugar a un tipo de patología conocida como angiopatía cerebral amiloidea (ACA) (Schiavolin et al. 2024). La ACA puede ser resultado de un depósito focal o generalizado de A $\beta$  en los vasos sanguíneos cerebrales leptomeníngeos e intracorticales, causando lesiones vasculares que pueden contribuir aún más a la demencia, al impedir el transporte de nutrientes a través de la barrera hematoencefálica (BHE) y la eliminación de solutos del cerebro (Schiavolin et al. 2024).

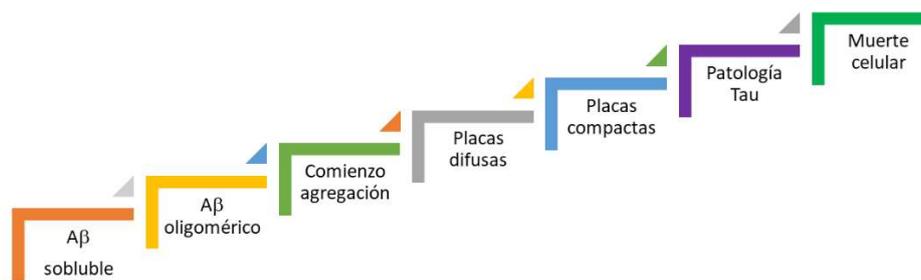


*Ilustración 6.- Tipos más frecuentes de Aβ y depósitos que forman. Creación propia con PowerPoint.*

La forma insoluble del péptido Aβ es tóxica para las neuronas y al mismo tiempo estimula efectos tróficos en las células gliales. En las neuronas, se une a receptores específicos, lo que induce la formación de radicales libres. Estos radicales libres provocan daños en la membrana neuronal y en el ADN mitocondrial, lo que hace que las neuronas sean más vulnerables (Cheignon et al. 2018; Petrushanko, Mitkevich, and Makarov 2023). En las células microgliales, el péptido Aβ provoca la liberación de radicales libres, citocinas inflamatorias (como el IFN-γ y el TNFα) y diversas interleucinas, lo que promueve una amplificación del daño celular local debido a la reacción inflamatoria (Weisman, Hakimian, and Ho 2006). Además, el péptido Aβ contribuye a la neuropatología de la EA al activar la cascada de complemento y unirse específicamente a proteínas de fase aguda, lo que reduce la producción de la PPA neuroprotectora y aumenta los niveles de PPA asociada a células. Esto proporciona un sustrato adicional para la generación de Aβ e induce una respuesta de más células gliales. (Butterfield 2002).

Clásicamente, se ha considerado que las PS son responsables de la neurodegeneración en la EA. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que estos daños pueden ocurrir también en su ausencia. En base a ello, algunos autores han buscado otras formas por las que el Aβ pueda ejercer su toxicidad, sugiriendo a la agrupación de éste en forma de oligómeros (oAβ) como la más dañina a nivel celular (Valensin, Gabbiani, and Messori 2012). Entre los oAβ se incluyen dímeros, trímeros, tetrameros, dodecámeros y también otros oligómeros de entre 2 y 20 nm de diámetro (Ilustración 7). Todas estas formas se pueden hallar tanto en el interior celular como en el espacio extracelular y, además, no actúan siempre del mismo modo, sino que pueden hacerlo de distinta forma

dependiendo de su tipo o localización (Solis, Hascup, and Hascup 2020). Así mismo, la solubilidad de los oA $\beta$  los hace biológicamente activos y muy peligrosos, ya que son capaces de unirse específicamente a los procesos dendríticos y sinapsis de la neurona y bloquear el potencial la membrana (Valensin et al. 2012). Sin embargo, los oA $\beta$  no siempre resultan tóxicos. Algunos estudios proponen que ciertos monómeros u oligómeros podrían desempeñar funciones como la regulación de la plasticidad neuronal o la promoción de procesos como el desarrollo, la proliferación o la diferenciación de determinadas células (Solis et al. 2020).



*Ilustración 7.- Hipótesis de la progresión de la patología del péptido A $\beta$ . Esquema realizado con PowerPoint.*

Se ha descubierto que la acumulación de A $\beta$  está asociada con el alelo *APOE  $\epsilon$ 4*, considerado el factor de riesgo genético más potente para la EA de aparición tardía, presente en el 40 % de los pacientes. Este gen codifica para la apolipoproteína E (Apo E), implicada en el metabolismo lipídico. La función de la Apo E es servir como ligando para la familia de proteínas del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL), que median el transporte del colesterol a las neuronas. Esta función es esencial para el crecimiento axonal, la formación y la remodelación sináptica. En realidad, los mecanismos que subyacen a las influencias específicas de las isoformas de Apo E sobre la agregación y acumulación de A $\beta$  en el cerebro no se comprenden completamente pero, probablemente, se deba a sus diferentes capacidades para eliminar A $\beta$  (Uchida et al. 2022). Algunos resultados son consistentes con la hipótesis de que la Apo E no lipidada puede estimular la agregación y deposición de A $\beta$  en el cerebro (Xu, Finkelstein, and Adlard 2014). A diferencia de otras isoformas, *APOE  $\epsilon$ 4* puede aumentar el A $\beta$  al disminuir su eliminación y mejorar la hiperfosforilación de Tau. De hecho se ha observado que APO E4, aparece junto a las PS y ONF propios de la EA (Liu et al., 2019).

Sea el A $\beta$  causa o no de la patología, la investigación se ha centrado en los últimos años en la eliminación del péptido, bien sea directamente o bien indirectamente potenciando su aclaramiento. Las diferentes formas en las que el cerebro podría deshacerse fisiológicamente de él involucran tanto

mecanismos intracelulares como extracelulares. En el ámbito celular, se ha visto que las neuronas pueden eliminar el PPA y el A $\beta$  mediante autofagia. Se ha propuesto que el fallo del transporte por disfunción del complejo dineína-dinactina causado por la fosforilación de Tau, resultaría en una acumulación de autofagosomas y posteriormente la muerte neuronal (Uddin et al. 2020). A nivel extracelular, la microglía estaría implicada en fagocitar y eliminar los péptidos insolubles de A $\beta$ ; se ha visto localizada en los alrededores de las PS maduras. Existe evidencia de que la activación de la microglía en el SNC es heterogénea, clasificándose en dos tipos: fenotipo M1 y fenotipo M2. Dependiendo de los fenotipos activados, la microglía puede tener efectos citotóxicos o neuroprotectores. Además, los cambios de los fenotipos de la microglía dependen de las etapas y la gravedad de la EA. La microglía M2 es la primera en aparecer y presenta características reparadoras y antiinflamatorias, M1 predomina en el sitio de la lesión en la etapa final de la enfermedad, cuando el proceso de reparación de la microglía M2 se ve afectado (Tang and Le 2016).

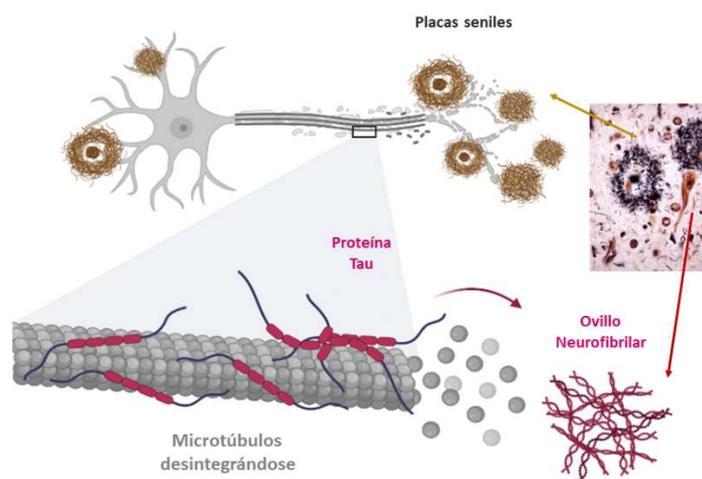
Los péptidos A $\beta$  que se encuentran en diferentes estados de agregación (monómeros, oligómeros y fibrillas) pueden atravesar la BHE a diferentes velocidades y afectar el estado de las células endoteliales de diferentes maneras. La tasa de depuración para la liberación de oligómeros desde el cerebro al torrente sanguíneo es mayor que para las fibrillas y los monómeros. Los oligómeros de A $\beta$  tienen el mayor efecto tóxico sobre las células de la BHE y se transfieren más rápidamente por transcitosis desde el lado cerebral de la BHE al lado sanguíneo. Durante la EA, el equilibrio entre la entrada de A $\beta$  al cerebro desde la periferia y su salida se altera. El A $\beta$  cambia el estado redox de las células de la BHE, lo que a su vez cambia el funcionamiento de las mitocondrias y altera la función de barrera de las células endoteliales al afectar a las proteínas de unión estrecha y a los transportadores transportadores membrana de A $\beta$ , como RAGE (del inglés *receptor for advanced glycation endproducts*) y LRP1 (del inglés *low-density lipoprotein receptor*) (Petrushanko et al. 2023). Por lo anteriormente dicho, la ruptura o disfunción de la BHE debido a la EA producirá la acumulación del A $\beta$  en el cerebro que contribuirá a la progresión de la patología.

#### 1.4.2- Papel de la proteína Tau en la Enfermedad de Alzheimer

Algunas evidencias ponen en duda el papel central del A $\beta$  en la patogenia de la EA. El análisis de un gran número de cerebros humanos a lo largo de la vida ha puesto de manifiesto que la patología Tau comienza aproximadamente una década antes de la agregación del péptido A $\beta$  (Braak and Braak 1997; Braak and Braak 1991). Así, se ha observado que la extensión de los ONF se correlaciona mejor con la severidad de la enfermedad que la presencia de PS, que aparecen incluso en el cerebro de

personas sanas (Braak et al., 2006). El descubrimiento de que mutaciones de los genes *PSEN1/ApoE3* en pacientes que no desarrollan demencia a pesar de la formación extensa de  $\alpha\text{A}\beta$ , y que presentan pocos ONF, reforzó la noción cada vez mayor de que la Tau anormal puede ser un factor etiológico clave. Además, la patología de Tau, pero no la  $\text{A}\beta$ , se correlaciona mejor con la pérdida progresiva de sustancia gris y el deterioro cognitivo. Es importante destacar que la patología Tau exhibe un patrón y una secuencia altamente selectiva en la progresión de la enfermedad (Arnsten et al., 2021; Braak & Braak, 1997).

Al hablar de “Tau” se hace referencia a una familia altamente conservada de proteínas asociadas a microtúbulos (MAP, del inglés *microtubule-associated proteins*), que aparece en el SNC de distintos mamíferos. Tau se expresa principalmente en los axones de las neuronas, aunque también se ha hallado en menores cantidades en oligodendrocitos y astrocitos. Las principales funciones de esta proteína consisten en promover la polimerización de la tubulina para formar microtúbulos y estabilizar éstos una vez se han constituido (Ilustración 8). Cuando esta proteína se separa de los microtúbulos puede dar lugar a una disfunción sináptica, que causa distintos efectos según la región a la que afecta. Así, por ejemplo, el deterioro de la memoria en la EA se asocia con el deterioro de las sinapsis en el hipocampo (Ayers, Giasson, and Borchelt 2018).



*Ilustración 8.- Tau hiperfosforilada y su implicación en las placas seniles y ovillos neurofibrilares. Creación propia con Biorender.com.*

En el cerebro humano adulto se expresan seis isoformas distintas de Tau de entre 352 y 441 aminoácidos, las cuales se originan por *splicing* alternativo de un único gen, *MAPT*, que se encuentra

en el cromosoma 17. Se producen variaciones en dos zonas: en la región N-terminal pueden aparecer bloques de 29 o 58 aminoácidos (isoformas 1N y 2N), o ninguno (isoforma 0N); y en la región de unión a microtúbulos pueden aparecer tres o cuatro repeticiones en tándem (isoformas 3R y 4R). Así, combinando estas variaciones, se obtienen las seis isoformas presentes en humanos. La expresión de las distintas isoformas de Tau está regulada a lo largo del desarrollo. Por ejemplo, en el feto no aparecen las isoformas 4R pero sí que va apareciendo la isoforma 3R conforme avanza la EA (Goedert et al. 1989; Moloney et al. 2023; Moloney, Lowe, and Murray 2021).

En determinadas ENs y por causas que aún se desconocen, la proteína Tau se pliega de forma incorrecta y forma acúmulos anormales en el SNC. Estas patologías, que ya hemos comentado, se denominan taupatías y entre ellas se encuentra la EA (Gibbons, Lee, and Trojanowski 2019). Los niveles de expresión de Tau no parecen verse modificados en pacientes de EA, lo que ocurre es que la proteína Tau, que normalmente contribuye a estabilizar los microtúbulos, experimenta una hiperfosforilación irreversible, debido a la acción de las quinasas I y II, lo que facilita su agregación en fibrillas. Esta proteína, que en su forma normal es soluble, se va acumulando progresivamente en el citoplasma para formar filamentos pareados helicoidales (FPH) en el interior de las células, depositándose tanto en el soma de las neuronas como en sus prolongaciones (Braak & Braak, 1991). Dentro del citoplasma se forman los ONF que aparecen en las células en degeneración y, cuando éstas mueren, los filamentos quedan en el neuropilo conociéndose como “ovillos fantasmas” (Braak et al. 2006; Moloney et al. 2021) (Ilustración 9). Todo ello conlleva una reducción del transporte axonal y, posteriormente, la neurodegeneración y muerte de las neuronas, lo cual está correlacionado con el declive cognitivo y con la pérdida de sinapsis y del transporte de la señal eléctrica (Cristóvão, Santos, and Gomes 2016). Cuando las fibrillas están depositadas en los axones pueden llegar a formar parte importante de las PS.

La proteína Tau también está implicada, a través del transporte de PPA a la membrana celular, en el mantenimiento de la función neuronal y sináptica. Debido a este papel, la modificación de su función o estructura tiene gran importancia en la patología de EA (Derry et al. 2020). Estudios en cerebros humanos con EA indican que la patología de Tau podría comenzar una década antes de la aparición de las PS. Este proceso iniciaría en la región transentorrinal, extendiéndose posteriormente a las capas superiores de la corteza entorrinal, lo que provocaría una rápida degeneración neuronal (Braak & Braak, 1995). Con la progresión, las alteraciones se extenderían a la corteza de asociación del hipocampo y a la corteza frontal, parietal y occipital. Se ha propuesto que la proteína Tau

hiperfosforilada podría acelerar la formación de A $\beta$  y, junto con otros factores, determinar la velocidad y extensión de la cascada neurodegenerativa. Del mismo modo, A $\beta$  podría acelerar la fosforilación anormal de Tau, dando lugar a un círculo vicioso que probablemente sea fundamental para el desarrollo de la EA (Arnsten et al. 2021; Muralidar et al. 2020).



*Ilustración 9.- Formación de los ovillos neurofibrilares (ONF). Los ONF existen en un espectro que va desde las formas tempranas hasta las avanzadas de tres niveles de madurez distintos, pero superpuestos. Modificado de Moloney et al. 2021.*

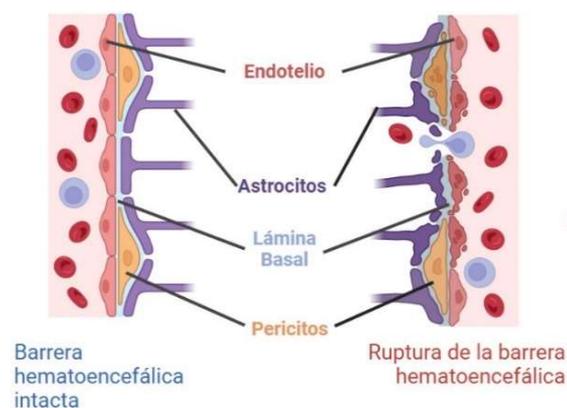
En la EA, el patrón predecible de propagación de Tau en el que se basa la clasificación de Braak y su correlación con la clínica de la enfermedad (Braak & Braak, 1991; Braak et al., 2006) han alimentado una hipótesis que propone una expansión de Tau cerebral de forma similar a como ocurre en el caso de los priones, de manera que la propagación de la forma patológica sería la que provocaría la progresión de la EA (Ayers et al. 2018). Otro punto que apoya esta teoría es el hecho de que la proteína Tau presenta distintas morfologías en cada taupatía. Así, se ha sugerido la posibilidad de que diferentes isoformas de Tau sean responsables de cada taupatía, de manera similar a como distintas cepas de priones causan diferentes enfermedades priónicas (Gibbons et al. 2019).

#### 1.4.3- Teoría vascular de la EA

En contraposición con el modelo en el que la neurona es el origen de la EA, aparece la teoría vascular (De la Torre 2002). Esta teoría se apoya en varias evidencias, entre las que destacan las similitudes a nivel de factores de riesgo y síntomas que muestra la EA con otras demencias vasculares, la demostración de que el uso de fármacos que mejoran la insuficiencia cerebrovascular mejora

también la sintomatología de la EA, así como que la hipoperfusión vascular cerebral puede desencadenar cambios metabólicos y degenerativos en el tejido cerebral (De La Torre 1999).

Esta teoría supone la existencia de una disfunción vascular previa, que jugaría un importante papel en el desarrollo de la EA. Así, múltiples vías derivadas del daño de la “unidad neurovascular” (UNV) podrían ser el estímulo inicial que disparen el inicio de esta patología. La UNV formada por la triada endotelio/glía/neurona, controla la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) y el flujo sanguíneo cerebral, y mantiene la composición química del "medio" neuronal, que es necesaria para el funcionamiento adecuado de los circuitos neuronales (Ilustración 10). Publicaciones recientes indican que la disfunción de la BHE se asocia con la acumulación de varias moléculas vasculotóxicas y neurotóxicas dentro del parénquima cerebral, y con una reducción del flujo sanguíneo cerebral e hipoxia (Montagne, Zhao, and Zlokovic 2017; Zhao et al. 2015; Zlokovic 2011). Por ejemplo, la ruptura de la BHE causaría la acumulación de proteínas plasmáticas como albumina e inmunoglobulinas que causarían edema cerebral, o como la plasmina responsable de la degradación de la laminina neuronal y del consecuente daño del nicho neuronal. Otras moléculas depositadas alrededor de los vasos dañados podrían ser algunos productos derivados de la hemoglobina, incluido el hierro, que aumentarían el nivel de estrés oxidativo del parénquima nervioso (Zlokovic 2011).



*Ilustración 10.- Composición de la barrera hematoencefálica. Ruptura y discontinuidad durante la Enfermedad de Alzheimer. Creación propia con Biorender.com.*

Además de una BHE conservada, es importante el mantenimiento de un flujo sanguíneo cerebral (FSC) adecuado. El FSC está regulado por la actividad neuronal y el metabolismo local, lo que se conoce como “acoplamiento neurovascular”. Por ello, ante una mayor actividad y metabolismo neuronal se activa la hiperemia cerebral a través de un aumento del flujo sanguíneo en los capilares,

donde los pericitos tendrían un importante papel. La disminución del FSC detectada en la EA, tendría un efecto muy serio en la nutrición, oxigenación y mantenimiento de las neuronas y glías (Montagne et al. 2017; Rius-Pérez et al. 2018; Solis et al. 2020). Se ha estudiado ampliamente el efecto de la reducción del FSC en relación con la EA a nivel molecular y celular. En este sentido, parece que una reducción y/o una desregulación del FSC aparece en personas de edad avanzada con alto riesgo de EA antes, incluso, que el deterioro cognitivo, la atrofia cerebral y la acumulación de A $\beta$  (Zlokovic 2011).

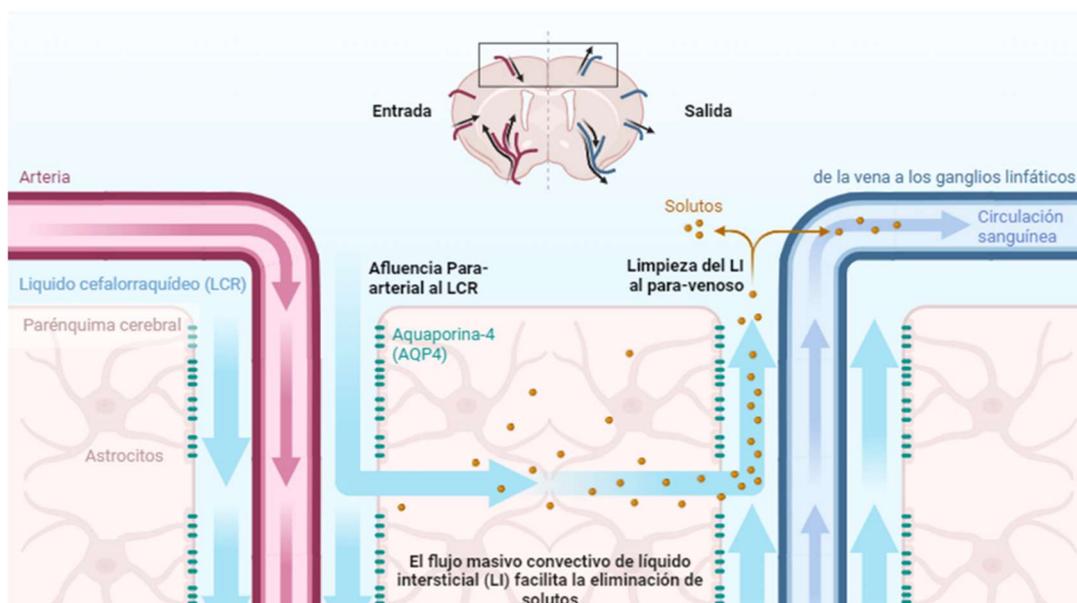
La permeabilidad de la BHE aumenta con la edad, lo que puede contribuir al aumento de los niveles de hierro en el cerebro envejecido. Se ha informado que el 10% de este ion ingresa al cerebro a través de la BHE desde la sangre y que sus niveles son diferentes en las diferentes regiones. El contenido de hierro es más abundante en el sistema extrapiramidal, especialmente en la región de los ganglios basales, mientras que las concentraciones más altas se encuentran en la sustancia negra (SN), el núcleo rojo y la circunvolución dentada cerebelosa. Por el contrario, la cantidad de hierro es relativamente baja en la corteza cerebral (Zhang et al. 2019). La acumulación de hierro en una región específica del cerebro, ya rica en este metal, puede alterar su metabolismo y desencadenar diversos trastornos relacionados con la neurodegeneración. El hierro se libera en el líquido intersticial (LI) cerebral a través de la BHE y es absorbido por las neuronas y diferentes tipos de células gliales, distribuyéndose de manera desigual dentro de estas células (Verheggen et al. 2020, 2021). Sin embargo, todavía no se comprenden completamente los mecanismos reguladores detallados de la interacción entre la absorción y liberación de éste en el cerebro desde la BHE *in vivo*.

Aunque es difícil determinar cuál es la causa y cuál es el efecto, parece claro que la enfermedad vascular tiene relación directa con la neurodegeneración y la progresión de la EA. El nexo entre ambas teorías, neuronal y vascular, podría radicar en que la isquemia-hipoxia influye en el procesamiento amiloidogénico de la PPA a través de mecanismos que aumentan la actividad de dos enzimas clave, la  $\beta$ -secretasa y la  $\gamma$ -secretasa, favoreciendo el depósito de A $\beta$ . Esto se agravaría con la ruptura de la BHE, ya que la eliminación de A $\beta$  a través de ésta se vería comprometida. Además, la hipoxia también promovería la fosforilación de Tau a través de la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) (Zlokovic 2011).

#### 1.4.4.- Teoría de la clarificación de productos tóxicos en la Enfermedad de Alzheimer

El cerebro, debido a que carece de circulación linfática, tiene que eliminar las proteínas extracelulares mediante un mecanismo alternativo. El LCR es la ruta principal para la salida de moléculas desde el

cerebro a la circulación desde el espacio subaracnoideo, pero, en los últimos años, se ha descubierto una **vía glial-linfática o glinfática** en el cerebro de los roedores, que también participaría en la eliminación de líquidos (Iliff & Nedergaard, 2008). Esta vía, que favorece el flujo del LCR hacia el cerebro a lo largo de los espacios perivasculares arteriales y desde allí hacia el intersticio cerebral, consta de tres elementos principales: i) una ruta de influjo para-arterial del LCR, ii) una ruta de eliminación o aclaramiento para-venosa de líquido intersticial, y iii) una vía transparenquimatosa que depende del transporte astrocítico de agua a través del canal de acuaporina-4, también denominado vía de flujo masivo convectivo (Martínez-Tapia et al. 2018). A través de estas rutas, los flujos son dirigidos hacia los espacios venosos perivascular y perineuronal y, en última instancia, los solutos del neuropilo son eliminados hacia los vasos de drenaje linfático cervical y meníngeo (Rasmussen, Mestre, and Nedergaard 2018) (Ilustración 11). El movimiento intersticial de solutos se produce mediante los efectos combinados de difusión y advección. Este último se refiere al movimiento en masa de fluido impulsado por cualquier combinación de gradientes de presión: hidrostática, por gravedad o de origen cardiovascular, osmótica, oncótica y de temperatura. La advección es más rápida a lo largo de ciertas vías anatómicas privilegiadas, incluidos los espacios perivasculares intraparenquimatosos y los tractos de sustancia blanca (Bohr et al. 2022).



*Ilustración 11.- Esquema hipotético de la limpieza de fluidos cerebrales y de solutos intersticiales por el sistema glinfático en roedores. Creación propia con Biorender.com.*

El transporte intraparenquimático es un proceso que requiere energía, para lo cual entran en juego múltiples mecanismos, entre los que se pueden resaltar dos principales. Por un lado, la constante

producción de LCR que crea presión para la salida. Por otro lado, y más recientemente descrito, el pulso generado por las células del músculo liso de la arteria pial y las arterias penetrantes, que se sumergen en el cerebro desde la superficie cortical, y que impulsan la entrada de LCR específicamente en el espacio perivascular arterial y no en el venoso (Martínez-Tapia et al. 2018).

La disfunción vascular relacionada con la edad se asocia también con un deterioro de las funciones de eliminación y barrera de la mencionada vía glinfática (Uchida, 2022). Los productos de desecho en el cerebro son eliminados por el sistema glinfático a través de los espacios perivasculares, la BHE y la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo (BSLCR). Se ha comprobado que, al igual que ocurre con la A $\beta$ , la eliminación de la proteína Tau depende del sistema glinfático. Además, se ha demostrado que el alelo E4 de la Apo E, interacciona con la acuaporina-4 en los pies astrocitarios contribuyendo, no solo a la absorción de A $\beta$ , sino también a la de partículas grasas, la principal función del sistema linfático sistémico (Iliff et al., 2012; Toriello et al., 2021).

En los roedores, la vía glinfática está principalmente activa durante el sueño, cuando la eliminación de metabolitos dañinos como el A $\beta$  aumenta dos veces en relación con el estado de vigilia (Rasmussen et al. 2018). La disfunción linfática se ha demostrado en modelos animales de EA, pero también en humanos donde una reducción del aclaramiento del LCR se asoció con un aumento de los niveles de A $\beta$  en la sustancia gris en el cerebro humano (Iliff et al. 2012; Uchida 2022).

En cuanto a la prevención de la demencia, la eliminación de desechos es crucial para mantener la homeostasis cerebral y suprimir la neuroinflamación. La protección de la integridad de la BHE y la promoción de la eliminación de desechos a través de la vía glinfática tienen el potencial de abrir una ventana de oportunidades terapéuticas para las demencias en un futuro cercano. Si se pudiera monitorear la eficacia en la depuración de desechos en el cerebro mediante biomarcadores, se podría mejorar el deterioro cognitivo y prevenir la aparición de la EA (Uchida, 2022).

### **1.5.- Importancia del ion hierro en la progresión de Enfermedad de Alzheimer**

El desequilibrio del hierro en el cerebro se asocia con un amplio espectro de trastornos neurológicos, incluidos los accidentes cerebrovasculares, los trastornos mentales y el cáncer, lo que refleja su participación integral en la fisiología humana (Lee and Kovacs 2024). Los exámenes *post-mortem* y las observaciones de resonancia magnética (RMN) de los pacientes han revelado una acumulación anormal de hierro en el cerebro en un grupo de ENs, destacando entre ellas la EA, pero también la EP, la atrofia multisistémica (AMS) y la parálisis supranuclear progresiva (PSP). La participación del hierro en la patogénesis de la enfermedad varía en gran medida según las regiones anatómicas

asociadas y la gravedad de su deposición. Un mecanismo homeostático bien regulado proporciona la concentración óptima de hierro para que las células lleven a cabo algunas funciones esenciales, incluyendo el mantenimiento del estado de equilibrio de las concentraciones de hierro dentro de las células y su amortiguación para detener la acumulación tóxica dentro de los compartimentos celulares. Cuando el nivel de hierro aumenta por encima de su capacidad de secuestro, la concentración de hierro puede aumentar, lo que puede causar varios daños en los orgánulos y la muerte celular en el cerebro (Chang 2019).

### 1.5.1- El hierro como molécula imprescindible en el sistema nervioso

En el cerebro, el hierro es el metal de transición más abundante y está involucrado en el desarrollo embriológico cerebral, en la comunicación neuronal y en la mielinización, así como en la actividad de numerosas enzimas intracelulares hierro-dependientes. Actúa como cofactor de las enzimas implicadas en la síntesis y el metabolismo de los neurotransmisores y es un componente de los citocromos esenciales para la producción de energía. Los metales de transición, como el hierro, zinc, cobre y aluminio, podrían estar implicados en el desarrollo de la EA a través de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), y todos ellos se han encontrado localizados en las PS y los ONF (Derry et al. 2020). Además, la desregulación en los metales de transición, el estrés oxidativo y la cascada amiloide podrían estar interrelacionadas en la etiología de EA.

El hierro, como hemos dicho, es un metal de transición con tres especies,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  y  $Fe^{4+}$ . Las reacciones químicas en las que está involucrado dependen de las propiedades químicas de éste, ya que es capaz de cambiar de valencia para catalizar reacciones de oxidación-reducción (capacidad redox). Por el contrario, esta propiedad causa una generación paradójica de alta reactividad que da como resultado radicales tóxicos hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) a través de la Reacción de Haber-Weiss o de la Reacción de Fenton (Hare et al. 2013; Meguro et al. 2007).

- $Fe^{3+} + \bullet O_2^- \rightarrow Fe^{2+} + O_2$  Primer paso de la reacción de Haber-Weiss. Debido a la reactividad del superóxido, el catión férrico queda reducido y se produce una molécula de  $O_2$ .
- $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \bullet OH$  Proceso de oxidación avanzada en el cual se producen radicales  $OH^{\cdot}$ .

Debido a la alta reactividad de los radicales  $OH^{\cdot}$ , el hierro desencadena reacciones de estrés oxidativo modificando las macromoléculas cercanas al sitio de su formación, como los lípidos celulares, las proteínas, y la estructura y función del ADN (Meguro et al. 2007).

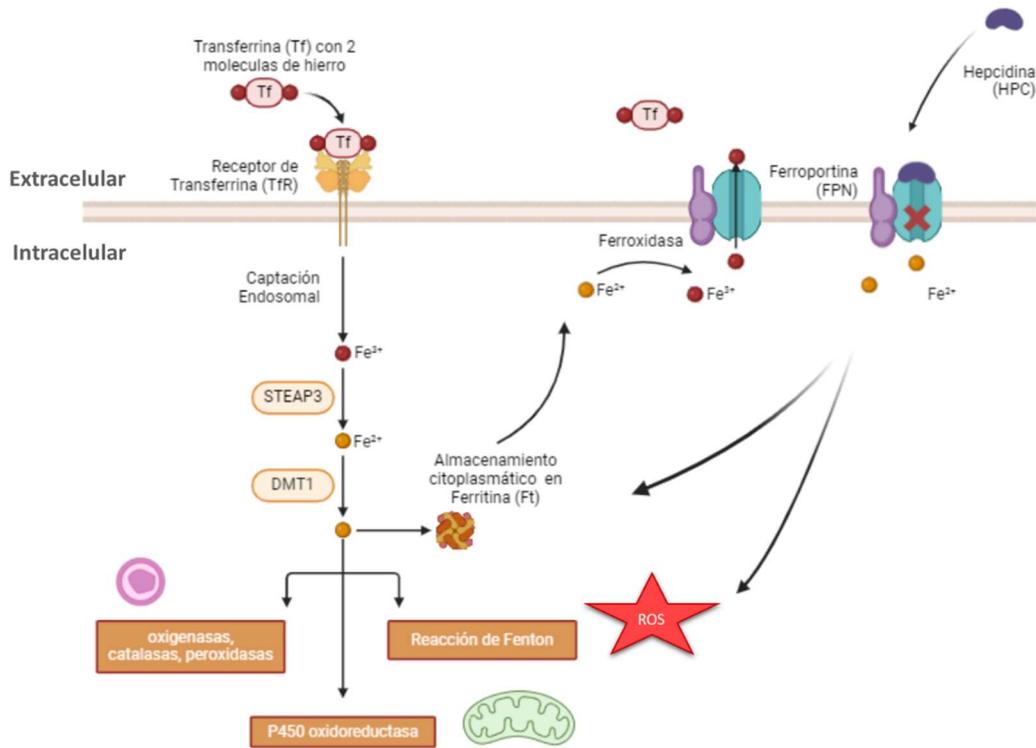
El hierro extracelular se encuentra principalmente unido a proteínas y solo menos del 1 % es accesible para usos fisiológicos (metabolismo), toxicológicos (redox) o farmacológicos (quelación). El hierro se encuentra en los tejidos y el plasma, donde en condiciones fisiológicas se une a la proteína transferrina para su transporte (Tf). La forma no ligada a proteína más dañina de hierro es el hierro plasmático lábil (PLH), que tiene actividad redox, puede penetrar en los órganos e inducir una sobrecarga de hierro (Gucký and Hamuľáková 2024; Meguro et al. 2007).

Dentro de las células, el hierro es almacenado junto con la ferritina (Ft) y la hemosiderina (Hs). Sin embargo, también existe una forma lábil del hierro (FLH) que se caracteriza por ser un conjunto celular quelable, que incluye varias formas iónicas de hierro asociadas a ligandos. Estos ligandos pueden incluir polipéptidos, aniones orgánicos y componentes de la superficie de la membrana (Gucký and Hamuľáková 2024).

En resumen, la FLH existe tanto en forma celular como extracelular y generalmente incluye formas de hierro que pueden participar en los ciclos redox, por lo que pueden tener un papel en la generación de estrés oxidativo. Se ha demostrado un impacto significativo del aumento de las cantidades de FLH en la producción de ROS, la peroxidación lipídica y la muerte celular (Liu et al., 2018).

### 1.5.2.-Metabolismo y transporte del hierro en el sistema nervioso central

El mayor transportador de hierro en la sangre del organismo es la Tf. La Tf es una glicoproteína que posee dos grupos de unión de alta afinidad con el  $\text{Fe}^{3+}$ . Sin embargo, la BHE impide el libre paso de la Tf unida a hierro al SNC. Así pues, la entrada del hierro al SNC se produce a través de endocitosis mediada por un receptor de transferrina (TfR1), expresado en la membrana luminal de la célula endotelial. El Fe-Tf forma un complejo con el TfR1 cuando es endocitado. Al entrar en el sistema endocítico a través de vías dependientes de clatrina hacia el endosoma temprano, el bajo pH induce la disociación del hierro de Tf en forma de  $\text{Fe}^{3+}$ . La ferrireductasa Steap3 reduce el  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , que es transportado al citoplasma desde el endosoma por el transportador de metales divalentes-1 (DMT1). El complejo Tf/TfR1 regresa a la membrana plasmática, donde el pH neutro induce su disociación (Hare et al. 2013). Sin embargo, parece que, aunque mayoritaria, esta vía no constituiría el único mecanismo de entrada, sino que habría otras alternativas (Ilustración 12).



**Ilustración 12.-** Esquema de las vías principales de entrada y salida del hierro en las células. El receptor de Tf se une al tadem Tf y hierro férrico y entra en el sistema endosomal. Sale de éste cuando baja el pH, en forma de hierro ferroso. Este hierro es utilizado en varios procesos fisiológicos, pero puede ser almacenado gracias a la ferritina. Cuando la cantidad es elevada puede salir de la célula mediante su transformación en hierro férrico por una ferroxidasa y salida por la ferroportina. La salida de hierro a través de la ferroportina puede ser bloqueada por la hepcidina. Creación propia en Bioreder.com.

Un segundo mecanismo implica la transcitosis del complejo Tf/TfR1 a través de la célula endotelial y la liberación de Tf hacia el parénquima en la membrana abluminal. Un tercer mecanismo depende de Ft, que está presente en el suero sanguíneo y en el LCR. La Ft sérica se compone principalmente de subunidades L con una o dos subunidades H. Estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado el transporte de Ft a través de la BHE, utilizando diferentes receptores; el receptor Scara5 reconoce a L-Ft, mientras que H-Ft se une a TfR1 (Hare et al. 2013; Wang et al. 2019).

En la cara abluminal del endotelio de la BHE, como hemos mencionado, se encuentran la membrana basal, los astrocitos y los pericitos (Ilustración 10). El hierro liberado por las células endoteliales es absorbido, probablemente, por los astrocitos cercanos a través de DMT1 y distribuido al parénquima cerebral a través de la ferroportina (FPN). La FPN se expresa en la BHE, los endotelios y el plexo coroideo, y especialmente en la superficie abluminal del endotelio. Este exportador de hierro es el responsable del flujo de hierro desde el epitelio intestinal hacia la sangre en presencia de la ferroxidasa, hepcidina (HP) y la ceruloplasmina (CP). La CP también se expresa principalmente en los pies finales de los astrocitos que rodean los capilares del cerebro (Chang 2019; Wang et al. 2019). El

hierro puede ser transportado hasta el intersticio (que se dispone entre el endotelio y los astrocitos o pericitos) desde los endosomas y los complejos Tf-RTf-Fe del endotelio, donde sería recaptado por Tf u otros ligandos de este espacio intersticial (Hare et al., 2013).

El DMT1 descrito anteriormente como el principal transportador intracelular de hierro, contribuye también a la captación de hierro no hemo en la mayoría de los tipos de células sistémicas. Cada isoforma DMT exhibe diferentes patrones de expresión dependiente del tipo celular y una distribución subcelular distinta, lo que permite a las células absorber eficientemente hierros unidos y no unidos a Tf (Hare et al., 2013; McAllum et al., 2020; Yanatori & Kishi, 2019).

Se sabe que las neuronas expresan TfR1 y DMT1, por lo que el hierro se internalizaría por ambos mecanismos; un mecanismo de endocitosis mediada por receptor TfR1 y otra pequeña cantidad de hierro no unido a Tf (NTBI). Los astrocitos y oligodendrocitos carecen de TfR1, por lo que la entrada de hierro parece ser por NTBI (Hare et al., 2013).

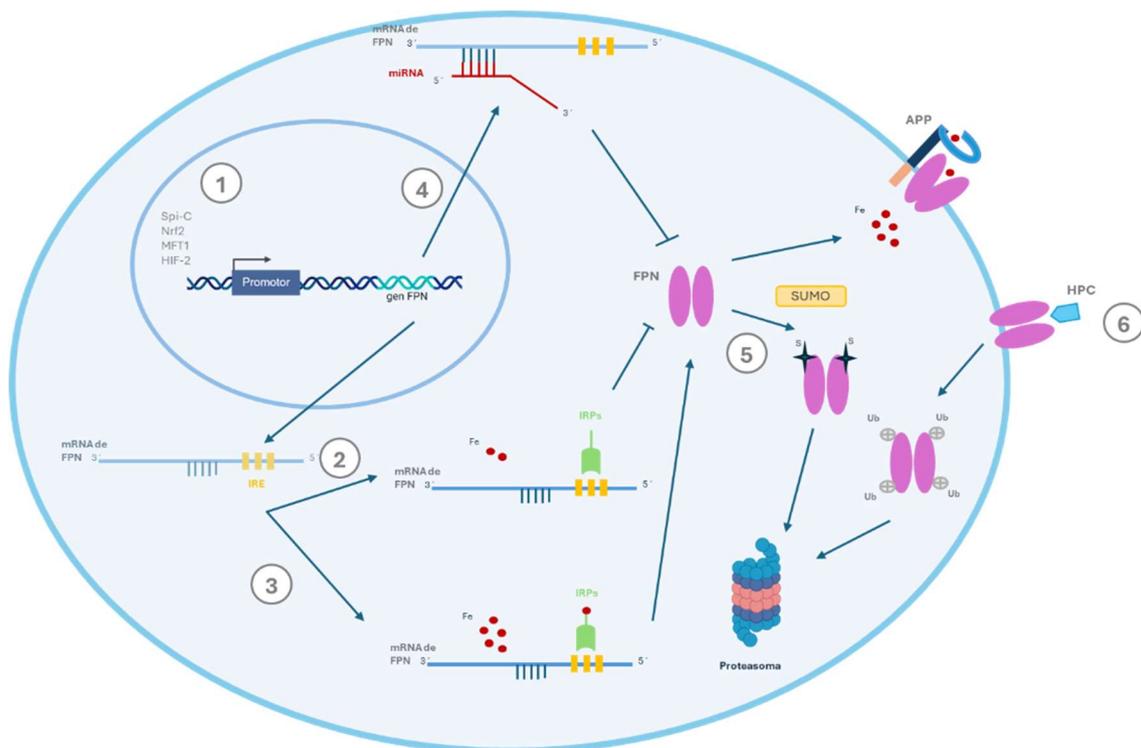
En el cerebro normal, el hierro puede reciclarse continuamente entre los astrocitos y las neuronas, con la Tf actuando como lanzadera. La CP unida a glicosilfosfatidilinositol (GPI) en los astrocitos funciona como una ferroxidasa, mediando la oxidación del hierro  $Fe^{2+}$  a hierro  $Fe^{3+}$  que es transportado desde el citosol hacia afuera por la FPN y para su posterior transferencia a Tf (Ilustración 12). Los astrocitos sin CP unida a GPI no pueden transportar hierro a Tf, por lo que las neuronas han de hacerse con hierro mediante mecanismos alternativos, como los NTBI (Miyajima 2015). Después de que el hierro se utilice para el metabolismo neuronal y glial y se almacene en ferritina (Ft), el exceso de hierro se libera a través de la FPN. El exceso de hierro puede exportarse de regreso al LI o liberarse al LCR en los ventrículos cerebrales (Chang 2019).

Una vez que el hierro se libera en el LI del cerebro, se distribuye y transporta entre diferentes tipos de células en diferentes regiones del cerebro. Una vez dentro de las células, el hierro sigue varias vías (Ilustración 12). Como hemos visto, en el citoplasma se incorpora en FLH que es un depósito de hierro metabólicamente disponible (LeVine 2024). El hierro FLH puede: (i) entregarse a las mitocondrias y utilizarse para la síntesis de hierro-azufre (Fe-S) y hemo, lo que apoya de manera crítica la respiración oxidativa celular, (ii) almacenarse dentro de una especie de nanojaulas de Ft, de las que el hierro puede liberarse por un proceso llamado ferritinofagia, y (iii) regresar al líquido extracelular a través del exportador de hierro FPN, un proceso que se combina con la oxidación del hierro por ferroxidasas para reponer la reserva de hierro unido a Tf y puede ser bloqueado por la hormona hepcidina (HPC)(LeVine 2024). El aumento de los niveles de la FLH en la célula, al ser activa, puede conducir a

la generación de ROS, peroxidación lipídica y, en última instancia muerte por ferroptosis (Jakaria et al. 2021).

### 1.5.3- Regulación del hierro

La homeostasis del hierro en el cuerpo se regula en dos niveles diferentes, a nivel sistémico y a nivel celular. Por un lado, el equilibrio del nivel de hierro en el organismo se logra principalmente a través de la absorción controlada del mismo proveniente de la dieta por parte de los enterocitos intestinales. Por otro lado, y a nivel celular, la regulación del hierro varía según el tipo de célula, debido a la expresión de ciertas proteínas reguladoras y transportadoras de hierro (Ilustración 13). En términos generales, las proteínas asociadas al metabolismo del hierro son reguladas por el estatus del hierro. En caso de bajas cantidades del ion, existen dos proteínas reguladoras (IRP, del inglés *iron regulatory protein*) que se unen con un elemento de respuesta al hierro (IRE, del inglés *iron responsive element*). Las IRPs, que incluyen a IRP1 e IRP2, regulan los niveles de los transportadores de hierro, como TfR1, DMT1 y FPN1, así como de la Ft (Meyron-Holtz et al. 2004; Mleczko-Sanecka and Silvestri 2021).



**Ilustración 13.-** Regulación multinivel de la expresión de ferroportina (FPN). (1) Control transcripcional: los factores de transcripción *Spi-c*, *Nrf2*, *MTF1* y *HIF-2 $\alpha$*  activan la transcripción de *FPN*, mientras que factores aún desconocidos que responden a señales inflamatorias inhiben su transcripción. (2 y 3) Control postranscripcional: en condiciones de deficiencia de hierro, las proteínas reguladoras de hierro activas (IRP) se unen al elemento de respuesta al hierro (IRE) en el extremo 5' del ARNm de la *FPN*, bloqueando así su

*traducción. Cuando el hierro citoplasmático disponible es alto, los IRP unidos a hierro, potencian la traducción de la FPN. (4) El extremo 3' del ARNm de FPN es el objetivo de miARNs que impiden la expresión de FPN. (5) Nivel postraduccional, en el citoplasma, la FPN puede dirigirse al autofagosoma o, tras la sumoilación, al proteosoma. (6) En la superficie celular, donde la FPN libera hierro al espacio extracelular o al torrente sanguíneo, la HPC bloquea el transporte de hierro a través del poro y da como resultado la internalización, ubiquitinación y degradación proteasomal de la FPN. Modificado de Gammella et al. 2021.*

En general, cuando la concentración celular de hierro es baja, el centro activo de los IRP se une a la estructura de tallo-bucle del IRE ubicado en la región no traducida 3' de los ARNm de TfR1 y DMT1. Esta unión estabiliza los ARNm de TfR1 y DMT1 y aumenta su expresión celular, aumentando así la captación de hierro. Cuando la concentración de hierro es alta, el centro activo de los IRP está ocupado por cuatro Fe-S, lo que bloquea la unión de los IRP al IRE de TfR1 o DMT1, dando como resultado niveles bajos de traducción de TfR1 y DMT1 y, por lo tanto, reduciendo la captación de hierro (Gammella et al. 2021).

La regulación de la expresión de otro de los transportadores de hierro, la FPN, es complicada y está sujeta a un multicontrol transcripcional, postranscripcional y traduccional (Ilustración 13). Por un lado, los factores de transcripción Spic, Nrf2, MTF1 y HIF-2 $\alpha$  activan la transcripción de FPN, mientras que factores aún desconocidos que responden a señales inflamatorias la inhiben. De forma postranscripcional se ha descrito que el extremo 3' del ARNm de FPN es el objetivo de miARNs que previenen la expresión de FPN. Por otro lado, las IRP regulan la expresión de FPN a nivel postranscripcional a través del sistema IRP/IRE. En condiciones de deficiencia de hierro celular, las IRP activas se unen al IRE en el extremo 5' del ARNm de la FPN, bloqueando así su traducción. Cuando el hierro citoplasmático disponible es alto, los IRP unidos a hierro, potenciarían la traducción de la FPN (Gammella et al. 2021). Por último, a nivel postraduccional, la proteína FPN también está regulada por la HPC, ya que ésta puede reconocer y unirse a FPN en la membrana, lo que induce su internalización y degradación (Ginzburg 2019). El sistema IRP/IRE también regula la estabilidad de la Ft. La unión de los IRP al IRE del ARNm de Ft ubicado en su 5'-UTR suprime su traducción y provoca una menor expresión de la proteína. La pérdida funcional de los IRP induciría la deposición de hierro. Los modelos genéticos de ratones deficientes en hierro (IRP2 -/-) presentan actividad mitocondrial reducida, hipomielinización y neurodegeneración (Meyron-Holtz et al. 2004).

#### 1.5.4.-Distribución del hierro en el cerebro

La deficiencia de hierro periférico es una de las mayores alteraciones nutricionales del mundo desarrollado y produce, directa o indirectamente, varias patologías. Sin embargo, el hierro cerebral

es más resistente a los cambios dietéticos. El hierro no está presente al nacer y existen periodos críticos en su acumulo en el cerebro, entre los que destaca la época antes del destete. Se cree que el cerebro está en constante intercambio de hierro con la periferia, pero que posee un mecanismo homeostático que mantiene los niveles del hierro más o menos constantes dentro de un rango (Singh et al. 2014).

Diferentes análisis cuantitativos del hierro en varias regiones cerebrales han descrito una distribución heterogénea y compartimentada que depende de la ubicación anatómica (Ramos et al. 2014). En adultos sanos, la concentración máxima de hierro se encuentra en el sistema extrapiramidal, especialmente en el globo pálido (GP) a nivel de los ganglios basales, y también en la *pars reticulata* de la sustancia negra (prSN), el núcleo rojo y la circunvolución dentada cerebelosa, mientras que es relativamente baja en la corteza cerebral. Los niveles de hierro más bajos se encuentran en la sustancia blanca y el bulbo raquídeo (Aquino et al. 2009; Chang 2019; Ramos et al. 2014).

El depósito progresivo de hierro en diferentes estructuras del cerebro acompaña a los procesos normales de envejecimiento (Hare et al. 2013; McAllum et al. 2020), pero alcanza un alto grado en el cerebro de pacientes con ENs, como la EP o la EA (Chang 2019). En general, existe una tendencia al aumento significativo de los niveles de hierro en el cerebro en relación con la edad. En este sentido, los ganglios basales presentan una correlación directa, mientras que en otras regiones como el hipocampo este hecho no está claro (Ramos et al. 2014).

#### 1.5.5.-Regulación del hierro en la Enfermedad de Alzheimer

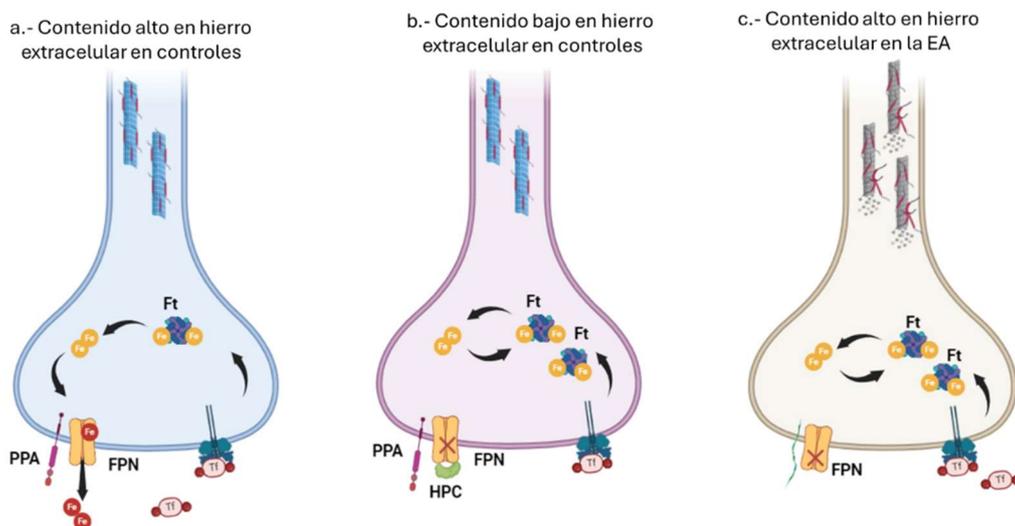
En la EA, la retención de iones de hierro se incrementa de tal forma que los niveles de este ion pueden servir como predictores de los déficits cognitivos y deficiencias motoras que acompañan a la patología (Ayton et al. 2020). El examen *post-mortem* de cerebros con EA ha revelado que la acumulación de hierro ocurre en las áreas que están más afectadas por los marcadores histopatológicos propios de la enfermedad, proponiéndose que éste estaría implicado en la agregación de las proteínas Tau y A $\beta$ , contribuyendo a la disfunción y muerte neuronal (Lei et al. 2021). Sin embargo, otros autores no han visto tal asociación (Van Duijn et al. 2017). Todavía se está lejos de conocer cuál es la relación entre la acumulación de hierro, la neurodegeneración y otros cambios patológicos (p. ej., agregados de A $\beta$  y Tau).

Además de la inflamación, existen otros mecanismos en la EA que pueden contribuir a una mayor acumulación de hierro, por ejemplo, la pérdida de interconexiones neuronales. En la esclerosis múltiple, la desmielinización puede explicar los niveles elevados de hierro en las estructuras de la

sustancia gris profunda al aumentar la demanda de energía debido a un mayor gasto necesario para bombear iones a través del axolema de los axones desmielinizados, lo que se ha denominado hipoxia virtual. Esto sugiere que algunos mecanismos de acumulación de hierro en la esclerosis múltiple podrían coincidir con los de la EA (LeVine 2024).

En este contexto, nace en los últimos años la “hipótesis de la ferroptosis” de la EA, que podría ser independiente de la “hipótesis A $\beta$ ” y de la “hipótesis de la proteína Tau”. Las características morfológicas típicas de la ferroptosis se han identificado en neuronas, junto con ciertos biomarcadores clásicos de este tipo de muerte anteriormente descubiertos en otros órganos y que apoyan que la muerte neuronal en esta patología está ligada a la deshomeostasis del hierro en la EA. Este descubrimiento se erige como un objetivo terapéutico prometedor para el tratamiento de ENS (Wang et al. 2022).

Estudios recientes de transcriptómica y proteómica confirman que las vías regulatorias relacionadas con el hierro están alteradas en el tejido cerebral afectado por EA (Lei et al., 2021). Cuando se sobrepasan los niveles de acumulación de hierro intracitoplasmático, éste puede salir de la célula a través de la FPN aligerando la carga de hierro en neuronas, microglía y astrocitos, lo que previene el daño de ROS catalizados por el hierro que podría llevar a la muerte celular (Ilustración 14).



**Ilustración 14.-** Esquema de la hipotética regulación de la salida de hierro neuronal en función de las concentraciones de este ion en el medio extracelular. (a) Concentración alta de hierro extracelular en controles sanos. La proteína amiloide (PPA) actuaría como ferroxidasa estabilizando la acción transportadora de la ferroporina (FPN). (b) Concentración baja de hierro en el medio extracelular en controles sanos. La hepcidina (HPC) bloquea la salida de hierro de la célula a través de su unión a FPN. (c) Concentración alta de hierro en el medio extracelular de pacientes con EA. La PPA no estaría presente, o estaría modificada, con lo que se vería afectado el transporte de hierro a través de la FPN en membrana, esto llevaría a un aumento del hierro almacenado dentro de la neurona. Creación propia con Biorender.com.

En el sistema nervioso, la FPN transportaría  $\text{Fe}^{2+}$  desde el citosol hacia fuera de la célula, en un proceso en el que una ferroxidasa, bien la PPA o la CP, mediaría la conversión del hierro  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$ . Según algunos autores, la expresión de FPN en el cerebro de la EA parece reducirse por razones inciertas lo que redundaría en un aumento dañino de hierro en las células (Raha et al. 2013). Teniendo en cuenta que la PPA parece estabilizar la expresión de FPN en la superficie celular, y ya que se han observado variantes sustanciales de PPA en pacientes con EA, no es descabellado pensar que la disminución de la expresión o de la función de FPN podría estar asociada con mutaciones de PPA (Duce et al. 2010). Las pruebas genéticas apoyan que la PPA es una metaloproteína con un papel integrador y facilitador en el metabolismo de los metales (Rogers et al. 2016). El daño en la PPA por la vía amiloidogénica característico de la EA, implicaría la desestabilización de FPN en la membrana. Se ha descrito, incluso, una posible función ferroxidasa de la PPA (Bandyopadhyay and Rogers 2014) (Ilustración 14). En esta línea, la hipótesis de Duce y colaboradores sostiene que el incremento del hierro en la patología exige una mayor producción de PPA para estabilizar la función de la FPN en membrana, pero su función estabilizadora se inhibe por el  $\text{Zn}^{2+}$  extracelular elevado, por lo que se disociaría en  $\text{A}\beta$ , entrando en juego la acumulación de este nuevo ion en la etiología de esta patología (Duce et al. 2010).

Como se ha comentado, parte importante de la regulación de la expresión de FPN a nivel sistémico ocurre a través de la hormona reguladora del hierro, la HPC. Esta hormona peptídica, secretada principalmente al torrente sanguíneo por los hepatocitos, es el principal regulador de la homeostasis sistémica del hierro a través de su interacción con FPN, debido a que provoca su internalización y bloquea su salida en respuesta a un aumento de los niveles de este ion (Raha-Chowdhury et al. 2015). La HPC controla la absorción del hierro de la dieta, su reciclaje por los macrófagos y la liberación de este de los depósitos hepáticos a través de la regulación de los niveles de transportadores de hierro, lo que genera una disminución de los niveles plasmáticos de este ion. Al unirse a la HPC, la FPN se internaliza y posteriormente se somete a degradación lisosomal (Nemeth et al. 2004; Nemeth and Ganz 2021), lo que resulta en una reducción de la concentración plasmática de hierro y un aumento de la Ft intracelular. La expresión de HPC está regulada a nivel sistémico por los niveles de hierro plasmático, la inflamación y la eritropoyesis. Por el contrario, la expresión de HPC disminuye en respuesta a la hipoxia y la anemia (Hadziahmetovic et al. 2011).

Aunque no son muchos los estudios a este respecto, la presencia de la HPC a nivel del SNC y su implicación en la homeostasis del hierro ha sido descrita de hace pocos años (Urrutia et al. 2017;

Zechel and Huber-Wittmer 2006). Así, se ha detectado ARNm de HPC en varias regiones cerebrales, entre ellas la corteza, el hipocampo, la amígdala, el tálamo, el hipotálamo, el bulbo olfatorio, el mesencéfalo, el cerebelo, la protuberancia y la médula espinal (Nemeth and Ganz 2023) A pesar de que se están llevando a cabo varios ensayos tanto en animales de experimentación, cultivos, como en humanos su papel en relación con el depósito de hierro todavía no está claro (Du et al. 2015; Urrutia et al. 2013). Por otro lado, también se ha definido su regulación al alza en la EA pero no se sabe su relación exacta con la progresión de la patología (Chaudhary et al. 2021).

El incremento de la entrada de hierro a través de la BHE, junto con la reducción de la exocitosis debido a la internalización endosómica de FPN y HPC, incrementaría la carga de hierro en las células nerviosas (Ilustración 14) (Bandyopadhyay and Rogers 2014). Existen por tanto un número suficiente de evidencias para pensar en un papel plausible de la HPC en los mecanismos patogénicos de la EA. La literatura existente se ha centrado principalmente en el estudio de FPN y HPC en células y modelos animales, por lo que sería realmente interesante el estudio de su papel en la EA en humanos. Como ocurre a nivel sistémico, la inflamación podría influir en la expresión de HPC a nivel del SN.

#### 1.5.6.- Técnicas para cuantificar el hierro en el sistema nervioso central

En las últimas décadas, se han utilizado muchas técnicas para evaluar las cantidades de hierro en el cerebro en la EA, cada una de ellas con sus particularidades (LeVine 2024). Las pruebas *post-mortem* tienen la ventaja de permitir mediciones directas del hierro en el cerebro, lo que actualmente no es posible en personas vivas. Las mejoras en las mediciones de imágenes por RMN, por su parte, permiten estimaciones cada vez más precisas de la carga de hierro en el cerebro (De Barros et al. 2019; van Oostveen et al. 2021). Los estudios cuantitativos *post-mortem* con tinción histológica (tinción de Perl y Turnbull) son imprecisos, pero ofrecen mapeo y la posibilidad de evaluar visualmente secciones teñidas con resolución celular. Además, las diferentes tinciones para el hierro permiten a los investigadores marcar selectivamente hierro no hemo:  $Fe^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$  o ambos (Meguro et al. 2003, 2007). Por el contrario, la mayoría de las técnicas físicas cuantifican las diferentes formas de hierro sin distinción.

Recientemente, sin embargo, un gran número de estudios intentan, sin haberlo conseguido aún, medidas del hierro cada vez mejores en vivo, con lo que la RMN cuantitativa podría constituirse en una técnica sensible para detectar cambios cerebrales tempranos *in vivo* en la sobreacumulación de hierro en regiones subcorticales del cerebro en personas con EA sintomática y asintomática (Bulk et al. 2020; Lin et al. 2023; van Oostveen et al. 2021; Spotorno et al. 2020). Además, también se ha

demostrado que la aplicación del mapeo cuantitativo de susceptibilidad (QSM) para la detección de hierro *in vivo* tiene algún valor clínico (Uchida, Kan, Sakurai, Oishi, et al. 2022). Aunque la susceptibilidad medida por QSM no es específica, se considera una medida general del hierro cortical en el estudio de las ENs (Gong et al., 2019; Nikparast et al., 2022; Uchida et al., 2022). Esta técnica tiene la ventaja de que podría proporcionar información que demuestre una relación entre el hierro y la agregación de proteínas características de la EA (Tau y A $\beta$ ). De hecho, se ha observado una asociación entre el depósito de hierro en la corteza cerebral y la Tau-PET (tomografía de emisión de positrones) que ayuda a avanzar en la comprensión del papel de la desregulación del hierro en la neurodegeneración de la EA (Spotorno et al. 2020). Otros autores encontraron una relación entre la acumulación de hierro relacionada con la edad y las imágenes de PET con Tau, pero los datos de la corteza cerebral fueron inconsistentes (Cogswell et al. 2021; Cogswell and Fan 2023). Los datos sobre la relación QSM entre hierro y amiloide en áreas corticales muestran más variabilidad en la literatura previa. Algunos estudios observaron correlaciones positivas entre la susceptibilidad y la PET con amiloide en la corteza frontotemporal (Ayton et al. 2017; Spotorno et al. 2020), mientras que otros no encontraron relaciones significativas (Cogswell et al. 2021; Cogswell and Fan 2023). Aunque se ha demostrado que el hierro se encuentra cerca de las PS en la EA, facilitando potencialmente la deposición de amiloide, la correlación entre ambos, hierro y amiloide, no es concluyente. Esto podría deberse a que los niveles de hierro en la corteza permanecen dentro de los límites de detección del QSM. Un análisis crítico de la técnica QSM sospecha que las propias fibrillas de amiloide pueden reducir el contraste, especialmente en el cerebro humano, generando efectos que contrarrestan la generación de mapas QSM (Uchida, Kan, Sakurai, Oishi, et al. 2022).

Es necesario continuar en la búsqueda de técnicas físicas, químicas o ambas, que permitan la cuantificación exacta y la localización del hierro, pero también la colocalización con otras proteínas relacionadas con la patología, como son las proteínas por deposición y aquellas implicadas en el transporte y acumulación de este ion.

## 2.-HIPÓTESIS DE PARTIDA Y OBJETIVOS

En base a lo anteriormente expuesto, queda claro que la EA es una neuropatología multifactorial caracterizada anatomopatológicamente por la presencia de depósitos de amiloide y ONF. Se ha sugerido que el desbalance de los iones metálicos en el cerebro puede amplificar e incluso generar el plegamiento de las proteínas fibrilares A $\beta$  y Tau, la principal causa del comienzo de la enfermedad. Entre los iones que se encuentran en el encéfalo, el hierro se acumula progresivamente con la edad y se ha descrito que aumenta considerablemente en la EA. En la actualidad, la cantidad de hierro se presenta como un biomarcador posible de la patología y se están buscando técnicas que lo cuantifiquen fielmente en el cerebro *post-mortem* pero, principalmente, *in vivo*. Por tanto, uno de los puntos críticos en este tema es la identificación de una técnica fiable para cuantificar el acumulo de hierro en la EA, ya que ninguna es completa y la mayor parte no son exactas. En base a ello, un primer objetivo general de esta Tesis ha sido la búsqueda de un método de cuantificación de la cantidad de hierro cerebral *post-mortem* en dos zonas preseleccionadas del encéfalo: el hipocampo, una de las primeras áreas donde comienzan los cambios anatomopatológicos de la EA y los ganglios basales, donde han sido descritos los mayores acúmulos de hierro a nivel cerebral.

Por otra parte, y teniendo en cuenta la hipótesis de que la regulación de los niveles de hierro intracelular son críticos en la neurodegeneración que acompaña a la EA, otro objetivo de este trabajo de investigación ha sido ahondar en la relación del hierro con la patología y el papel de las proteínas implicadas en su transporte, FPN y HPC, con el fin de averiguar su relación con la progresión de la EA. El tema es novedoso, existen pocos estudios sobre este tándem de regulación de la salida de hierro de las células nerviosas y gran parte de ellos son en modelos experimentales de EA. Por ello la hipótesis de partida fue que estas proteínas tienen un papel importante en la acumulación de hierro en la EA y que el desarrollo o progresión de la enfermedad está relacionado con ambas moléculas.

Para llevar a cabo estos objetivos generales nos hemos fijado los siguientes objetivos específicos:

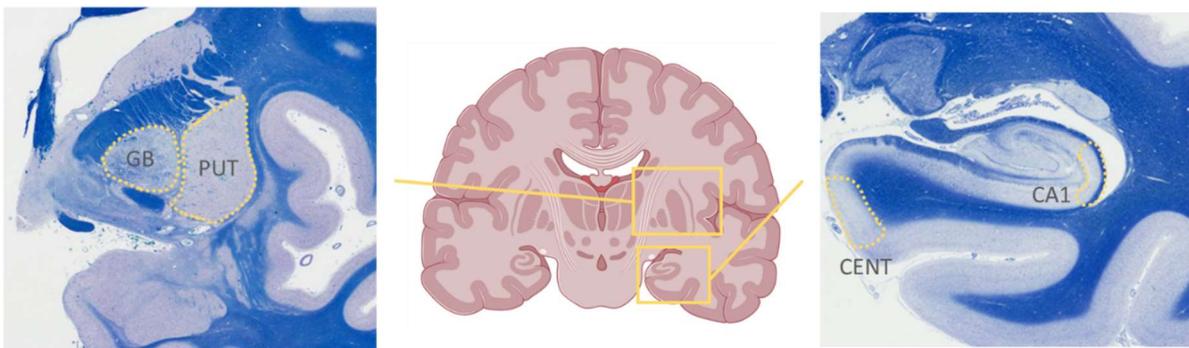
1. Localizar histológicamente y cuantificar el hierro en dos áreas cerebrales diferentes de muestras de pacientes de EA según avanza la patología mediante técnicas histoquímicas y analíticas desarrolladas a tal fin.
2. Localizar y cuantificar dos proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro, tanto en controles como pacientes de EA, como son la FPN y HPC en las áreas anteriormente mencionadas.
  - a. Localización citoarquitectónica de ambas proteínas.

- b. Analizar la relación entre ambas proteínas.
- 3. Analizar en las áreas escogidas, la relación entre la cantidad de hierro cerebral, las proteínas relacionadas con el transporte de éste y los estadios de EA y la edad de los sujetos.
  - a. Localizar y cuantificar los marcadores anatomopatológicos clásicos, A $\beta$  y Tau, en controles y pacientes de EA.
  - b. Analizar la relación entre la cantidad de hierro, proteínas transportadoras, marcadores anatomopatológicos y su relación con los estadios de la enfermedad.

### 3.-MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1.-Obtención de muestras

Las secciones de tejido cerebral humano utilizadas en este trabajo proceden del Banco de Tejidos Neurológicos del Principado de Asturias, el cual nos proporcionó muestras de pacientes con EA y de individuos sanos de diversas edades. Se eligieron dos zonas para los diferentes estudios, la corteza parietal y los ganglios basales. En la corteza se seleccionó el hipocampo (área CA1) y la corteza entorrinal (CENT) como áreas de interés, ya que son las primeras zonas en mostrar cambios degenerativos en la EA, en base a las recomendaciones de Braak (Braak & Braak, 1991) y los criterios diagnósticos CERAD (Mirra et al., 1991). Por otra parte, se eligieron los núcleos putamen (PUT) y globo pálido (GP) de los ganglios basales, por ser zonas muestreadas habitualmente en los biobancos y mostrar mayor cantidad basal de hierro que otros territorios cerebrales (las zonas de interés pueden verse en la Ilustración 15).



*Ilustración 15.- Las muestras utilizadas para el estudio aparecen recuadradas en amarillo. CA1: Cornu Ammonis 1; CENT: corteza entorrinal; GB: globo pálido; PUT: putamen. Imágenes tomada del Atlas Humano de Allen Institute for Brain Science (Allen 2019).*

El presente estudio se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el "Comité Ético de Investigación Clínica Regional del Principado de Asturias" (CEICr). Estos estudios recibieron el consentimiento sobre las siguientes bases: (i) las muestras se recogieron retrospectivamente de los archivos de patología de las necropsias realizadas con fines de diagnóstico y que habían firmado un consentimiento, (ii) las identidades de los pacientes se anonimizaron completamente y se diferenciaron de los identificadores únicos, y (iii) no hubo ningún tipo de riesgo para los participantes.

La Tabla II contiene los detalles de los diferentes donantes. A los pacientes se les diagnosticó clínicamente EA, la cual fue confirmada *post-mortem*. Los diferentes casos se clasificaron en función

de su estadio neuropatológico de EA, según los criterios de Braak (Braak & Braak, 1991). El tejido se obtuvo de las necropsias realizadas entre 6 y 12 h después de la muerte. Cuando hubo sospecha de infartos cerebrales, tanto macroscópicos como microscópicos, se diseccionaron las áreas para su confirmación histológica mediante la reacción de Perls y luego esos casos se rechazaron.

Tabla II.- Datos relevantes de los casos utilizados en el estudio.

Número	Código	Sexo	Edad	Diagnóstico
1	17-015-1	M	77	Enfermedad de Alzheimer. Estadio V-VI de Braak y angiopatía amiloide asociada.
2	17-015-2(#7)	M	91	Enfermedad de Alzheimer. Estadio V-VI de Braak.
3	17-015-3	H	61	Enfermedad de Alzheimer variante asociada a gen de la Presenilina 1.
4	17-015-4 (#5)	M	84	Enfermedad de Alzheimer. Estadio I-II de Braak.
5	17-015-5	H	68	Enfermedad de Alzheimer. Estadio VI de Braak y angiopatía amiloide asociada.
6	17-015-6(#8)	H	62	Enfermedad de Alzheimer. Estadio VI de Braak.
7	17-015-7	H	72	Enfermedad de Alzheimer. Estadio III de Braak.
8	17-015-8(#6)	H	77	Enfermedad de Alzheimer. Estadio IV de Braak. Cambios hipocampales secundarios a antigua hipoxia.
9	17-015-9	H	41	Cerebro normal para la edad del paciente.
10	17-015-10	H	19	Cerebro normal para la edad del paciente.
11	17-015-11(#3)	H	82	Cerebro normal para la edad del paciente.
12	17-015-12(#2)	M	71	Cerebro normal para la edad del paciente.
13	17-015-13(#4)	M	100	Cerebro normal para la edad del paciente.
14	17-015-14(#1)	M	57	Cerebro normal para la edad del paciente.
15	17-118-1	M	76	Enfermedad de Alzheimer. Estadio VI de Braak.
16	17-118-2	H	40	Cerebro normal para la edad del paciente.
17	17-118-3	M	41	Cerebro normal para la edad del paciente.
18	18-017-1	M	71	Enfermedad de Alzheimer. Estadio I de Braak.
19	18-017-2	M	65	Cerebro normal para la edad del paciente.

M: mujer; H: hombre; #: caso utilizado para técnicas analíticas

Las muestras pertenecían tanto a hombres como a mujeres de edades comprendidas entre 19-100 años, entre las que había cerebros normales y cerebros que presentaban la neurodegeneración objeto del presente estudio. Se estudiaron un total de 19 casos, 9 casos control y 10 casos con EA (Tabla II) que fueron divididos en tres grupos de edad para el posterior análisis de los resultados, siendo estos: 20-40 años (n=4), 50-70 años (n=11) y 80-100 años (n=4). Para el análisis de datos, los casos EA se dividieron en dos grupos en función del estadio de Braak asignado, siendo estos: casos con EA moderado (estadio I-III; n=3) y casos con EA severo (estadio IV-VI; n=8).

### 3.2.-Procesamiento de muestras

Las muestras de tejido cerebral humano fueron fijadas por inmersión en formalina al 10% en tampón fosfato 0,1 M (pH=7,4). Tras la fijación, el tejido fue deshidratado en alcoholes en concentración creciente, pasados por dos baños de acetato de butilo, y embebidos posteriormente en parafina tras un paso previo por acetato de butilo. Todas las muestras han sido tratadas por igual, con el mismo protocolo y los mismos tiempos para asegurar la comparación entre ellos. Las secciones se obtuvieron con un microtomo de tipo Minot (Leica) a un grosor de 5-7  $\mu$ m. Los cortes fueron estirados y adheridos sobre portas gelatinizados, dejándose secar durante 24 horas en una estufa a 36°C.

Por otro lado, se utilizaron cortes de intestino e hígado de los controles (#1, #4) como controles positivos ya que la distribución de FPN está bien estudiada en la membrana basolateral intestinal (Figura S1). Estas secciones fueron tratados de la misma forma.

Cabe mencionar, que se ha trabajado con dos secciones consecutivas de los tejidos para realizar dos protocolos de inmunohistoquímica (IHQ): (i) IHQ cromogénica convencional con tinción con diaminobencidina (DAB) para su evaluación microscópica, y (ii) protocolo IHQ con AuNCs para la imagen del hierro y de la FPN empleando LA-ICP-MS.

### 3.3.- Histoquímica

Las secciones sometidas al estudio citoarquitectónico se tiñeron utilizando un procedimiento de tinción tipo Nissl (Navarro et al., 2013). También se realizaron técnicas rutinarias para el diagnóstico y estudio de la EA. Así, para visualizar los marcadores cerebrales típicos de la neuropatología se utilizó la técnica de la plata de Reusche (Reusche 1991) así como una modificación del método del rojo Congo desarrollado en nuestro laboratorio (Navarro et al., 1999, 2013).

Para la localización y cuantificación del hierro no hemo se usó la técnica histoquímica de Perls (Kiernan 2008; Meguro et al. 2003, 2007). Esta técnica consiste en la liberación del hierro unido a la ferritina y a la hemosiderina a través del ferrocianuro ácido. El hierro precipita formando depósitos azules. Para observar los núcleos se utiliza una contratinción con safranina 0,5 % en agua (Kiernan 2008).

### 3.4.- Inmunohistoquímica

Para la localización de las proteínas objeto de estudio, FPN y HPC, Tau y A $\beta$ , se empleó una técnica de IHQ convencional en secciones consecutivas para cada uno de los casos. Previamente, las

secciones fueron desparafinadas en xilol y rehidratadas en alcoholes sucesivos en concentración decreciente hasta el agua. Posteriormente, las secciones fueron tratadas con Triton X (0,1%, 5 min), lavadas con agua destilada. A continuación, se procedió al bloqueo de la peroxidasa endógena mediante un tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%, 5 min). Tras ser nuevamente lavadas con agua destilada, las secciones se trataron con PBS (tampón fosfato salino, del inglés *phosphate buffer saline*) (2 min), y con una solución de bloqueo con BSA 1% (albúmina de suero bovino, del inglés *bovine serum albumine*) (30 min). Las muestras se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda a las concentraciones que pueden verse en la Tabla III. Al día siguiente, las secciones se lavaron con PBS, se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado en dilución 1:50 (Universal Quick, PK-8800 Vector Laboratorios) durante 30 min a temperatura ambiente, se lavaron de nuevo con PBS, y fueron tratadas con un complejo avidina-peroxidasa (E2886, Sigma) durante 30 min. Por último, se realizó un revelado con el cromógeno DAB (D5637 Sigma). Las muestras fueron contrastadas siguiendo un protocolo de nuestro grupo de investigación (Navarro et al., 1999), y se realizó su montaje con el medio Mountex (Mounting Media Mountex, Taab). Los anticuerpos primarios empleados en la detección de cada proteína se muestran en la Tabla III.

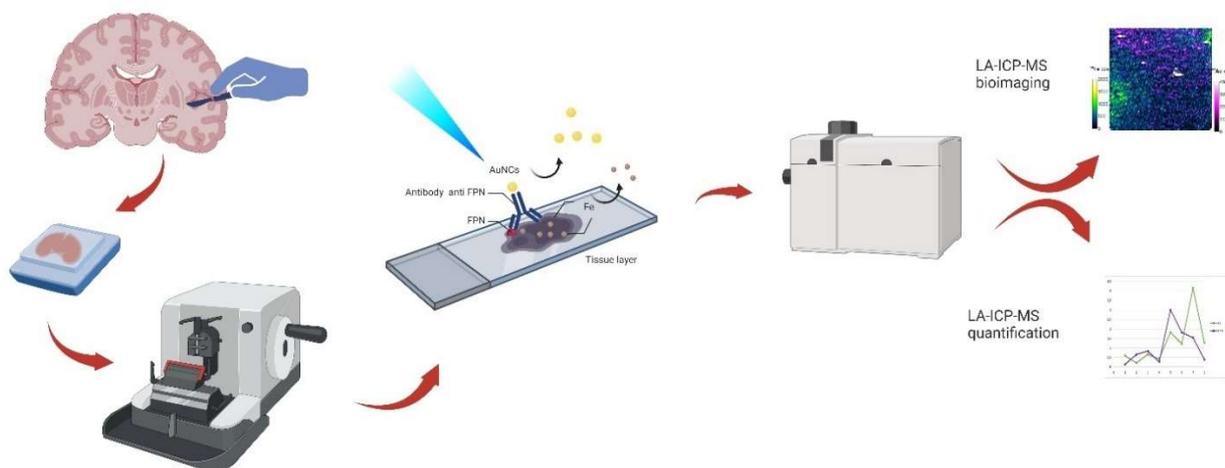
Tabla III.- Anticuerpos primarios empleados y dilución utilizada.

Proteína	Anticuerpo primario	Referencias	Dilución	Especificidad
<b>FPN</b>	Ferroportin-1 (LifeSpan Biosciences, Inc.)	LS-B1836	1:500	Principal exportador de hierro de las células. Se encuentra en macrófagos, enterocitos duodenales, trofoblastos, eritrocitos y hepatocitos..
<b>HPC</b>	HEPC (OriGen Technologies Inc.)	AM21007PU-N	1:200	Este anticuerpo reconoce el péptido antimicrobiano de hepcidina (HAMP) que funciona como una molécula de señalización involucrada en el mantenimiento de la homeostasis del hierro.
<b>Tau</b>	Tau-2 (Novocastra)	NCL-Tau-2	1:50	Tau fosforilada; Ovillos neurofibrilares, hilos en el neuropilo y neuritas dísticas que rodean las placas seniles.
<b>Aβ</b>	Beta Amyloid (Novocastra)	NCL-beta-amyloid	1:50	Reacciona contra la beta-amiloide humana; formas no agregadas, oligoméricas y fibrilares de AB42 sintético y AB40 no agregado.

Los controles positivos para FPN y HPC como hemos comentado, se realizaron sobre cortes de intestino e hígado humanos, respectivamente. Como control negativo se utilizaron secciones no tratadas con el anticuerpo primario; bajo estas condiciones no se observó inmunodetección específica en ninguno de los casos (Figura S1).

### 3.5.- Registro del hierro utilizando LA-ICP-MS

Para poder analizar la cantidad de hierro y las proteínas relacionadas con su metabolismo, se empleó un espectrómetro de masas con Plasma Acoplado Inductivamente y Ablación con Láser (LA-ICP-MS, del inglés *Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*). La LA-ICP-MS es una tecnología analítica potente que permite realizar análisis altamente sensibles de elementos e isótopos directamente sobre muestras sólidas. La LA-ICP-MS consiste, básicamente, en un haz de láser que se enfoca en la superficie de la muestra para generar partículas finas, en un proceso conocido como ablación con láser. Las partículas ablacionadas son transportadas, posteriormente, a la fuente de excitación secundaria del instrumento ICP-MS para la digestión e ionización de la masa muestreada. Los iones excitados se introducen en un detector de espectrómetro de masas para realizar un análisis tanto de elementos como de isótopos. La utilización de la LA-ICP-MS permite construir una imagen (*bioimaging*) de los iones de elección en la muestra, además de su cuantificación (Ilustración 16). No obstante, para esta técnica es necesaria una etapa previa de preparación en la que las proteínas de interés sean marcadas con un heteroátomo fácilmente medible por ICP-MS. En nuestro caso, los iones buscados fueron el hierro (Fe) que estaba en la muestra y el oro (Au) unido a un anticuerpo primario utilizado en la IHQ frente a una proteína de interés.



*Ilustración 16.- Esquema gráfico de la técnica LA-ICP-MS empleada. Creación propia en Biorender.com.*

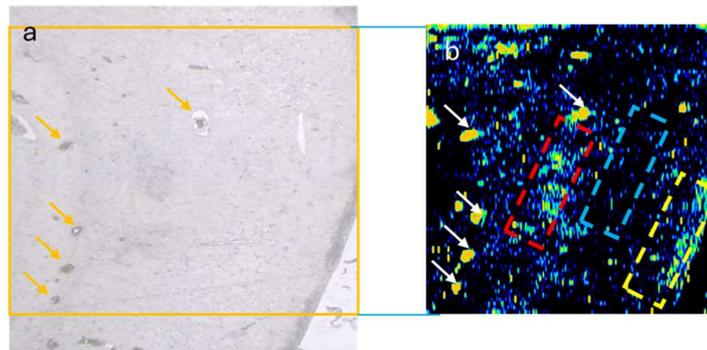
La combinación de un proceso de IHQ con la posterior detección por LA-ICP-MS permite conocer la distribución de la biomolécula de interés en estructuras micrométricas de tejidos biológicos. Los análisis LA-ICP-MS se realizaron con un sistema LA comercial (LSX-213 de Teledyne Cetac

Technologies, Omaha, NE, EE. UU.) acoplado a un campo ICP-MS sectorial de enfoque dual (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania), trabajando en modo de resolución de masa media para eliminar interferencias poliatómicas de los isótopos buscados (es particularmente importante en nuestro caso evitar la interferencia de  $^{40}\text{Ar}^{160}$  de  $^{56}\text{Fe}$ ). La celda de ablación comercial del sistema LSX-213 fue reemplazada por una cámara de ablación refrigerada Peltier, construida internamente con un volumen interno reducido que permite mantener constante la temperatura de la muestra a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El acoplamiento LA-ICP-MS fue optimizado diariamente usando el estándar de vidrio SRM NIST 612 para alta sensibilidad, intensidad de fondo y la relación de señal  $^{238}\text{U}/^{232}\text{Th}$  que debe estar cerca de 1. También se midió la relación de señal  $^{248}\text{ThO}/^{232}\text{Th}$  para controlar la formación de óxido, siempre por debajo del 0,5% en las condiciones optimizadas seleccionadas.

En la IHQ con nanoclusteres de oro (AuNC), para el estudio de la cantidad de FPN con LA-ICP-MS, el anticuerpo FPN se conjugó previamente a un AuNC, de acuerdo con un procedimiento descrito previamente (Cruz-Alonso et al. 2019). Después del bloqueo, se añadió el anticuerpo anti-FPN marcado con AuNC ( $5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ) a las secciones y se incubó durante la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Después de esto, se realizó un paso de lavado final con PBS y los portaobjetos se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis LA-ICP-MS.

Se ablacionaron las secciones de tejido cerebral en modo de escáner proporcionado por el aparato utilizando un haz láser de  $10\text{ }\mu\text{m}$  de diámetro (Ilustración 17a). Los puntos láser superpuestos y las altas tasas de repetición (20 Hz) dan como resultado un modo de escaneo diferencial, de modo que se logró una mejor resolución lateral que el diámetro del punto láser seleccionado. Las muestras se sometieron a ablación línea por línea en condiciones optimizadas de LA-ICP-MS. En todos los casos, se escanearon secciones del hipocampo humano (la capa CA1) con un rayo láser utilizando un promedio de 70 a 80 líneas individuales. Las condiciones experimentales se optimizaron en términos de máxima sensibilidad y resolución lateral. Para el procesamiento de datos de imágenes, la contribución del objetivo de gas se eliminó de las señales de intensidad brutas, para trabajar entonces con datos de intensidades netas. Las imágenes bidimensionales obtenidas por LA-ICP-MS se crearon utilizando el software ImageJ-Fiji (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, EE. UU.).

El software se utilizó también para separar los datos de la cuantificación de las zonas diferentes en que se organiza la CA1 del hipocampo y poder comparar la cantidad de hierro y oro entre los controles y la EA. Estas zonas fueron tres: *Stratum oriens* (SO), *Stratum pyramidale* (SP) y *Stratum molecular-radiatum* (SMR) (Ilustración 17).



**Ilustración 17.-** Evaluación de la distribución de Fe en secciones CA1 mediante LA-ICP-MS (diámetro del tamaño del punto láser 25  $\mu\text{m}$ ). (a) Imagen de transmisión de la región CA1 del hipocampo del cerebro con EA (donante #6) tomada con la cámara escáner del aparato. (b) Imagen cualitativa correspondiente de la distribución de  $^{56}\text{Fe}^+$ . Las flechas indican el hierro hemo dentro de vasos sanguíneos grandes en ambas imágenes. Los recuadros indican la zona donde se ha realizado la recogida de datos. En rojo, estrato molecular-radial (SMR); en azul, estrato piramidal (SP) y en amarillo, estrato oriens (SO).

Para la calibración del aparato y poder realizar una cuantificación exacta la distribución del hierro y la proteína FPN (anticuerpos marcados con nanoclusters de oro, AuNC) en secciones de cerebros humanos, se emplearon estándares de gelatina con concentraciones conocidas de hierro y oro. Las curvas de calibración para Au y Fe se crearon utilizando estándares con concentraciones conocidas que oscilaban entre 0 y 60  $\mu\text{g}$  de Au.  $\text{mL}^{-1}$  y de 0 a 52  $\mu\text{g}$  Fe.  $\text{mL}^{-1}$  respectivamente. Estos estándares se prepararon mezclando gelatina al 15 % (p/p) con las soluciones de  $\text{NaAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  para calibraciones de Au y Fe respectivamente. La mezcla se homogeneizó calentando y agitando a 60  $^\circ\text{C}$  y luego se congeló a -20  $^\circ\text{C}$ . El estándar de gelatina congelada se cortó en secciones de 5  $\mu\text{m}$  de espesor (semejantes a las de tejido), se montaron en portaobjetos de vidrio para microscopio y se determinaron sus concentraciones de Au y Fe usando nebulización convencional. Se usó el ICP-MS después de digestión ácida con  $\text{HNO}_3$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Cruz-Alonso et al. 2019).

### 3.6.- Observación de muestras y captación de imágenes

El objetivo de la captación de imágenes fue llevar a cabo una cuantificación de la señal IHQ para cada una de las proteínas estudiadas. Para ello, se tomaron 3 micrografías de cada zona elegida (para cada proteína y cada caso) con un aumento de 20x. En la zona CA1 del hipocampo se tomaron fotografías paralelas a la parte externa del giro dentado; en la CENT fueron tomadas en la parte más posterior. En el GP y el PUT se realizaron las fotos de forma aleatoria en cada área. Las secciones se fotografiaron mediante una cámara Nikon adaptada a un microscopio Nikon Eclipse E400.

### 3.7.- Análisis de imágenes inmunohistoquímicas

Para realizar la determinación de los niveles de las proteínas de interés en los tejidos tras el procedimiento IHQ, la señal cromogénica se ha seleccionado utilizando el programa Adobe Photoshop CS 8.0.1 (Adobe, California, Estados Unidos) y la densidad se ha medido mediante el software ImageJ 1.37c (Wright Cell Imaging Facility, Toronto, Canadá), mediante la aplicación de un método desarrollado en nuestro laboratorio (Tolivia et al. 2006). El protocolo de tratamiento de las imágenes se describe brevemente a continuación (ilustración 18):

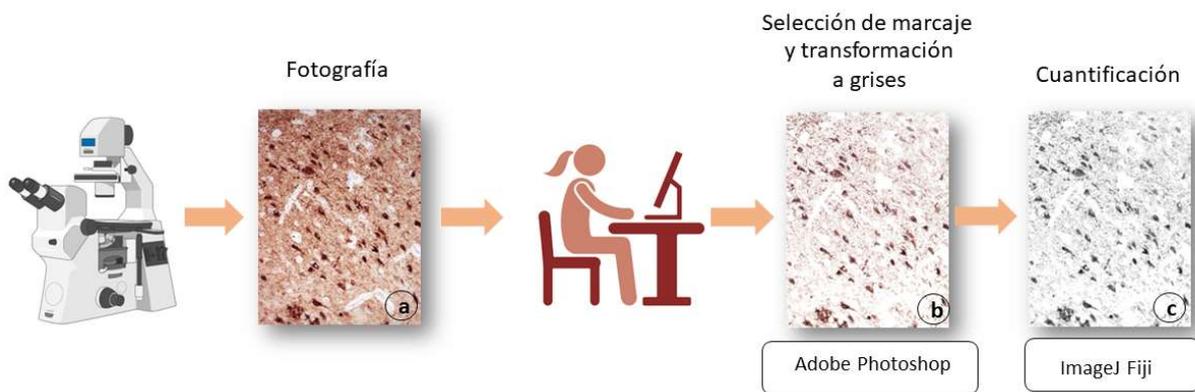


Ilustración 18.- Análisis densitométrico del marcaje inmunohistoquímico .Creación propia con Power Point.

- Para seleccionar la señal cromogénica específica, se selecciona "Rango de color" en el "Menú de selección" de Photoshop, y con la herramienta "Cuentagotas", se hace clic en cualquier objeto de la imagen que muestre el color deseado (es decir el color del cromógeno empleado en el procedimiento IHC). De esta manera todas las áreas dentro del rango de color seleccionado se resaltan en una imagen duplicada. Una vez finalizada la selección de cromógeno, el perfil utilizado puede archivarse para su uso con secciones teñidas similares.
- Se cierra el panel de "Gama de colores" y todos los objetos inmunopositivos en la imagen original aparecen resaltados.
- Se abre el menú "Editar" de Photoshop y se selecciona "Copiar" en un "Nuevo archivo" y "Pegar" la imagen seleccionada. La nueva imagen muestra sólo las áreas seleccionadas positivas sobre un fondo blanco.
- Se convierte la imagen a escala de grises para que todas las áreas seleccionadas se representen en tonos de gris y se correlacionan con la intensidad del cromógeno. Esta imagen

en escala de grises se debe guardar en formato '*tif*' para que luego se pueda abrir en el programa *ImageJ*.

- Se abre la imagen en este programa y se calcula la "Densidad media" en condiciones de "No calibrado". Las medidas obtenidas muestran la intensidad de la señal y se pueden copiar y exportar a una hoja de cálculo (p.e., Excel) donde fueron clasificados en función del caso, el sexo, la edad, la zona estudiada y la proteína cuantificada.

### **3.8.- Análisis estadístico**

Los datos obtenidos fueron extraídos y trasladados al programa GraphPad Prism 8 para realizar los cálculos pertinentes y el análisis estadístico. En todos los casos se asumió la independencia y aleatoriedad de las muestras, y se comprobó la normalidad y la homogeneidad de varianzas. Posteriormente, test de análisis de varianzas (ANOVA), de uno o dos factores, seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Durante todo el estudio se utilizó un nivel de significación de 0,05. Los datos en las gráficas se representan como las medias  $\pm$  SEM.

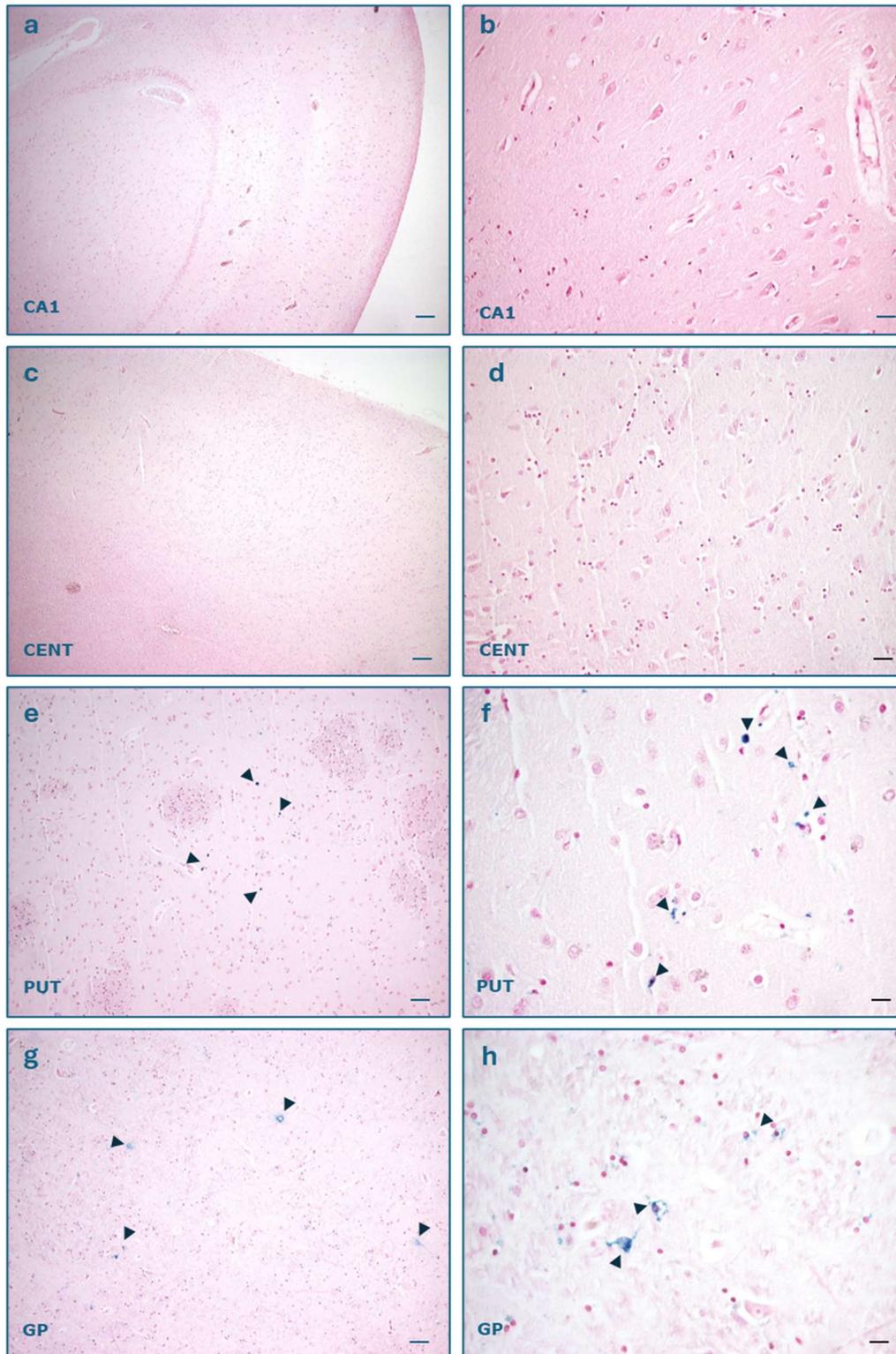


## 4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1.- Detección de hierro cerebral mediante técnicas histoquímicas

Con el fin de localizar y cuantificar el hierro no hemo en las muestras de hipocampo y CENT, así como en los núcleos PUT y GP de los ganglios basales, se utilizó, en primer lugar, la técnica histoquímica clásica de Perls. Esta técnica es una de las más usadas en el diagnóstico anatomopatológico (Bautista et al. 2008), ya que permite poner de relieve no solo el ion más abundante en el cerebro (Meguro et al., 2007) sino también aquel que presenta más capacidad de producir radicales libres. El término hierro no hemo incluye especies heterogéneas de complejos de hierro en los que este ion está más débilmente unido a bases orgánicas y proteínas de bajo peso molecular que el hemo (complejo hierro-protoporfirina). El hierro no hemo, por tanto, se libera en soluciones ácidas siendo fácilmente detectable mediante técnicas histoquímicas convencionales, como la mencionada técnica de Perls específica para el ion férrico. En este caso, aparece un precipitado en un color azul oscuro visible al microscopio, denominado azul de Prusia, allí donde están los iones y de Turnbull (para el ion ferroso) que terminan en la producción de compuestos de hierro insolubles visibles al microscopio (Kiernan 2008). Por el contrario, la tinción del hierro hemo es poco probable con este método, ya que se requiere un tratamiento con un oxidante muy fuerte para liberar y activar el hierro del grupo hemo (Meguro et al. 2003).

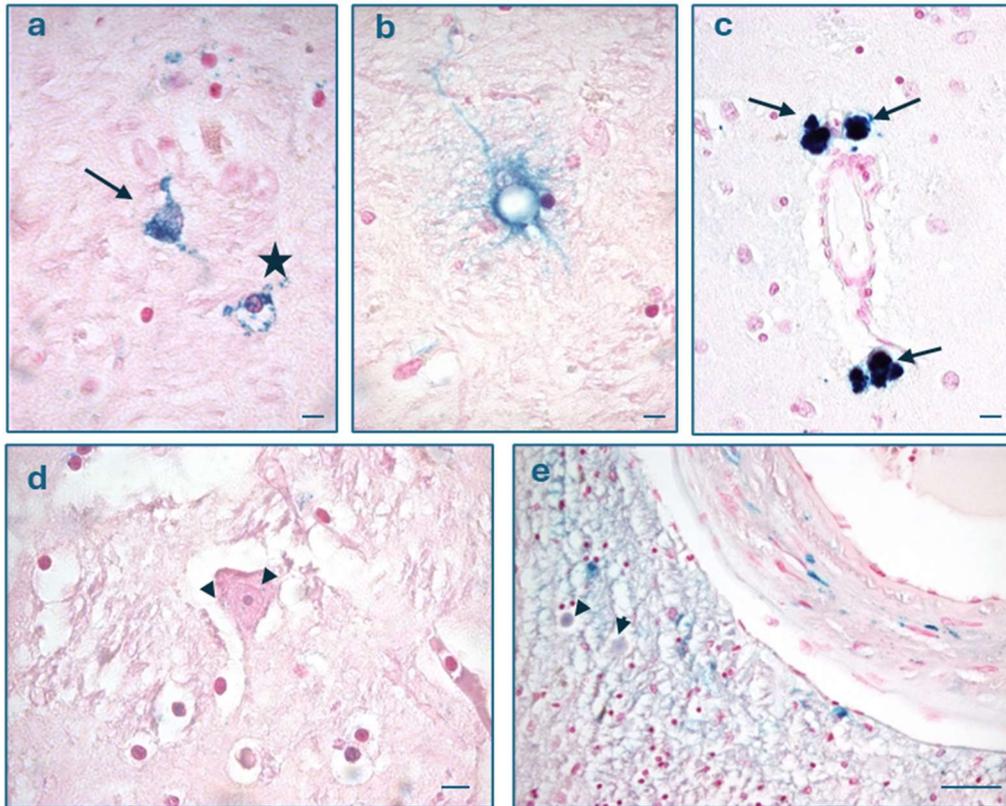
Al realizar la técnica de Perls sobre las secciones, aparece un precipitado en un color azul oscuro, denominado azul de Prusia, allí donde están los iones férricos (Kiernan 2008). Los resultados de nuestro análisis han demostrado, en primer lugar, una tinción escasa para el hierro aunque con importantes diferencias entre las zonas estudiadas. De esta manera, no se ha observado prácticamente tinción azul en la zona del hipocampo, pero si en los ganglios basales tanto en controles como en los pacientes con EA. En la Figura 1 se pueden observar algunos detalles de las zonas estudiadas. Debido a la presencia de marcaje, al menos en los ganglios basales, podemos concluir que la técnica ha funcionado. Sin embargo, no ha resultado ser lo suficientemente sensible para poner de relieve la escasa cantidad de hierro de las muestras de hipocampo y CENT y, por tanto, no fue posible la cuantificación histoquímica en estas zonas. Cabe destacar el intento de cuantificación en el PUT, algo que fue imposible en la CA1 del hipocampo por la ausencia de marcaje (Figura S2).



**Figura 1.**-Tinción de Perls en varias zonas del cerebro humano: Zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1), corteza entorrinal (CENT), globo pálido (GP) y putamen (PUT). Contraste nuclear con fucsina ácida. **(a)** CA1 de hipocampo de varón de 77 años con EA Braak IV. Aumentos 4x. Barra 100  $\mu\text{m}$ . **(b)** Detalle de la imagen anterior, a un aumento de 20x. Nótese que no existen depósitos visibles de hierro férrico. Aumentos 20x. Barra 30  $\mu\text{m}$ . **(c)** CENT de un varón de 77 años con EA. Aumentos 4x. Barra 100  $\mu\text{m}$ . **(d)** Detalle de la corteza y sus neuronas a 20x. Barra 30  $\mu\text{m}$ . **(e)** GP de los ganglios basales de una mujer de 77 años con EA Braak V-VI tomado a un aumento de 4x. Barra 100  $\mu\text{m}$ . Nótese los depósitos de hierro en azul de Prusia (cabezas de flecha) **(f)** Depósitos del mismo caso vistos en detalle a 40x. Barra 20  $\mu\text{m}$ . **(g)** GP de una mujer de 77 años con EA Braak V-VI. Depósitos de hierro señalados con cabeza de flecha. Foto realizada a 4x. Barra representa 100  $\mu\text{m}$ . **(h)** Detalle de la anterior con los precipitados en azul de Prusia señalados con cabeza de flecha, imágenes tomadas a 40x. Barra 20  $\mu\text{m}$ .

La histoquímica del hierro, en concreto la técnica de Perls, ha sido el método de elección clásico para la investigación patológica de la alteración de la homeostasis de este ion. Esta técnica es fácil y económica, aunque el límite de detección del hierro no hemo es demasiado alto (Meguro et al. 2003). Para incrementar la detección, otros autores han implementado métodos de intensificación del marcaje usando DAB. Otra alternativa es la perfusión sanguínea de los reactivos de la tinción, seguidos de DAB, pero como es lógico esto solo es útil para estudios en experimentación con animales, no en humanos (Meguro et al. 2003). En nuestro caso, hemos intentado realizar una intensificación con DAB según el protocolo de Meguro y colaboradores (2003), pero con poco éxito. La DAB tiene tendencia a precipitar y proporcionar cierto fondo en muestras humanas, sobre todo cuando la acción de la peroxidasa endógena no está bien inhibida, lo cual hace difícil cuantificar las señales obtenidas.

No obstante, mediante este método hemos podido observar depósitos tanto intracelulares como extracelulares de hierro en los ganglios basales, situándose estos últimos, preferentemente alrededor de los vasos sanguíneos como grandes cuerpos de hemosiderina (Figura 2 c,e). Desde el punto de vista celular, las células que con mayor frecuencia presentaron marcaje para el hierro fueron las células de glía, y solo de forma muy excepcional algunas neuronas de gran tamaño (Figura 2 d). Dentro de las células de glía, las más frecuentemente teñidas fueron las células de microglia y oligodendroglia, seguidas de los astrocitos reactivos (Figura 2 a,b). Estas observaciones concuerdan con los estudios de Meguro y colaboradores en cerebro de rata, donde los oligodendrocitos fueron las células más prominentes por la intensidad y el número de la tinción y, por el contrario, la mayoría de las neuronas solo estaban teñidas pálidamente. Es más, estos autores también aseguran que los oligodendrocitos incrementan su número en el envejecimiento normal y han llegado a demostrar, por microscopia electrónica, que los procesos citoplasmáticos que rodean los haces de fibras nerviosas mielinizadas contienen zonas positivas para hierro en las superficies interna y externa (es decir, collares internos y externos) de la vaina de mielina, semejante a lo que hemos observado nosotros en las imágenes de microscopia fotónica de campo claro (Figura 2a) (Meguro et al. 2007).



**Figura 2.-** Tinción de Perls, detalles celulares. Contraste nuclear con fucsina ácida. (a) Oligodendrocito (estrella) y astrocito (flecha) en el globo pálido de una mujer de 77 años con EA Braak V-VI. Aumentos 100x. Barra 10  $\mu$ m. (b) Astrocito reactivo en globo pálido de mujer de 77 años con EA Braak V-VI. Aumentos 100x. Barra 10  $\mu$ m. (c) Vaso sanguíneo en putamen de varón de 77 años con EA Braak IV. Obsérvense los depósitos de hemosiderina en azul Prusia en el espacio perivascular (flechas). Aumentos 100x. Barra 10  $\mu$ m. (d) Neurona en globo pálido de varón control de 19 años. Aumentos 100x. Pequeños granos en azul de Prusia en el citoplasma (cabeza de flecha). Barra 20  $\mu$ m. (e) Detalle de vaso arterial grande en putamen, mujer de 91 años con EA Braak V-VI. Obsérvense los cuerpos amiláceos ligeramente positivos (cabeza de flecha). Aumentos 40x. Barra 100  $\mu$ m.

En base a todo lo expuesto, nuestro estudio está de acuerdo con aquellos trabajos realizados en humanos y en roedores que demuestran, utilizando RMN, espectroscopia atómica o técnicas histoquímicas, que el córtex cerebral y subcortical junto con el hipocampo, son las zonas cerebrales que menos hierro presentan, mientras que sustancia negra, el GP y el puente muestran cantidades mayores (Gong et al. 2019; McAllum et al. 2020; Meguro et al. 2007). Además, también hemos demostrado que ciertas áreas de los ganglios basales como el GP y el PUT acumulan hierro en mayor medida en la vejez, cuando lo comparamos con otras regiones del cerebro, tal y como han reportado también otros autores (McAllum et al. 2020). Con el avance de la EA, hemos visto también un aumento del marcaje, pero ha sido difícilmente cuantificable por la falta de sensibilidad de esta técnica (Figura S2).

#### **4.2.- La cantidad de hierro, medida con técnicas analíticas, se incrementa en la CA1 de cerebros con Enfermedad de Alzheimer, pero su distribución es diferente entre capas**

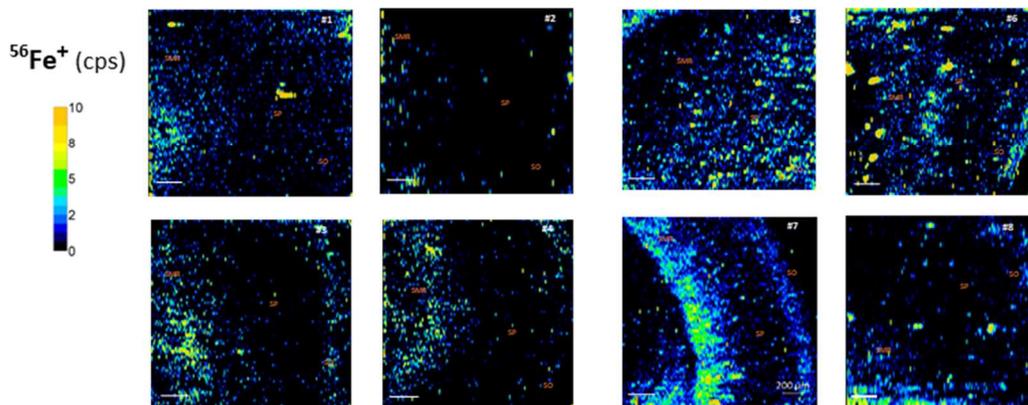
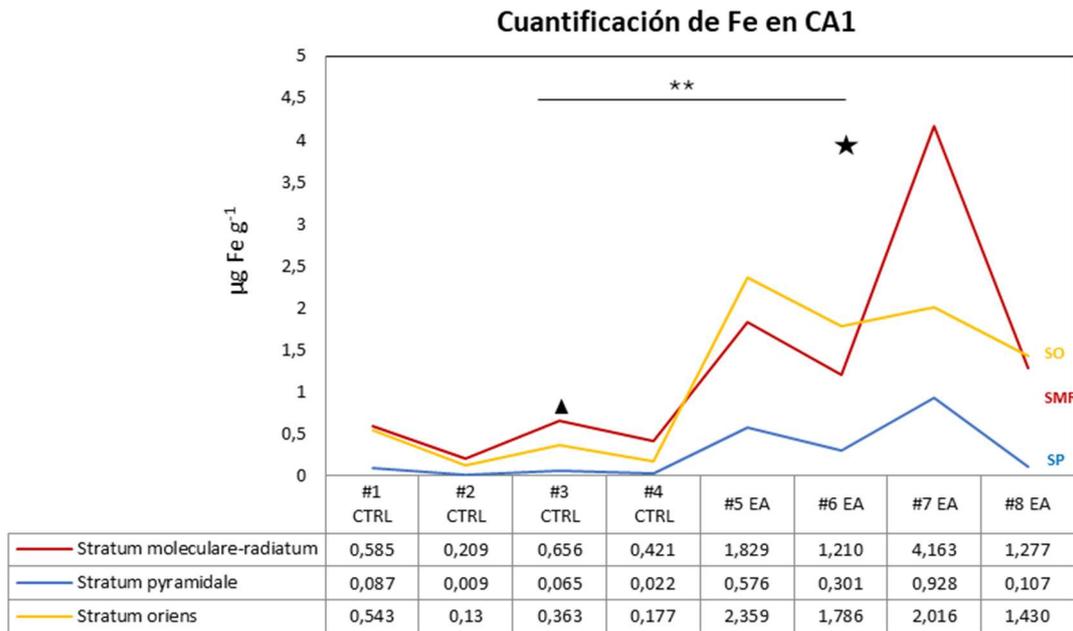
Como hemos visto en el punto anterior, las técnicas histoquímicas clásicas, aunque permiten obtener imágenes estructurales, sólo sirven para iones metálicos libres y no permiten una cuantificación fina. En nuestro caso, y dada la poca sensibilidad de la técnica de Perls, decidimos buscar otras formas de cuantificar el hierro de las muestras, en un intento de estudiar los posibles cambios y relacionarlos con las proteínas del metabolismo del hierro en la EA.

Entre las nuevas aproximaciones técnicas existentes, la LA-ICP-MS destaca por su alta sensibilidad y resolución celular (Cruz-Alonso et al. 2018, 2019). LA-ICP-MS utiliza un rayo láser enfocado para atomizar parte de una muestra. A continuación, el aerosol generado se envía a través de un ICP, que permite la atomización e ionización de la muestra. Posteriormente, los iones se separan según su relación masa-carga en el analizador de masas para ser, finalmente, detectados. De esta forma se puede conseguir información isotópica, así como un análisis elemental. Dado que el láser al moverse sobre la muestra elimina y mide sólo una pequeña zona a la vez, esta técnica genera una imagen espacial del área escaneada con una resolución en el rango de las micras (el diámetro del *spot* del láser puede estar entre 10-25µm). Ante la necesidad de obtener información detallada sobre cómo se comporta el hierro *in situ* en muestras de tejidos humanos, decidimos poner a punto esta técnica no tan convencional que nos permite la visualización del contenido de este ion en las áreas de interés, además de su cuantificación.

La LA-ICP-MS aquí implementada nos permitió visualizar imágenes bidimensionales (*bioimaging*) de hierro ( $^{56}\text{Fe}^+$ ) en la región CA1 del hipocampo humano. Esta técnica proporciona suficiente sensibilidad para estudiar el patrón de distribución del ion, así como obtener información sobre su contenido promedio en el área ablacionada, en secciones de tejido cerebral tanto de casos con EA como de controles. Además, esta metodología también nos permitió calcular la concentración media de hierro en áreas concretas de la región bidimensional obtenida, como las diferentes capas que forman la región CA1 del hipocampo (recordamos: SMR, SP y SO; Ilustración 17).

Nuestros datos indican una mayor acumulación de hierro en la sustancia gris del cerebro de los pacientes con EA, en comparación con los controles, lo que puede ser indicativo de una pérdida de la homeostasis de este ion en esta región vulnerable del cerebro. Así, en la Figura 3 se pueden observar imágenes de la distribución de hierro en la región CA1 del hipocampo humano (EA y controles), y la cuantificación absoluta de la concentración de este ion (expresada en  $\mu\text{g Fe}\cdot\text{g}^{-1}$ )

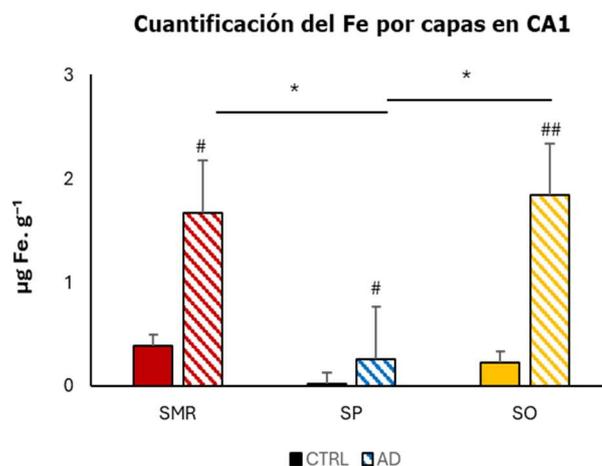
obtenida por LA-ICP-MS en esta zona cerebral. Los resultados demostraron que el hipocampo exhibe una concentración bastante baja de hierro, en el rango de 0,3-1,2  $\mu\text{g Fe}\cdot\text{g}^{-1}$  para controles y que se incrementa 2,8-7,1  $\mu\text{g Fe}\cdot\text{g}^{-1}$  para pacientes con EA. De manera interesante, se detectó un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ) en los niveles de hierro en los pacientes con EA ( $4,5 \pm 1,9 \mu\text{g g}^{-1}$ ) respecto a los controles ( $0,8 \pm 0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ ) (Figura 4).



**Figura 3.-** El gráfico de líneas corresponde a la concentración promedio de hierro (Fe) obtenida en tres regiones del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1): rojo: estrato molecular-radial (SMR), azul: estrato piramidal (SP) y amarillo: estrato oriens (SO), de controles (CTRL) (donantes #1, #2, #3 y #4) y pacientes con EA (donantes #5, #6, #7 y #8) en tejidos cerebrales humanos medida con LA-ICP-MS (expresado como  $\mu\text{g Fe}$  por g de tejido). El triángulo y la estrella representan los valores medios de los controles y de EA, respectivamente. En ambos casos el análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. \*= diferencias estadísticamente significativas versus control \*\* $p < 0,001$ . Debajo se muestran las imágenes cuantitativas del  $^{56}\text{Fe}^+$  obtenidas tras la ablación del tejido. Cps: cuentas por segundo. Barra 100  $\mu\text{m}$ .

Un análisis detallado de las imágenes mostró que el hierro aparecía heterogéneamente distribuido en las capas de la región CA1 del hipocampo tanto en muestras control como de pacientes con EA (Figura 3). De hecho, se observaron niveles más altos de este ion en zonas de fibras y áreas de interneuronas que en la capa de las neuronas piramidales, lo cual es una observación novedosa e importante (Figura 3).

A continuación, se cuantificó la señal de hierro en las tres áreas de CA1, es decir, SMR, SP y SO. Las concentraciones más altas de este ion aparecían generalmente en las regiones SMR y SO de los cerebros con EA, en comparación con sus controles, siendo estas diferencias significativas (Figura 4).



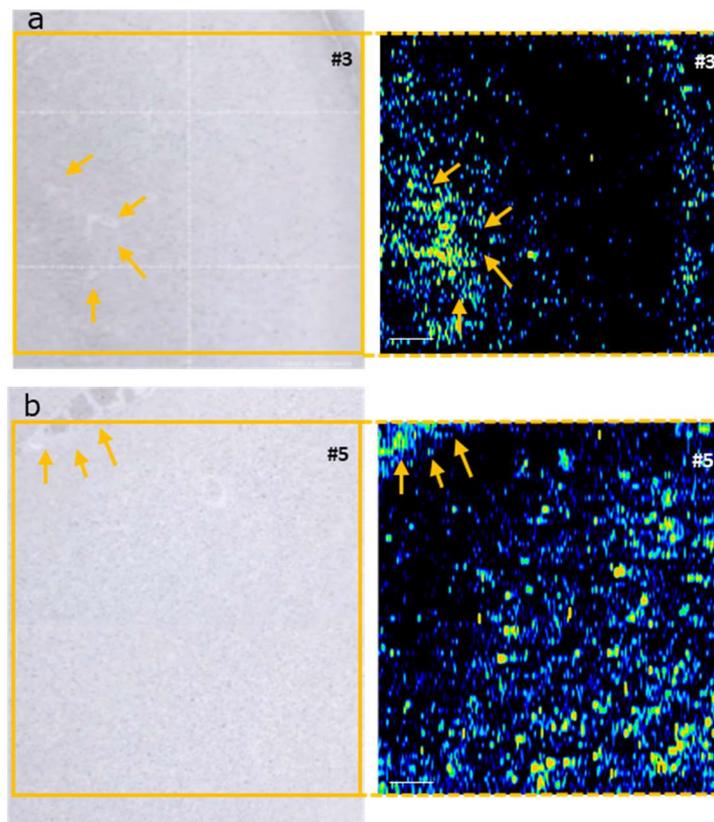
**Figura 4.** - Cuantificación del hierro (Fe) en cada capa del Cornu Ammonis1 del hipocampo obtenida con LA-ICP-MS. En colores sólidos los controles (CTRL) y en rallados los EA. Rojo: estrato molecular-radial (SMR), azul: estrato piramidal (SP) y amarillo: estrato oriens (SO). En ambos casos el análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. \*= diferencias estadísticamente significativas versus control \*  $p < 0,05$ .

También se pudo observar que el contenido de hierro era mayor en la sustancia blanca subyacente a las capas de materia gris. Sin embargo, la cuantificación de la cantidad de este ion en la sustancia blanca no fue posible ya que estaba fuera del área normalmente ablacionada de la muestra, sobre todo en las muestras de individuos control que presentan siempre una mayor superficie al no sufrir de atrofia cortical como la mayoría de los pacientes de EA.

Una observación destacable de estos análisis fue que el hierro se acumulaba en mayor cantidad en el espacio perivascular de los vasos sanguíneos subcorticales, lo que es indicativo de un drenaje del mismo a este nivel (Figura 5).

Actualmente, las técnicas analíticas, como LA-ICP-MS, que permiten la obtención de una imagen de heteroátomos con una resolución lateral en el rango de unas pocas micras, son de gran interés en los

estudios biomédicos. Su importancia radica en la posibilidad de una comprensión más profunda del papel de los metales en los sistemas biológicos, sin embargo, todavía son poco asequibles, bastante caras y muy lentas. Es justo por este motivo que no hemos podido realizar el mismo estudio en los ganglios basales del tálamo.



**Figura 5.** - A la derecha imágenes del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1) tomada con la cámara antes de la ablación. El cuadrado amarillo muestra el área ablacionada. A la izquierda las bioimágenes correspondientes del hierro (Fe). (a) CA1 de un hombre CTRL de 82 años (donante #3). (b) CA1 de una mujer con EA Braak I-II de 87 años (donante #5). Barra 100  $\mu$ m. Las flechas señalan la acumulación de hierro en el área perivascular de los vasos subcorticales.

Históricamente, se han utilizado muchas técnicas para evaluar la cantidad de hierro presente en el cerebro normal pero también en el patológico, como es el caso de la EA. Los estudios cuantitativos *post-mortem* con tinción histológica (tinción de Perl y Turnbull), como hemos visto, son imprecisos, pero ofrecen la posibilidad de realizar estudio citoarquitectónico y la posibilidad de evaluar cualitativamente las secciones teñidas con una resolución celular bastante alta. Por el contrario, la mayoría de las técnicas físicas cuantifican las diferentes formas de hierro sin distinción entre férrico, ferroso o hemo. A pesar de las limitaciones, el enfoque *post-mortem* aquí realizado ofrece valiosos conocimientos cuantitativos sobre el tejido nervioso, proporcionando mapas de distribución (*bioimaging*) y permitiendo, al tiempo, un análisis comparativo con otros métodos de análisis (Tabla

III); se pierde precisión iónica, pero se gana en precisión cuantitativa y citoarquitectónica. La LA-ICP-MS es altamente específica y sensible al hierro, con límites de detección muy por debajo de las concentraciones biológicas típicas que se encuentran en el tejido neurológico (Hare et al., 2016), lo que nos ha permitido la cuantificación de este ion incluso en áreas (hipocampo) donde sus niveles son muy bajos, al menos en condiciones control. Con respecto a la utilización de tejidos incluidos y desparafinados, es cierto que los efectos de la inclusión en parafina y la rehidratación, sobre los niveles de hierro en el cerebro, han sido cuestionados pero, hasta donde sabemos, este hecho no ha sido descrito por otros autores (Bulk et al., 2020; Cruz-Alonso et al., 2018; Hare et al., 2016). No obstante, para asegurar la reproductibilidad y optimizar la técnica, los cerebros han sido fijados, incluidos y desparafinados según protocolos estrictos de productos y tiempos.

Tabla III.- Comparación entre las técnicas utilizadas.

Análisis	Tinción Perls	LA-ICP-MS
<b>Especificidad</b>	Hierro no-hemo (Fe <sup>3+</sup> libre)	Información multielemento e isotópica de hierro.
<b>Sensibilidad de detección</b>	Baja-muy baja. No se cuantifica fácilmente.	Alta (0,01 µg. g <sup>-1</sup> ). Cuantificación más fácil.
<b>Muestra</b>	No se pierde. Se puede reutilizar con otras técnicas.	Se pierde por completo.
<b>Resolución espacial (µm)</b>	Imagen histológica y celular (0,2 µm)	Imagen histológica (10-200 µm)
<b>Técnica</b>	Reproducibile, simple y rápida	Reproducibile, sencilla y lenta
<b>Costo</b>	Barato, en el laboratorio	Caro, en servicios comunes

Anteriores análisis de LA-ICP-MS *post-mortem* de cerebros con EA han revelado que el hierro se acumula explícitamente en la sustancia gris de la corteza frontal y el hipocampo, las áreas más afectadas por las proteinopatía (Graham et al., 2014; Hare et al., 2016). Nosotros no compartimos esta observación ya que como hemos visto existen diferencias de la acumulación dentro de las capas que conforman la sustancia gris del hipocampo y además es mucho mayor en la sustancia blanca subyacente. Por ejemplo, la cantidad de hierro que hemos obtenido en la capa de neuronas piramidales de CA1 es pequeña cuando la comparamos con el resto de las capas, aunque su cantidad aumenta significativamente con la EA.

La presencia de hierro en los centros nerviosos superiores e inferiores es un hecho constatado durante años mediante el uso de infinidad de técnicas físicas y químicas (van Oostveen et al. 2021). En estos estudios se ha encontrado que los niveles más altos de hierro corresponden al PUT y al GP, mientras que los niveles más bajos se encuentran en el puente y la médula (Wang et al., 2019). Además, se ha observado que, sin lugar a duda, la cantidad de hierro aumenta durante el envejecimiento y algunas ENs. Así, el hierro se va acumulando en varias regiones del cerebro con la edad incluida la corteza, el hipocampo, la amígdala, el GP, el núcleo caudado y el PUT, pero el incremento verdaderamente importante ocurre en algunas patologías como la EP o la EA (Ramos et al., 2014; Wang et al., 2014; Wang et al., 2019). En esta última se ha visto que el aumento de este ion afecta a ciertas áreas de la corteza, en especial el hipocampo, tal y como nosotros hemos demostrado (Lu et al. 2017).

La mayoría de los estudios realizados hasta el momento se han centrado en la cuantificación del hierro en la sustancia gris cerebral, tanto *vivo* como en imágenes *post-mortem*, especialmente de la corteza temporal y frontal. Sin embargo, parece que la cantidad del ion depositado es mayor en la sustancia blanca que en la materia gris, en sujetos control y con EA, al menos en la neocorteza (Van Duijn et al. 2017; Hare et al. 2013; McAllum et al. 2020; Meguro et al. 2008). En este sentido, y aunque no ha sido cuantificado, nosotros hemos encontrado que el límite de sustancia gris-blanca cercana al estrato SMR coincidía con los niveles más elevados de hierro en el hipocampo de la EA.

En este contexto, existen evidencias que demuestran una asociación entre la acumulación de hierro en el cerebro y los déficits cognitivos en la EA. Ayton y colaboradores consideran, además, que es poco probable que el hierro aumente durante las primeras etapas de la enfermedad; los investigadores describieron que los mayores niveles del ion aparecían, exclusivamente, en personas dementes con patología de EA muy avanzada, mientras que los sujetos no dementes con un nivel similar de lesiones patológicas, no los mostraban (Ayton et al. 2020) .

La asociación significativa entre el depósito de hierro y la EA no parece discutible, pero el papel exacto de este ion en la patología sigue siendo desconocido. Es poco probable que la causa de la elevación del hierro en el cerebro durante la EA sea la misma que las que están implicadas en la sobrecarga sistémica del mismo, incluida la dieta o los trastornos periféricos del metabolismo del hierro (Jakaria et al. 2021). Tampoco está claro si el aumento del ion a nivel cerebral se produce a nivel intracelular, extracelular o a ambos, o si se debe a un acumulo por almacenamiento excesivo o a un fallo en los

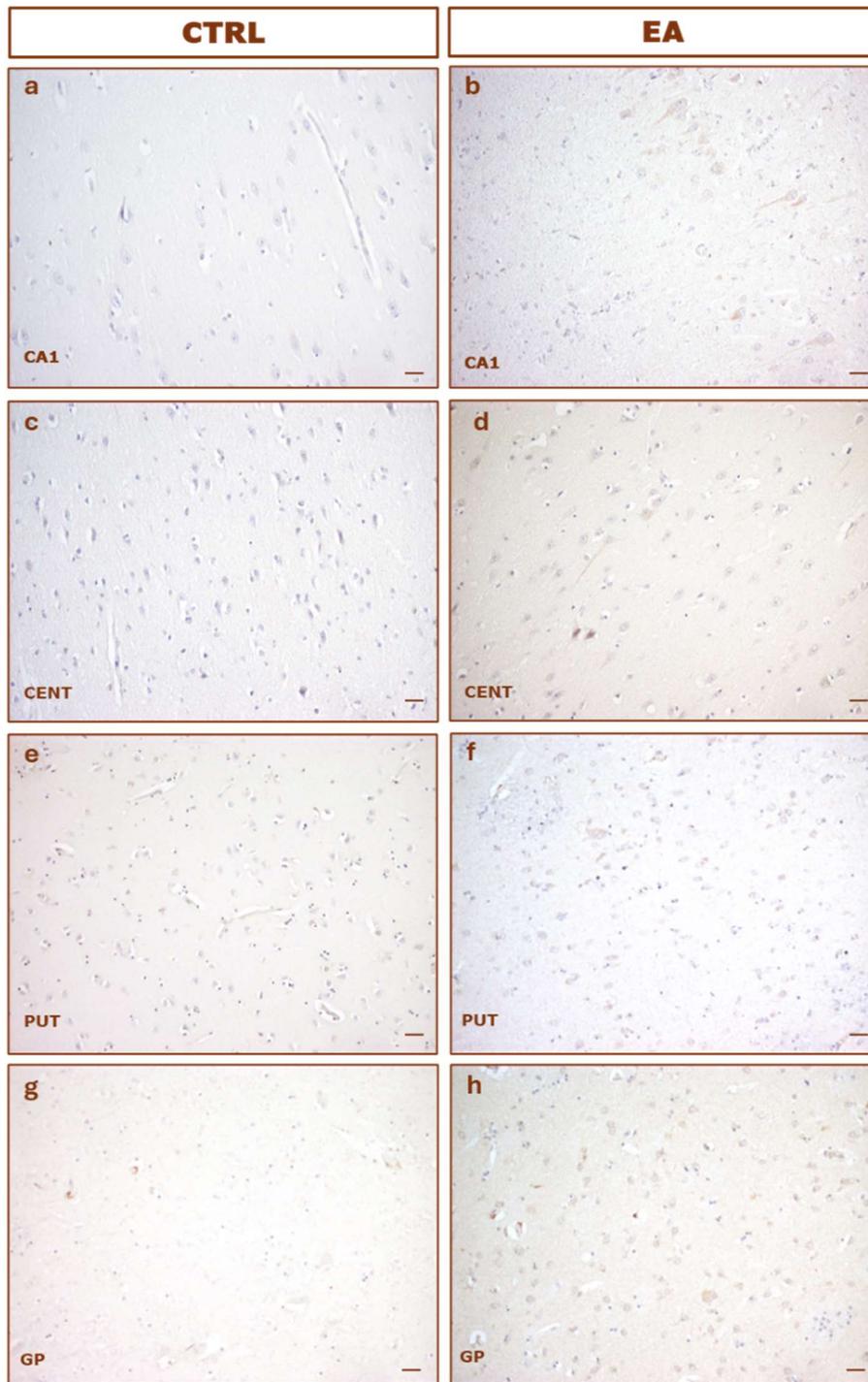
procesos de eliminación. El estudio de la expresión de las proteínas que mantienen el equilibrio del hierro a nivel cerebral podría arrojar luz sobre este hecho.

La presencia de TfR1 y DMT1 en las membranas de neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y microglía sugiere que todas estas células cerebrales tienen la capacidad de captar hierro, aunque también pueden tener otros mecanismos no específicos de absorción del mismo (Qian and Ke 2019). Además, la evidencia acumulada demuestra que la salida de hierro de las estas células se produce a través de una vía que involucra a la FPN. Se ha demostrado que la desregulación de la homeostasis de este ion en las ENs estaría relacionado con la ausencia o reducción de la expresión de sus exportadores, lo que podría redundar en un aumento de la cantidad de hierro acumulada en las células en la EA (Qian and Ke 2019; Zhao et al. 2015).

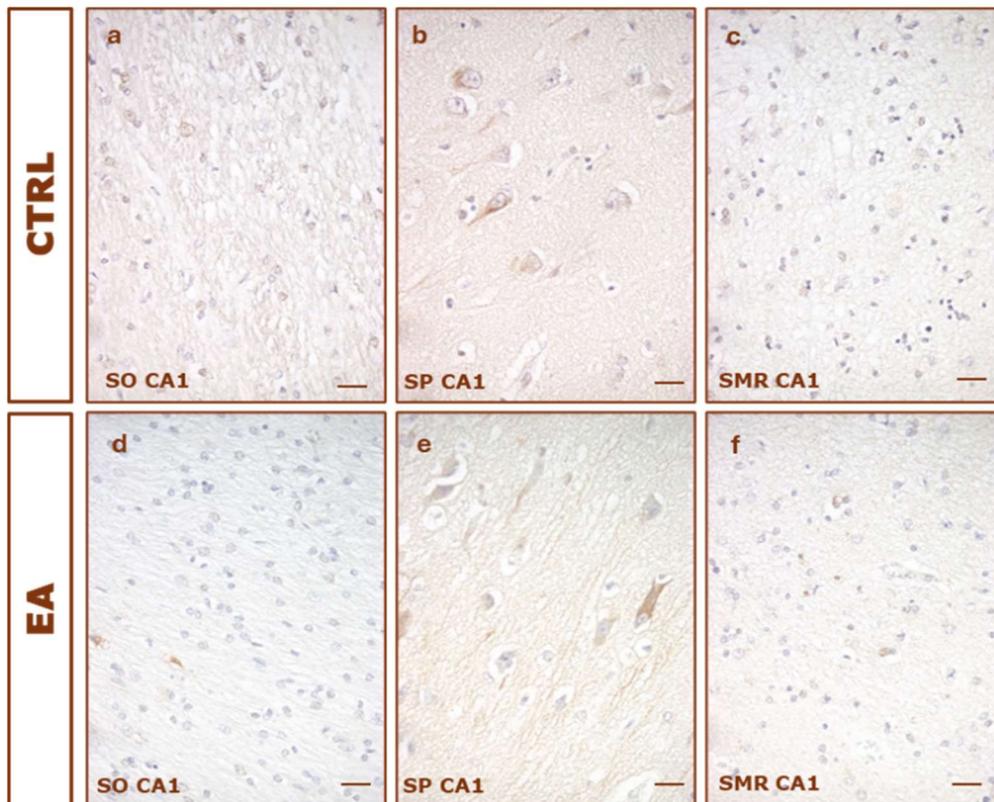
#### **4.3.- La expresión de la FPN aumenta en la corteza temporal y los ganglios basales con la edad y en la enfermedad de Alzheimer**

Tras demostrar un aumento en la concentración de hierro en los cerebros de pacientes con EA, el siguiente objetivo de nuestro estudio fue explorar el posible papel de algunas proteínas implicadas en el transporte y en el metabolismo de este ion en el cerebro. Está ampliamente aceptado que el incremento del hierro en la EA, y en el envejecimiento normal, podría estar causado por una desregulación del transporte de este ion mediada por el sistema FPN-HPC. Por este motivo, se investigó la expresión de ambas proteínas en secciones de hipocampo, CENT y ganglios basales, tanto de individuos sanos como pacientes con EA.

En primer lugar, se realizó una IHQ para FPN revelada con DAB en el hipocampo, la CENT, el PUT y el GP. El marcaje de esta proteína resultó más suave de lo esperado, lo que en cierta manera dificultó el estudio de la variación de la señal de FPN entre los controles y los pacientes con EA, y entre los diferentes estadios de Braak. En las imágenes de la Figura 6 podemos ver como la FPN se localiza en todas las áreas cerebrales analizadas, existiendo un mayor marcaje en los casos de EA, tanto en la zona de la corteza como en los ganglios basales. Además, la inmunotinción no fue igual en las diferentes capas del hipocampo y la CENT. Respecto a la CA1 del hipocampo observamos un marcaje más suave en el SO y el SMR que en la zona donde se sitúan las neuronas piramidales, la SP (Figuras 6 y 7).

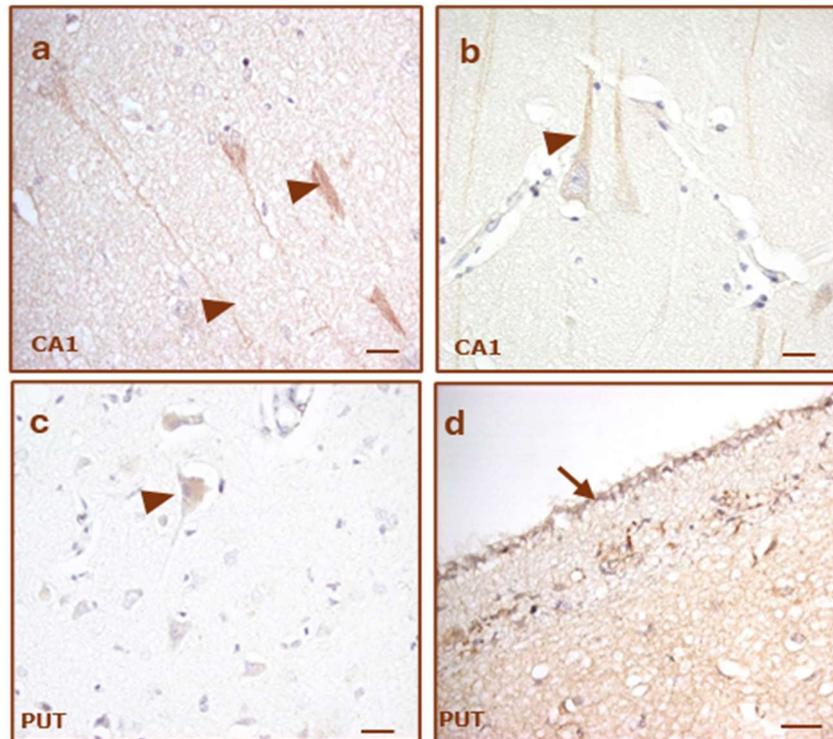


**Figura 6.-** Inmunohistoquímica para ferroportina (FPN) revelada con DAB (marrón). Contraste nuclear en azul con tiónina. Zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1), corteza entorrinal (CENT), globo pálido (GP) y putamen (PUT). (a) CA1 de un hombre CTRL de 82 años de hipocampo tomado a un aumento de 20x. (b) CA1 de hipocampo de una mujer de 91 años con EA en estadio de Braak VI. Aumento 20x. (c) CENT de una mujer CTRL de 57 años. Aumento de 20x. (d) CENT de un hombre de 61 años con EA a 20x. (e) PUT de un hombre CTRL de 41 años. Aumento 20x. (f) PUT de una mujer de 76 años con EA del estadio Braak V-VI. Aumento 20x. (g) GP de un hombre CTRL de 19 años. Aumentos 10x. (h) GP de una mujer de 76 años con EA con Braak VI. Aumentos 20x. Barra de calibración: 30  $\mu$ m.



**Figura 7.-** Inmunohistoquímica de FPN revelada con DAB. Contraste nuclear en azul con tiónina. Zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1) en sus diferentes estratos: SO, estrato oriens; SP, estrato piramidal; SMR, estrato molecular-radial. (a) SO de la CA1 de un hombre CTRL de 19 años tomado a un aumento de 40x. (b) SP de la CA1 de un hombre CTRL de 19 años tomado a un aumento de 40x. (c) SMR de la CA1 de un hombre CTRL de 19 años tomado a un aumento de 40x. (d) SO de CA1 de una mujer de 84 con EA en estadio de Braak II a 20x. (e) SP de CA1 de una mujer de 84 con EA en estadio de Braak II. Foto realizada a 20x. (f) SMR de CA1 de una mujer de 84 con EA en estadio de Braak II a 40x. Barra de calibración: 30  $\mu$ m.

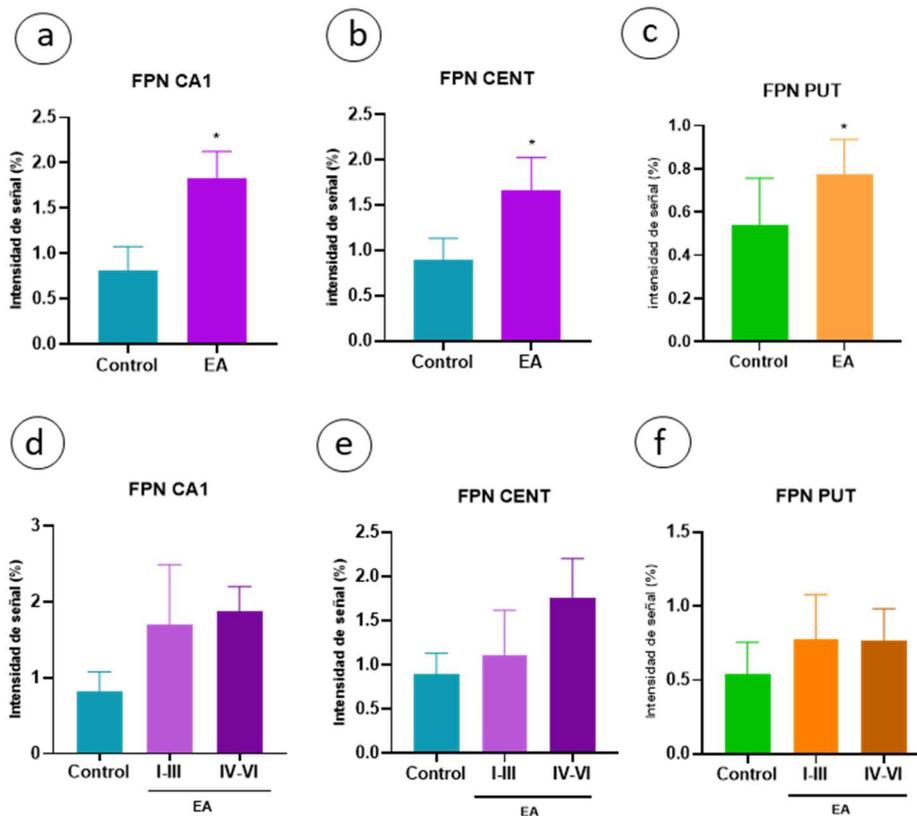
A nivel celular, la FPN se encuentra principalmente en neuronas apareciendo, aunque de forma escasa, en el citoplasma y también en las expansiones de éstas (Figura 8 a,b,c). Podemos ver un marcaje claro en las células piramidales de la CA1 y la CENT (Figuras 6, 7 y 8), así como en las neuronas espinosas del PUT (Figuras 8c). También se aprecia marcaje en algunos oligodendrocitos, pero no en los astrocitos. Las células endoteliales tampoco fueron positivas para la FPN. Por último, también se ha encontrado marcaje en los endotelios del cuarto ventrículo y en los plexos coroideos cerca del hipocampo, lo que concuerda con la función de transporte de hierro de esta proteína (Figura 8d).



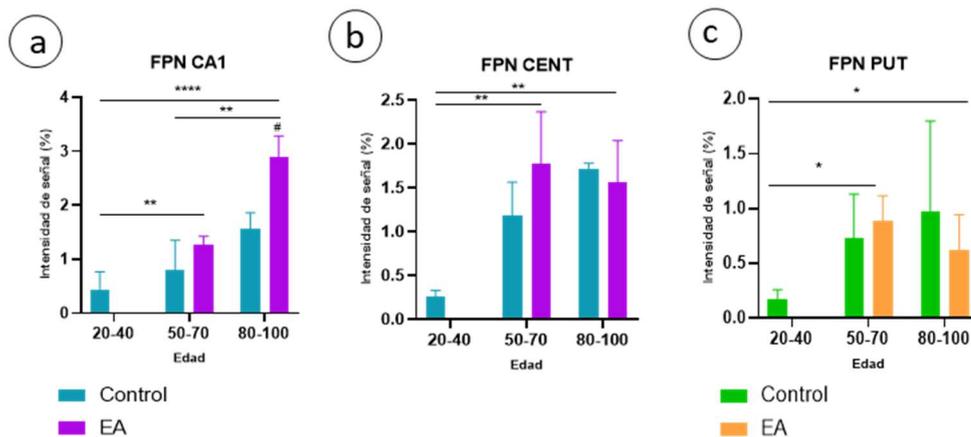
**Figura 8.-** Inmunohistoquímica de FPN revelada con DAB. Contraste nuclear en azul con tiónina. Detalle de marcaje celular. (a) CA1 de una mujer con EA en estadio IV de Braak tomado a un aumento de 40x. (b) CA1 de una mujer control de 71 años tomada a un aumento de 40x. (c) PUT de un hombre control de 19 años tomado a un aumento de 40x. (d) Cuarto ventrículo a nivel de los ganglios basales de una mujer de 71 con EA en estadio de Braak II a 40x. Flecha amarilla señala los endimocitos con marcaje positivo para FPN. Barra de calibración: 30  $\mu$ m.

La cuantificación densitométrica de la señal IHQ de la FPN demostró una diferencia significativa entre los sujetos control y aquellos que presentaban EA, tanto en la corteza como en los ganglios basales (Figura 9 a, b, c). Aunque para el GP no disponíamos de la cantidad suficiente de casos para el cálculo estadístico, los datos mostraron la misma tendencia que las demás áreas estudiadas (Figura S3). Sin embargo, cuando separamos a los individuos afectados por EA en dos grupos de diferente severidad (Braak leve y grave), no aparecían esas diferencias y (Figura 9 d, e, f). Los resultados pusieron de manifiesto que las cantidades relativas de FPN fueron ligeramente mayores en la corteza que en los ganglios basales.

Al separar los casos por grupos de edad (jóvenes, adultos y ancianos), se observó que la cantidad de FPN aumentaba de forma general con la edad, siendo mayor en los pacientes con EA que en los controles; esta tendencia era mucho más clara en el hipocampo que en la CENT y los ganglios basales (Figura 10 a, b, c).



**Figura 9.-** Representación gráfica de la intensidad de marcaje para FPN en las diferentes áreas cerebrales analizadas, zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1), corteza entorrinal (CENT), y putamen (PUT). Las gráficas **a**, **b** y **c** muestran el porcentaje de intensidad de marcaje de FPN medio  $\pm$  SEM de pacientes EA respecto a los controles. En las gráficas **d**, **e** y **f** se representa el porcentaje de intensidad de marcaje de FPN medio  $\pm$  SEM de pacientes EA separados en dos grupos, EA leve (Braak del I-III) y grave (Braak del IV-VI), respecto a los controles. En ambos casos el análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. \*= diferencias estadísticamente significativas versus control \*  $p < 0,05$ .



**Figura 10.-** Representación gráfica de la intensidad de marcaje para FPN en las diferentes áreas cerebrales analizadas, zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1), corteza entorrinal (CENT), y putamen (PUT). Las gráficas **a**, **b**, **c** muestran el porcentaje de intensidad de marcaje de FPN medio  $\pm$  SEM de pacientes EA respecto a los controles separados por grupos de edad, jóvenes (20-40), adultos (50-70) y ancianos (80-100). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de dos factores seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. \*= diferencias estadísticamente significativas entre grupos de edad \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,001$ . #= diferencias estadísticamente significativas EA versus control #  $p < 0,05$ .

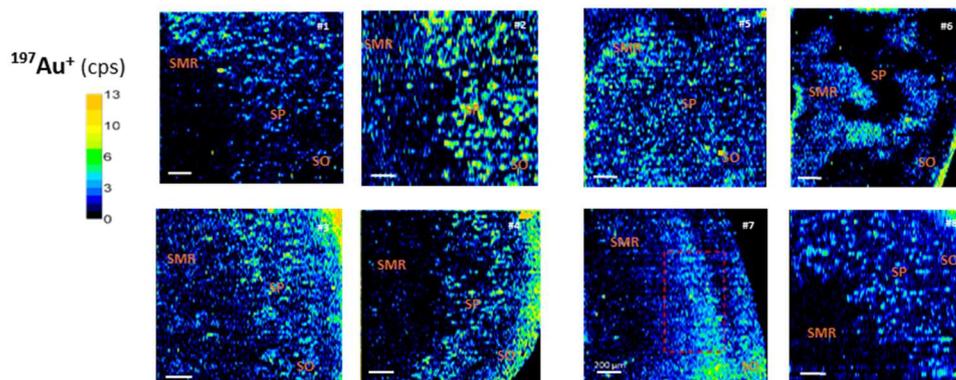
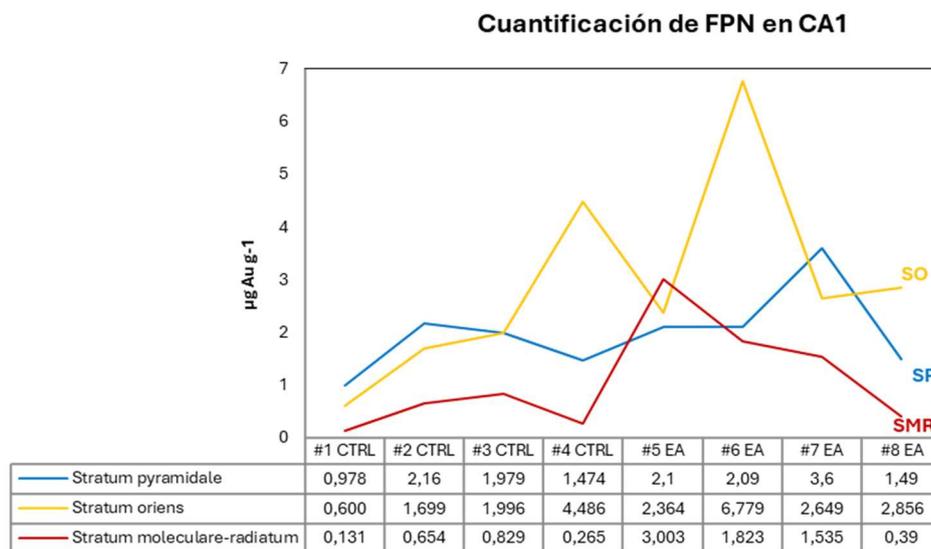
La FPN es una proteína transmembrana que se encuentra en la mayoría de las células del SN de mamíferos, y cuya función es la de transportar el hierro desde las células que lo almacenan hacia la sangre para optimizar la homeostasis sistémica del mismo. Sin embargo, no existe consenso respecto a su expresión durante el envejecimiento y la EA (Bao et al., 2021; Raha et al., 2013; Wu et al., 2004).

En los últimos años, se ha descrito una elevada cantidad y una amplia distribución de la FPN en el SN tanto en humanos como en roedores. Así, mediante IHQ e hibridación *in situ*, se ha observado que ésta se expresa ampliamente en todo el cerebro, en especial en la CENT y el hipocampo, al igual que mostramos en nuestro trabajo (Li et al. 2011; McAllum et al. 2020). La FPN en el cerebro de roedores se presenta en neuronas, oligodendrocitos, células endoteliales de vasos sanguíneos y células epiteliales del plexo coroideo, demostrando la gran importancia de este transportador del hierro tanto en adultos como en postnatales (Li et al., 2011; Moos & Nielsen, 2006; Wu et al., 2004; Wu et al., 2022). Nuestras observaciones han demostrado marcaje también para la FPN en los endimocitos y plexos coroideos pero en especial en las neuronas piramidales y sus expansiones dendríticas, lo que coincide con los resultados de otros autores en roedores y humanos (Li et al. 2011; Raha et al. 2013). La localización de la FPN en las células endimarias y del plexo coroideo sugiere que la FPN exporta hierro desde el parénquima cerebral hacia el LCR, regresando finalmente a la circulación sistémica (Wu et al., 2004). Aunque no es nuestro caso, otros autores han descrito la presencia de FPN en las células endoteliales del estriado, tálamo y cerebelo de ratón, donde es probable que sirva como transportador molecular del hierro en la membrana abluminal de las células endoteliales polarizadas (Wu et al., 2004).

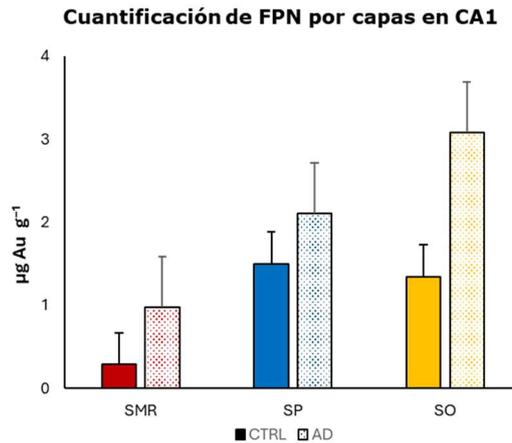
Por otro lado, los resultados de la IHQ, es decir, el aumento de los niveles de la FPN en la EA y durante el envejecimiento, concuerdan con los datos anteriormente publicados por nuestro grupo (Cruz-Alonso et al. 2019), y difieren de los que publicados por Lu y colaboradores sobre la existencia de una disminución significativa en la expresión de FPN en la corteza y el hipocampo de cerebros con EA (Lu et al. 2017).

A continuación, y para llevar a cabo una cuantificación más precisa de la FPN, utilizamos la técnica LA-ICP-MS. Ésta nos permitió, mediante el uso de un anticuerpo anti-FPN marcado con nanoclusters de oro (AuNC), obtener información sobre la situación y la cantidad promedio de esta proteína en las capas SMR, SP y SO de la región CA1 del hipocampo, tanto en controles como pacientes con EA. Por motivos técnicos, de tiempo y de presupuesto, se utilizaron ocho de los casos, 4 casos control y 4 con EA (véase la tabla II de material y métodos).

La concentración de FPN, expresada en  $\mu\text{g Au}\cdot\text{g}^{-1}$ , se calculó para el área CA1 separando los datos de cada capa, como se realizó con el hierro. Los valores generales obtenidos oscilaron entre 1,79 y 6,2  $\mu\text{g Au}\cdot\text{g}^{-1}$  en controles y 4,7-10,7  $\mu\text{g Au}\cdot\text{g}^{-1}$  en pacientes con EA. Al igual que para el hierro, parece haber una ligera tendencia a que la FPN aumente en la EA (controles  $4,3\pm 1,2$  y EA  $7,7\pm 1,6$ ) aunque con esta técnica y tan pocos casos la diferencia no llega a ser significativa (Figura 11). Además, tal y como se vio con la IHQ tradicional, la FPN no muestra una distribución uniforme en las diferentes capas de CA1 (ver Figuras 6 y 7). La mayor cantidad de FPN parece acumularse en SO y SP en comparación con SMR (Figura 12).

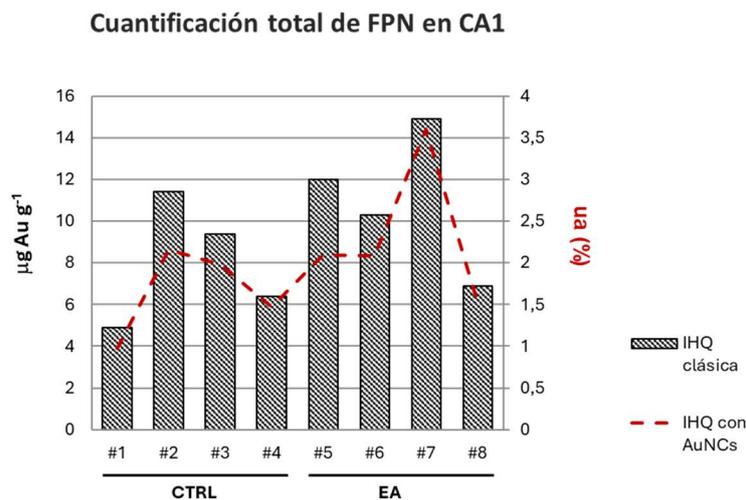


**Figura 11.-** El gráfico de líneas corresponde a la concentración promedio de ferroportina (FPN) medida a través de los nanoclusters de Au (AuNCs) obtenida en tres regiones del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1): rojo: estrato molecular-radial (SMR), azul: estrato piramidal (SP) y amarillo: estrato oriens (SO) de controles (CTRL) (donantes #1, #2, #3 y #4) y pacientes con EA (donantes #5, #6, #7 y #8) en tejidos cerebrales humanos mediante LA-ICP-MS (expresado como  $\mu\text{g Fe por g}$  de tejido). Debajo se muestran las imágenes cuantitativas del hierro obtenidas tras la ablación del tejido. Cps: cuentas por segundo. Barra 100  $\mu\text{m}$ .



**Figura 12.-** Cuantificación de la ferroportina (FPN) en cada capa del Cornu Ammonis1 del hipocampo obtenida con LA-ICP-MS. En colores sólidos los controles (CTRL) y en punteado las muestras de pacientes con EA. Rojo: estrato molecular-radial (SMR), azul: estrato piramidal (SP) y amarillo: estrato oriens (SO).

Por último, se llevó a cabo una comparación entre las concentraciones promedio de la FPN, obtenidas en CA1 de los mismos individuos y con ambas técnicas, IHQ y LA-ICP-MS. Los datos obtenidos, aunque en un caso absolutos (LA-ICP-MS) y en el otro relativos (densidad de marcaje con IHQ), presentan una gran similitud de comportamiento, lo que demuestra su utilidad para estudios de esta naturaleza (Figura 13).



**Figura 13.-** Concentración promedio de FPN obtenida en la región CA1 de controles (donantes #1, #2, #3 y #4) y pacientes con EA (donantes #5, #6, #7 y #8). El eje de la izquierda muestra los valores obtenidos mediante LA-ICP-MS (expresado como µg de Au por g de tejido). El eje de la derecha recoge la cuantificación densitométrica de FPN (expresada como unidades arbitrarias de marcaje) obtenida mediante un protocolo tradicional de inmunohistoquímica con DAB.

La localización de FPN ha sido descrita en neuronas, astrocitos, células endoteliales de vasos sanguíneos y células epiteliales del plexo coroideo, mientras que su ARNm ha sido detectado solo en vasos sanguíneos, lo que implicaría que el hierro se transporta del torrente sanguíneo al cerebro (Wu et al., 2004). Nuestras observaciones han demostrado marcaje para la FPN en las neuronas piramidales y sus expansiones dendríticas, lo que coincide con las observaciones de otros autores tanto en humanos como ratones (Raha et al. 2013). Según éstos, la disfunción o falta de expresión de la FPN en la EA y en el envejecimiento sería la causante del aumento de hierro intracelular en estas neuronas lo que causaría su degeneración y muerte, posiblemente por un mecanismo de ferroptosis (Raha-Chowdhury et al., 2015).

En este sentido, los datos provenientes de la cuantificación con LA-ICP-MS demostraron no ser concluyentes para CA1, aunque los valores de la FPN en las diferentes zona, fueron siempre mayores en la EA; la cuantificación del marcaje IHQ de la FPN de controles frente a pacientes de EA si resultó significativa. Es posible que las diferencias se deban a las características de las técnicas y al número de casos usados. No obstante, nuestros resultados contrastan con la bibliografía consultada ya que, al contrario de lo que hemos encontramos nosotros, predomina la idea de una disminución significativa en el contenido de la FPN con la edad y en la EA. Raha y colaboradores encontraron menores niveles de la proteína en lisados del hipocampo humano en comparación con otros de su misma edad (Raha et al. 2013). Los mismos autores determinaron, posteriormente, que existe una menor cantidad de FPN y de su ARNm en el hipocampo y en el estriado de los pacientes de EA respecto a controles (Raha et al. 2022). Por otra parte, una expresión de FPN regulada a la baja también se ha descrito en cerebros de ratones PPA<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> y en ratones PPA/PS1 modelos experimentales de EA (Shen et al. 2018; Xian-Hui et al. 2015). Bao y colaboradores revelaron, a su vez, que la eliminación genética de la FPN en las neuronas principales de la neocorteza y el hipocampo podría provocar atrofia del hipocampo y déficits de memoria similares a los de la EA (Bao et al. 2021). Además, la falta de expresión de la FPN en las neuronas de la neocorteza e hipocampo de los ratones NEXCre provocaba una atrofia similar a la descrita en la EA, sumada a un deterioro cognitivo (Wang et al. 2019). Hasta nuestro conocimiento, existe solo una publicación en la que no se aprecian cambios significativos en la expresión de la FPN en la corteza y el hipocampo durante el envejecimiento en el cerebro de ratón, lo cual llevó a postular que la FPN no estaría implicada en la creciente cantidad de hierro almacenada en el cerebro con la edad (Lu et al. 2017).

La disminución de la FPN podría justificarse de varias formas. En una primera hipótesis la regulación a la baja de la FPN en el envejecimiento, provocaría una deficiencia de la eliminación de hierro, el cual se acumularía en ciertas regiones del cerebro y produciría la enfermedad (Zou et al. 2024). En una segunda hipótesis lo que ocurriría es que durante el avance de la EA, la inflamación, el estrés oxidativo, el daño neuronal y la formación de placas influirían en una desregulación general de la exportación del hierro y, por ello, acabaría acumulándose en altas cantidades. La disminución de la FPN en la EA y en el envejecimiento sería la causante del aumento del hierro intracelular en las neuronas, lo que llevaría a su degeneración y muerte posiblemente por ferroptosis (Bao et al., 2021; Wang et al., 2022). En el trabajo realizado por Bao y colaboradores se reportó que la pérdida de la FPN se relacionaba con un deterioro cognitivo, aunque no estudió si existía relación con los estadios de Braak (Bao et al., 2021).

Como decíamos, en nuestro caso, la cuantificación de la FPN y el estudio comparativo entre controles y pacientes con EA demostró un aumento del transportador, no ligado al estadio de Braak, pero si a la edad del individuo. Estos resultados discrepan de los obtenidos hasta ahora. En este sentido, hay que señalar que existen pocos trabajos en humanos y, aunque las zonas analizadas son similares, la metodología utilizada no ha sido la misma. Aun teniendo en cuenta que es posible que necesitemos un mayor número de casos, las medidas de la FPN mediante IHQ y LA-ICP-MS en los mismos casos arrojaron los mismos resultados.

Resulta difícil darle una explicación al incremento de los niveles de la FPN en la EA y con la edad, ya que lo más lógico sería pensar que la causa del acumulo del hierro intracelular se debe a un fallo o a la regulación a la baja de este exportador en la membrana celular. Sin embargo, se ha demostrado que la regulación de la expresión de la FPN es complicada y que ésta está sujeta a un multicontrol transcripcional, postranscripcional y traduccional (Gammella et al. 2021).

De todas las vías conocidas de la regulación del hierro intracelular en el SN en condiciones no patológicas, destaca la “regulación postranscripcional mediada por IRP/IRE”. En condiciones de baja disponibilidad de hierro, las IRP se unen a los IRE bloqueando la traducción del ARNm de la FPN. Esto reduce la síntesis de la FPN y, por lo tanto, disminuye la salida de hierro desde las células. Cuando los niveles de hierro intracelular son altos, las IRP no se unen a los IRE, permitiendo la traducción del ARNm de la FPN y aumentando la síntesis de la FPN, facilitando la exportación de hierro (Gammella et al. 2021). Si esto es así en cultivos celulares y de forma sistémica, cabe pensar que también puede repetirse en las células nerviosas humanas. Por tanto, el exceso de hierro extracelular e intracelular

acumulado durante el envejecimiento y en la EA, lo que debería de traer consigo es una traducción de la FPN y un aumento de la proteína en la membrana de las células, justamente lo que nosotros hemos observado.

Existe también una “regulación de la expresión de la FPN por la HPC”, que es esencial para el control de la reserva sistémica de hierro. La HPC se une al dominio extracelular de la FPN en la superficie celular, lo que lleva a su internalización y degradación, previniendo eficazmente la exportación de hierro celular y limitando la cantidad de hierro que ingresa al suero o al líquido extracelular. El mecanismo basado en la interacción entre la FPN y la HPC que conduce, por ejemplo, a una hipofeemia en la inflamación, se considera el principal regulador de la liberación de hierro, como lo demuestra la hipofeemia presente en ratones *knock out* para la HPC (Gammella et al. 2021). La pregunta es ¿Cuán fuertes e importantes son las contribuciones de cada una de estas vías al control de la expresión de FPN en el sistema nervioso y especialmente en la EA?

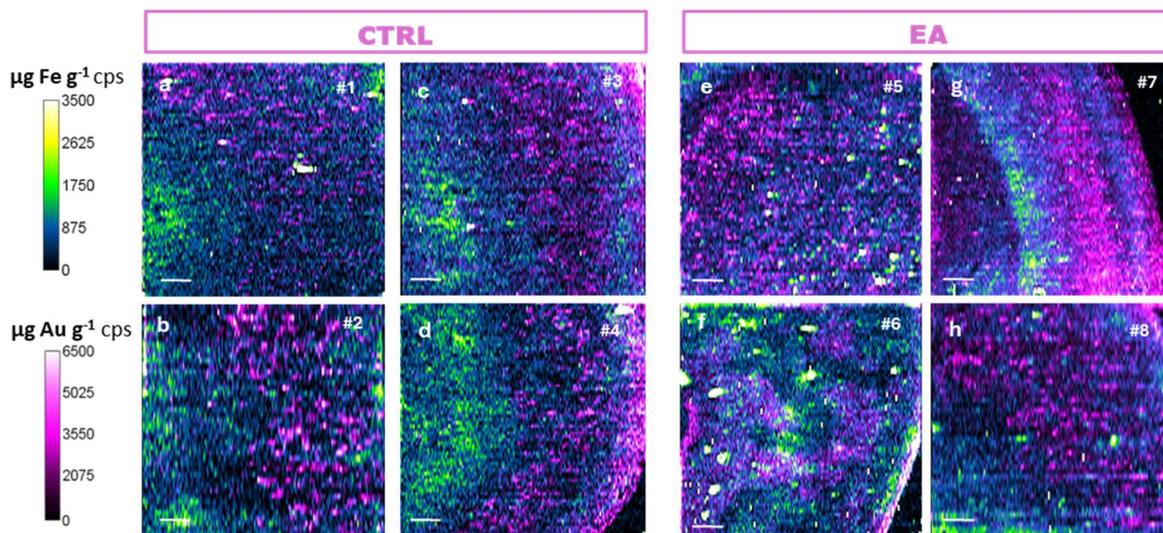
La evidencia acumulada sugiere que la expresión reducida de la FPN podría ser inducida por vías dependientes e independientes de HPC en estos trastornos. Además, la presencia de las dos vías indica que la unión de la HPC con la FPN no es la única forma de controlar o mantener el equilibrio de hierro en el cerebro, y que la expresión de la FPN no solo está relacionada con cambios en la HPC, sino que también está asociada con otros factores (Qian et al., 2023) .

Nosotros proponemos que, efectivamente, durante el envejecimiento y en la EA se produce un desbalance de la cantidad de hierro que se acumula en el sistema nervioso, tanto en el parénquima extracelular como de forma intracelular. A nivel extracelular, el hierro aumenta alrededor de las células, pero se concentra especialmente cerca de los vasos sanguíneos y en los paquetes de fibras mielínicas. A nivel intracelular, la mayor cantidad de hierro disponible en el citoplasma neuronal regularía al alza la expresión de la FPN mediante la vía de las proteínas reguladoras (IRP), lo que sería un tipo de reacción celular de defensa ante la entrada de hierro desde el LI, donde se estaría acumulado a la espera de salir del cerebro vía sanguínea, glinfática o hacia el LCR.

#### **4.4.- La mayor cantidad de hierro en la CA1 del hipocampo no se correlaciona con una mayor cantidad de FPN en la enfermedad de Alzheimer**

La técnica de LA-ICP-MS y el tratamiento de los datos, nos ha permitido correlacionar la localización del hierro y de la FPN en la región CA1 hipocampal mediante la superposición de las señales obtenidas de la misma muestra para  $^{56}\text{Fe}^+$  y  $^{197}\text{Au}^+$  (Figura 14). La distribución del hierro se corresponde con la

escala verde y amarilla, mientras que la de la FPN con la morada. En la observación de las muestras de superposición 2D, se hace evidente que existe una escasa relación entre las señales de hierro y de la FPN (Figura 14). Así, el análisis demostró que mientras que el hierro se localiza en las capas más bajas de la CA1 del hipocampo, la FPN se localiza en las más altas, coincidiendo con las capas neuronales. En la EA, las capas de CA1 se desdibujan y la organización de hierro y la FPN también (Figura 14 b, d, f, h).



**Figura 14.-** Imágenes de la distribución de  $^{56}\text{Fe}+$  y  $^{197}\text{Au}+$  (FPN) obtenidas mediante LA-ICP-MS de la región CA1 del hipocampo de tejidos cerebrales humanos control (CTRL) y con EA después de una inmunohistoquímica con un bioconjugado de AuNC para FPN. La distribución de ambos elementos se superpuso con fines comparativos. (a, c, e, g) control (casos #1, #2, #3, #4) y (b, d, f, h) EA (casos #5, #6, #7, #8). Barra 100 micras. Cps: cuentas por segundo. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

La discrepancia en la localización de la FPN y el hierro en la región CA1 del cerebro sugiere que hay poca acumulación de hierro dentro de las neuronas. Esto puede ser debido a que la FPN, como exportador de hierro, facilitaría la liberación del metal hacia el espacio extracelular. Una vez en el líquido tisular, este ion puede seguir diversas rutas para ser eliminado al plasma sanguíneo. Sin embargo, en la EA, se observa un aumento considerable de hierro en todas las capas del tejido cerebral, especialmente en la capa de células piramidales, a pesar de una mayor cantidad de la FPN. Aún no está claro si este aumento de hierro se debe a una acumulación dentro de las células o en el espacio intercelular.

Se ha propuesto un modelo en el que habría una "vía de absorción celular" del hierro, la ruta principal, y también una "vía de absorción no celular", es decir, una ruta de derivación por la que una pequeña

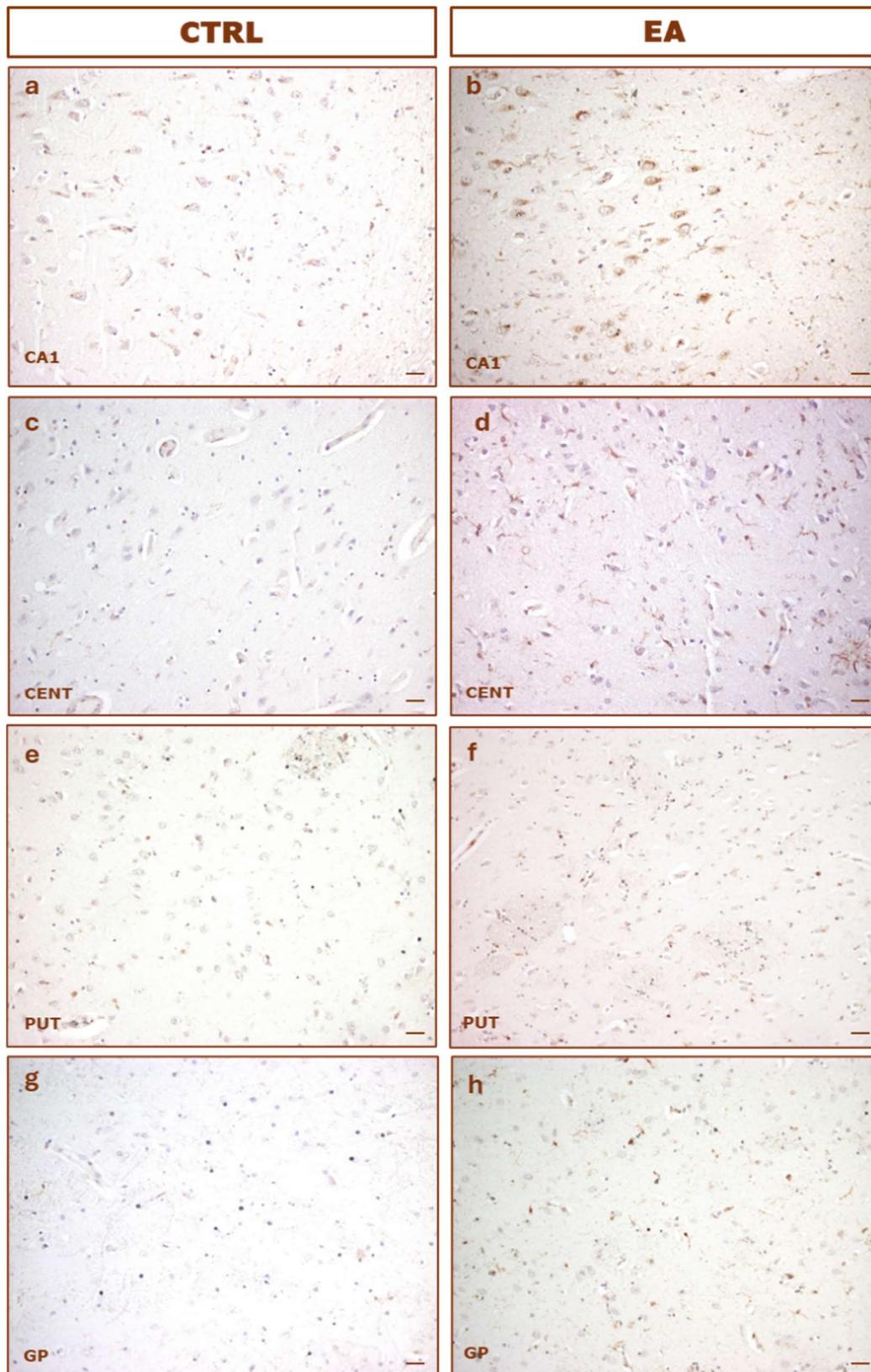
cantidad de hierro no sería absorbida por ninguna célula cerebral y saldría directamente del cerebro con relativa rapidez. Ya que, en condiciones fisiológicas, la cantidad de este ion en la “ruta de derivación” es muy pequeña, la proporción de hierro aumentaría gradualmente en el cerebro con la edad (Du et al. 2015).

El hecho de que no exista colocalización entre las zonas con mayor cantidad del exportador y aquellas con más hierro, en los controles de la CA1, podría interpretarse como que la vía de entrada y salida celular mantiene la homeostasis a nivel neuronal y que el hierro seguiría la ruta de derivación. Parece convincente pensar que, en aquellos lugares donde se expresa este transportador celular, la cantidad de hierro intracelular tiende a ser menor y que el hierro exportado al neuropilo se mueve a las zonas de la corteza donde será drenado hacia los vasos profundos, al LCR por las vellosidades aracnoideas o por otras rutas no completamente conocidas. Por tanto, además de la hipótesis que explica que la cantidad de hierro absorbida por las células está determinada por la expresión de las proteínas importadoras o exportadoras del mismo en la membrana, y no por la cantidad de hierro disponible que ingresa al cerebro, existe otra que supone un desbalance del flujo constante de hierro en cerebro, con mayor entrada y menor salida del hierro. Según esta teoría, las células nerviosas irían incorporando poco a poco, y de forma pasiva, este exceso de hierro y, por tanto, regulando al alza la expresión de la FPN en el envejecimiento y en la EA, como hemos comentado anteriormente.

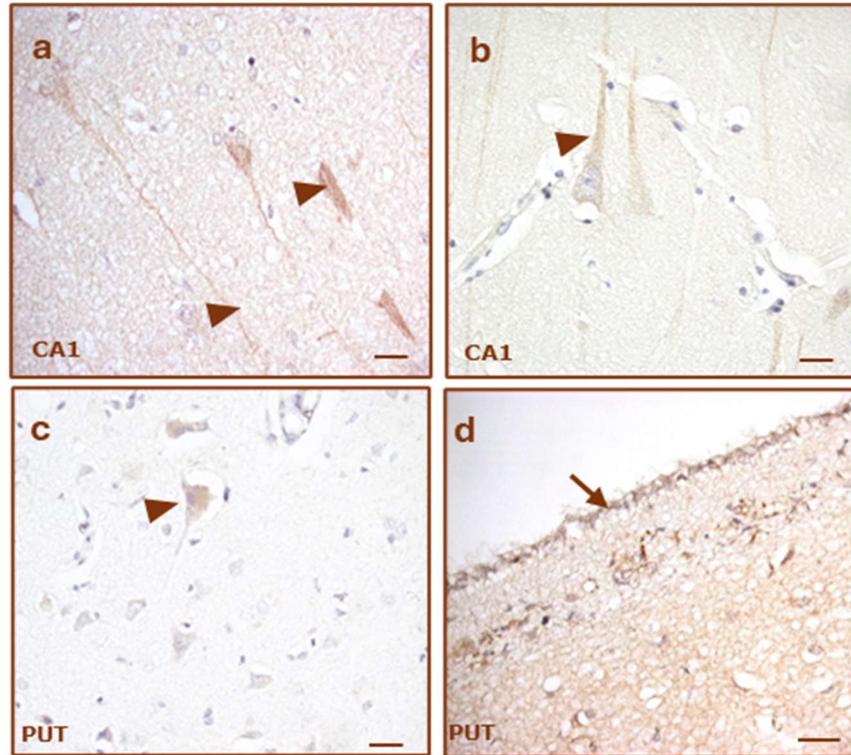
Por otra parte se ha descrito, utilizando diversas técnicas (histológicas, RMN, etc), que la cantidad de hierro es mayor en la sustancia blanca que en la sustancia gris de la corteza (Bulk et al. 2018). Esta afirmación ha sido justificada en los casos control como un reflejo del papel del ion en la síntesis y mantenimiento de la mielina. El hierro se encontraría en forma de depósitos de ferritina en los oligodendrocitos de las zonas cercanas a los lugares de mielinización. Esto justificaría la escasa cantidad de FPN en la capa SMR respecto a la neuronal. Además, que el hierro aumente en la EA y que lo haga en mayor medida en la zona cercana a la sustancia blanca (la que corresponde a SMR) podría explicarse debido a la pérdida de las prolongaciones mielínicas que se ha descrito en el EA y el envejecimiento (Peters and Rosene 2003). La pérdida de neuritas y la ruptura de las vainas de mielina puede producir un estado de retroceso en la mielinización por parte de los oligodendrocitos, con la aparición de figuras de mielina y el acúmulo de hierro extracelular en forma de hemosiderina.

#### **4.5.- La expresión de la HPC aumenta en la corteza temporal y los ganglios basales con la edad, pero no en la enfermedad de Alzheimer**

Teniendo en mente la hipótesis de la desregulación de la vía FPN/HPC en la "sobrecarga de hierro" en la EA, nos propusimos estudiar la presencia de la HPC en las situaciones y áreas cerebrales previamente descritas. Para ello se realizó, en primer lugar, una IHQ para la HPC revelada con DAB en el hipocampo, la CENT, el PUT y el GP. Los resultados mostraron un marcaje intenso en todos los territorios cerebrales muestreados, tanto en los centros superiores como en los inferiores (Figura 15). La señal IHQ aparecía de forma granular sobre todo en las neuronas piramidales, pero de forma más intensa y difusa por el citoplasma de las células de glía, la mayoría identificadas como microglía no activada por su tamaño y morfología (Figura 16 b,c). De esta manera, se observó una menor intensidad de señal para la HPC en la sustancia gris, donde hay más neuronas, y una intensidad mayor en aquellas zonas donde predominaba la sustancia blanca, con más cantidad de células gliales. También es remarcable el marcaje positivo de algunas células perivasculares, posiblemente pericitos, y ependimocitos (Figura 16d).

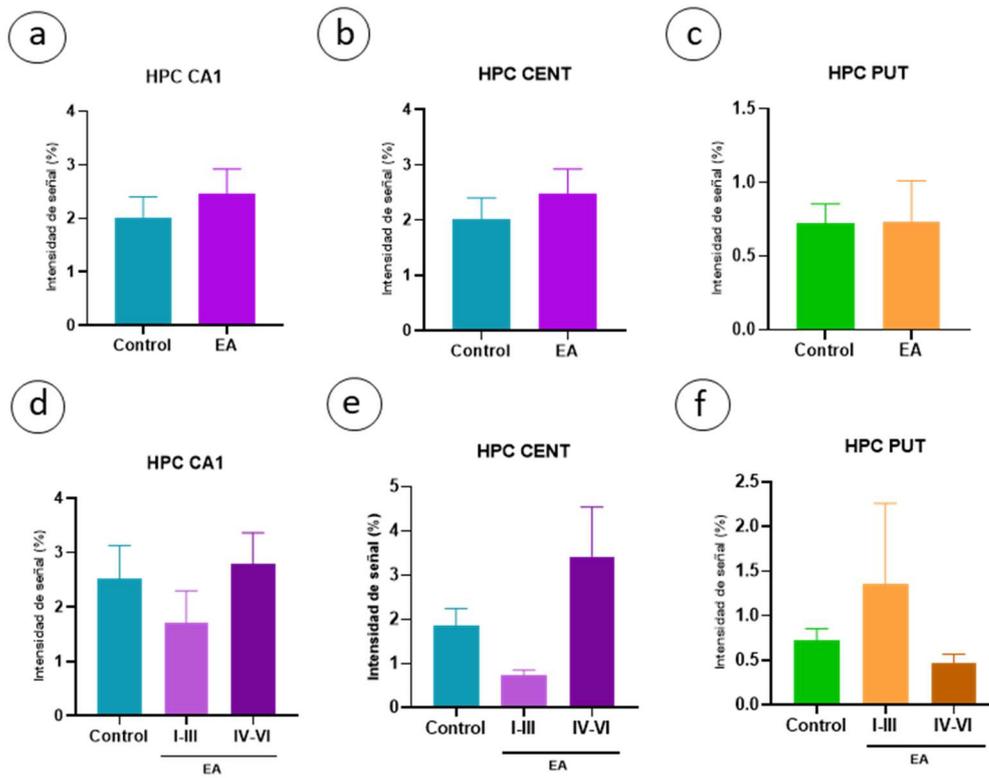


**Figura 14.-** Inmunohistoquímica para la hepcidina (HPC) revelada con DAB en varias zonas del cerebro humano. Contraste nuclear en azul con tionina. Zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1), corteza entorrinal (CENT), globo pálido (GP) y putamen (PUT). (a) CA1 de hipocampo de una mujer control de 57 años. (b) CA1 de hipocampo de una mujer de 76 años con EA en estadio de Braak VI. (c) CENT de una mujer control de 57 años. (d) CENT de un hombre de 61 años con EA. (e) PUT de una mujer control de 68 años. (f) PUT de una mujer de 84 años con EA del estadio Braak III. (g) GP de un hombre control de 19 años. (h) GP de una mujer de 76 años con EA con Braak VI. Todas las imágenes fueron tomadas a un aumento de x20. Barra de calibración: 30  $\mu$ m.

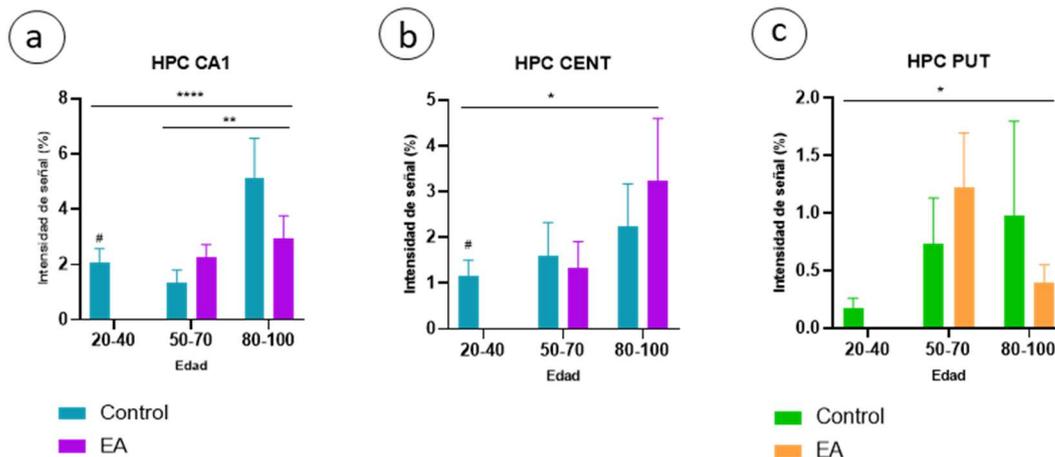


**Figura 15.-** Detalles de la inmunohistoquímica de hepcidina (HPC) revelada con DAB. Contraste nuclear en azul con tionina. **(a)** Neuronas en CA1 de una mujer control de 57 años. Aumento 100x. Nótese el marcaje de forma granular dentro de las células. Barra 10  $\mu$ m. **(b)** Astrocito en CA1 de hipocampo de un hombre control de 41 años. Aumento 100x. Barra 10  $\mu$ m. **(c)** Microglía en PUT un hombre control de 41 años. Tomado a 100x. Barra 10  $\mu$ m **(d)** Cuarto ventrículo en los ganglios basales en un caso de un hombre de 61 años con EA. Tomado a 20x. Barra 30  $\mu$ m.

La cuantificación de la señal IHQ para la HPC, tal y como se puede observar en la Figura 17, no mostró cambios significativos en la cantidad de esta proteína entre los cerebros de pacientes con EA, en ningún estadio ni en ninguna de las áreas estudiadas, respecto a los controles (Figura 17). Sin embargo, en el análisis por grupos de edad se observó un aumento significativo de la expresión de la HPC tanto en los casos control como en los de EA a nivel de la corteza cerebral y el PUT (Figura 18).



**Figura 16.-** Representación gráfica de la intensidad de marcaje para la hepcidina (HPC) en las diferentes áreas cerebrales analizadas, zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1), corteza entorrinal (CENT), y putamen (PUT). Las gráficas **a, b y c** muestran el porcentaje de intensidad de marcaje de HPC medio  $\pm$  SEM de pacientes EA respecto a los controles. En las gráficas **d, e y f** se representa el porcentaje de intensidad de marcaje de HPC medio  $\pm$  SEM de pacientes EA separados en dos grupos, EA leve (Braak del I-III) y grave (Braak del IV-VI), respecto a los controles. En ambos casos el análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni.



**Figura 17.-** Representación gráfica de la intensidad de marcaje para hepcidina (HPC) en las diferentes áreas cerebrales analizadas, zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1), corteza entorrinal (CENT), y putamen (PUT). Las gráficas **a, b, c** muestran el porcentaje de intensidad de marcaje de HPC medio  $\pm$  SEM de pacientes EA respecto a los controles separados por grupos de edad, jóvenes (20-40), adultos (50-70) y ancianos (80-100). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de dos factores seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. \*= diferencias estadísticamente significativas entre grupos de edad \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . #= diferencias estadísticamente significativas EA versus control #  $p < 0,05$ .

A nivel sistémico la HPC, sintetizada en el hígado, regula la homeostasis del hierro controlando su flujo desde el duodeno al plasma. Cuando los niveles de la HPC son bajos se produce sobrecarga de hierro, mientras que los niveles altos causan anemia o inflamación al restringir la absorción intestinal de este ion y su liberación asociada a los macrófagos (Raha et al. 2021). Además de los niveles de hierro circulante, la inflamación es otro factor que regula la transcripción de la HPC en los hepatocitos; las citocinas proinflamatorias disparan la expresión de HPC a nivel sistémico (Vela 2018).

Se sabe poco sobre el origen de la HPC en el SN, ya que aunque se han encontrado cantidades importantes en el cerebro de mamíferos, su expresión podría ser sistémica y llegar al tejido nervioso a través del endotelio (Raha-Chowdhury et al., 2015). Así, el ARNm de la HPC ha sido detectado en varias regiones del cerebro, incluida la corteza, el hipocampo, la amígdala, el tálamo, el hipotálamo, el bulbo olfatorio, el mesencéfalo, el cerebelo, la protuberancia y la médula espinal, aunque en niveles bajos comparados con los de su proteína (Zechel and Huber-Wittmer 2006). También se demostró una distribución amplia del ARNm de la HPC en el cerebro de roedores que además resultó aumentar con la edad (Urrutia et al. 2013). En base a la disparidad entre los niveles de transcripción del gen de la HPC y el contenido de la proteína, y los hallazgos en el cerebro de ratones con inhibición sistémica de la HPC, se ha sugerido que la HPC cerebral se debe en parte a la producción *in situ* pero también a su síntesis fuera del cerebro de forma sistémica (Du et al. 2015; Qian and Ke 2020; Ruma; Raha-Chowdhury et al. 2015). Algunos autores han encontrado que la HPC aparece en los cerebros humanos dentro de macrófagos que bordean los vasos y los ventrículos, pero no en la microglía activada. Esto parece apuntar a una entrada de la HPC desde el plasma (Raha et al. 2021). También podría ser que la HPC expresada por las células nerviosas suministradoras, pudiese ser transportada a otras células diana de forma paracrina, o que simplemente pudiese desempeñar un papel autocrino para controlar el equilibrio del hierro local (Nemeth and Ganz 2021; Yanase et al. 2020).

Como se ha comentado anteriormente, se sabe que en condiciones fisiológicas y en la mayoría de las células, la HPC es capaz de unirse a la FPN dando lugar a un complejo proteico sujeto a internalización y degradación lisosomal y que, por tanto, bloquea el flujo de salida de hierro de las células (Yanase et al. 2020). En este sentido, una posible razón que justificaría los niveles elevados de hierro en el cerebro durante el envejecimiento y, particularmente, en la EA podría ser el aumento de los niveles de HPC, ya que, detendría su exportación al neuropilo (Billesbølle et al. 2020). Se ha demostrado mediante inyecciones intracraneales de HPC en roedores o añadiéndola directamente a cultivos

primarios de neuronas, astrocitos y microglía, que ésta puede regular a la baja la expresión de la FPN y como consecuencia aumentar el hierro intracelular (Du et al., 2015; Li et al., 2011; Qian et al., 2023b; Raha-Chowdhury et al., 2015). También se ha apuntado que la HPC podría tener un efecto inhibitor en la expresión de otras proteínas encargadas del transporte del hierro (de entrada y salida), como la TfR, lo que produciría la retención del hierro en el citoplasma celular (Du et al. 2015).

El hecho de que la HPC inhiba la liberación de hierro, así como su absorción, tanto en neuronas como astrocitos, sugiere para Qian y Ke la existencia de un “mecanismo de autoprotección (o defensa) celular mediado por HPC” en el cerebro. De forma que cuando el hierro aumenta, la expresión de HPC también aumentaría, permitiendo a las células cerebrales aislarse del entorno con mayor contenido de hierro y preservar la supervivencia celular (Qian and Ke 2020).

Mediante análisis histoquímico de muestras de cerebros humanos tomadas tras la autopsia, Raha y colaboradores demostraron la amplia distribución de la HPC en el cerebro humano normal y su colocalización con la FPN en neuronas y astrocitos. También describieron que la HPC se reducía a zonas del neuropilo, vasos sanguíneos, neuronas dañadas y procesos neuríticos anormales en la EA (Raha et al. 2013). De hecho, se encontró que los niveles proteicos de HPC y FPN se reducían significativamente en lisados *post-mortem* de hipocampo de pacientes con EA (Raha-Chowdhury et al., 2015; Raha et al., 2013a) posiblemente como resultado de su descomposición lisosomal. Otra explicación podría ser que la disminución sea secundaria y esté relacionada con el daño neuronal sufrido durante la EA.

Basándose en datos de cuantificación de la proteína HPC o de su ARNm en lisados de cerebro, otros autores han reportado que la HPC mostró una regulación positiva de 2,4 veces en las muestras de estadio III-VI Braak en comparación con los controles de Braak en estadio I y II y con demencia sin EA (Chaudhary et al. 2021). Los autores lo explican por una activación de la microglía inducida por Tau y A $\beta$  en los cerebros de EA, que aumentaría la síntesis y secreción de IL-6 en el estadio III-VI de Braak, lo que resultaría en una regulación positiva de la HPC (Chaudhary et al. 2021). Sería esperable que la regulación positiva de la HPC regulase negativamente la FPN en las células vecinas mediante su actividad paracrina. Sin embargo, no se observaron cambios en la expresión de FPN en las muestras de Braak leve en relación con los controles, aunque sí una disminución significativa de la misma en las muestras de Braak severo, coincidiendo con el aumento de la HPC. En este sentido, parece pertinente comentar un estudio de los niveles de proteínas relacionadas con el metabolismo de hierro, que demostró que los niveles de estas proteínas tienden a ser más altos en el suero de los

pacientes con EA que en los controles, alcanzando significación estadística en los pacientes con EA pura con niveles séricos de HPC tres veces más altos que los controles (Sternberg et al. 2017).

Debido a que la HPC de forma sistémica puede actuar como un péptido antimicrobiano y antiinflamatorio, la inflamación propia de la EA podría ser la causa adicional del aumento de la cantidad de HPC, de la misma forma que ocurre a nivel sistémico (Du et al. 2015). Los niveles de hierro en sangre aumentan la síntesis de HPC por los hepatocitos, mediada por citocinas como la IL-6, por tanto, cabría esperar una mayor concentración de HPC con la progresión de la enfermedad y con la edad, debido al estado de neuroinflamación de la EA (Vela 2018). En este contexto, se ha demostrado que la HPC suprime la respuesta inflamatoria desencadenada por agregados de  $A\beta_{41-42}$  en astrocitos y microglia, reduciendo la expresión y secreción de las citoquinas proinflamatorias, IL-6 y TNF- $\alpha$ , y disminuyendo así el daño oxidativo de las neuronas del hipocampo. Además, la inyección estereotáxica de la HPC suprimió la activación de astrocitos y microglía, así como la inducción de marcadores de estrés oxidativo en las neuronas (Urrutia et al., 2017). Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que la HPC es un agente antiinflamatorio que bloquea las acciones proinflamatorias y prooxidantes del péptido  $A\beta$  en el cerebro, a través de la reducción de la expresión y secreción de TNF- $\alpha$  e IL-6 en ratones (Hofer and Perry 2016; Urrutia et al. 2013).

Nosotros no hemos visto aumentos significativos de los niveles cerebrales de la HPC entre los cerebros control y con EA, para ninguna de las áreas estudiadas, pero si diferencias individuales bastante altas que hacen difícil la obtención de conclusiones significativas. Según hemos observado, la expresión de la HPC en nuestro caso está relacionada con la edad, como también lo está el acumulo de hierro en casi todas las áreas cerebrales, lo que ha sido descrito también anteriormente en el cerebro de ratones envejecidos (Urrutia et al., 2013). Estos datos son más consistentes con la teoría de un aumento de la HPC cerebral dependiente de procesos inflamatorios que de una regulación de la cantidad de hierro intraparenquimal en la EA.

Ciertos hallazgos respaldan la idea de que la disponibilidad de hierro intracelular es crucial para la degradación de FPN mediada por HPC y respaldan un vínculo mecanicista entre la disponibilidad de hierro citosólico y la unión a la HPC. Por el contrario, la quelación del hierro férrico extracelular no alteró la respuesta de FPN después de dos horas de tratamiento con HPC (Lu et al. 2017).

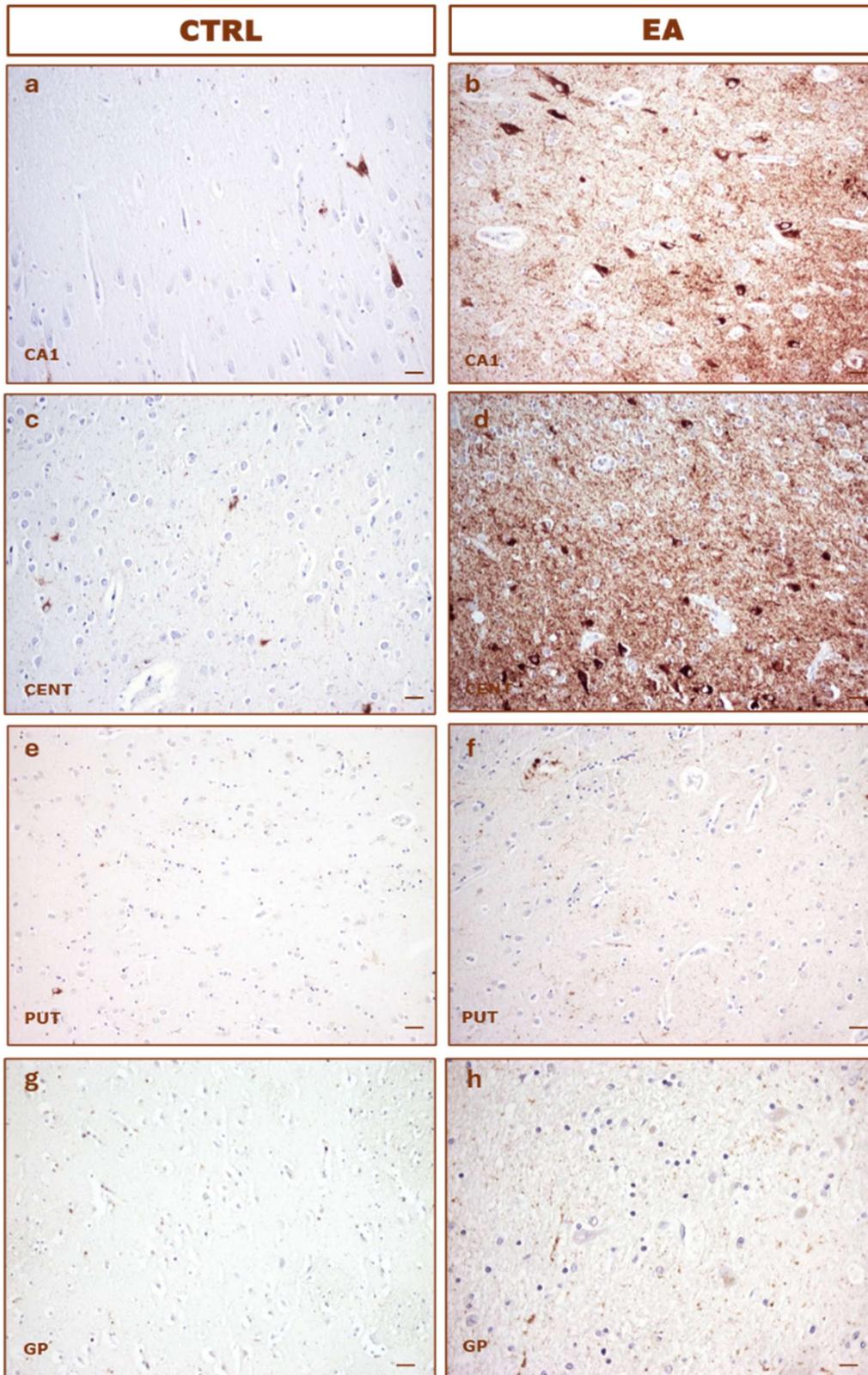
Otros datos sobre la expresión de HPC en neuronas en condiciones basales son contradictorios y aún no se comprenden bien, aunque su expresión se ha observado consistentemente en neuronas

expuestas a estímulos inflamatorios. Sin embargo, la HPC no parece ser importante para la homeostasis del hierro en condiciones basales, ya que los modelos *knock out* de HPC no muestran una sobrecarga cerebral significativa de hierro. Parece que la señalización inflamatoria en el cerebro inclina la balanza a favor de una mayor importación de hierro y secuestro celular de hierro, así la inflamación acompañada del efecto de la HPC al bloquear la exportación de hierro, empeorarían aún más la sobrecarga de hierro observada en las neuronas. Debido a esta aparente contradicción, Vela y colaboradores propusieron un papel dual de la HPC, sugiriendo que la existencia o no de inflamación en el cerebro, es la principal razón de esta contradicción. Plantearon la hipótesis de que el pretratamiento con HPC podría proteger a las células cerebrales del daño oxidativo, mientras que la inducción de HPC durante un proceso inflamatorio aumentaría la lesión neuronal debida al hierro (Vela 2018).

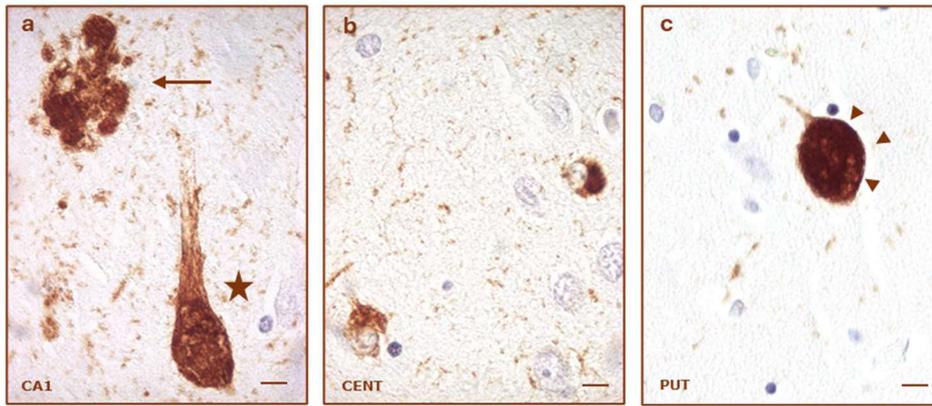
#### **4.6.- Colocalización del hierro, las proteínas transportadoras y los marcadores clásicos de la enfermedad de Alzheimer**

En todo estudio sobre la EA que se precie se hace necesaria una valoración de los marcadores clásicos de la patología, Tau y A $\beta$ , para corroborar el diagnóstico de forma precisa, pero, también, para correlacionar con otros parámetros que puedan estar influyendo en la patología.

En lo que respecta a la proteína Tau, la IHQ para la misma demostró que la proteína Tau fosforilada no aparecía prácticamente en ninguna de las áreas cerebrales analizadas en los individuos control, estando especialmente ausente en los ganglios basales. Sin embargo, el marcaje aumentaba considerablemente en la EA, siendo su cantidad dependiente del grado de Braak (Figura 19 y Figura 21). En concreto, se observó cómo esta proteína estaba presente en los ONF de las neuronas piramidales, así como en las neuritas distróficas del neuropilo y de las que forman parte de las PS en la corteza hipocampal CA1 y en la CENT (Figura 19 a, b, c, d y figura 20 a, b). En los ganglios basales, la cantidad de Tau era baja comparada con los centros superiores, incluso cuando hablamos de casos de EA con un grado alto de Braak (Figura 19). La proteína no aparecía en las neuronas de la zona, sino que se concentraba en las prolongaciones, que posiblemente sean axones de paso. Es frecuente observar grandes prolongaciones axonales en degeneración (Figura 20 c).

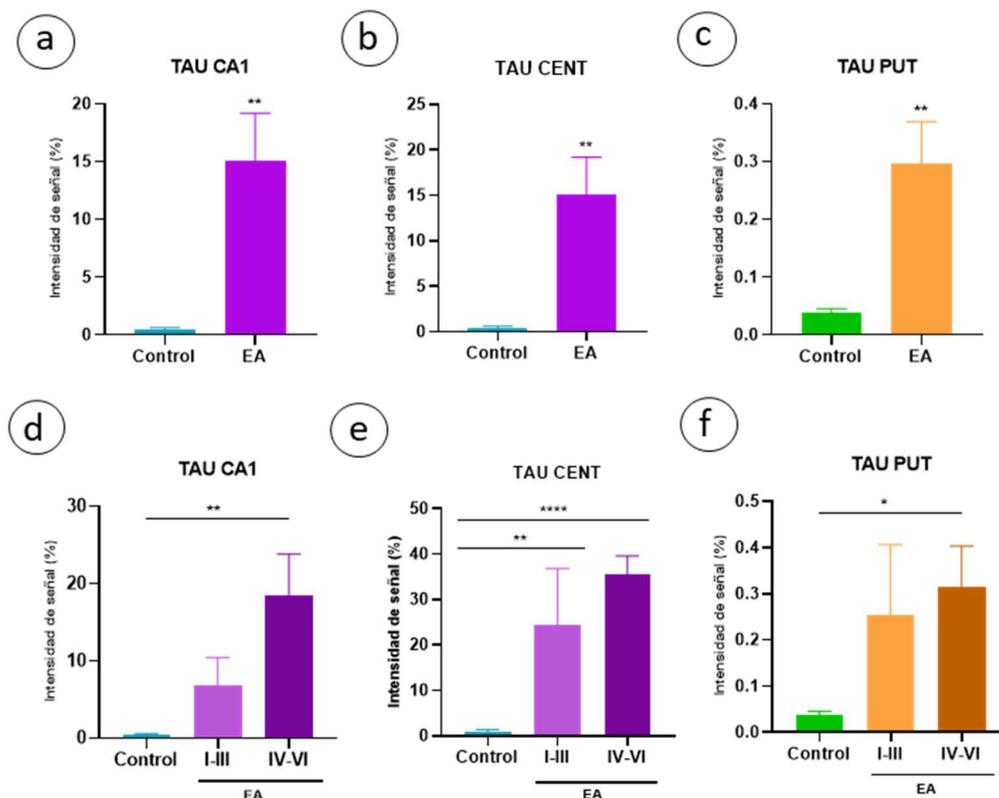


**Figura 18.-** Inmunohistoquímica de Tau revelada con DAB en varias zonas del cerebro humano: Zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1), corteza entorrinal (CENT), globo pálido (GP) y putamen (PUT). Contraste nuclear en azul con tionina. (a) CA1 de hipocampo de un hombre control de 82 años. Aumento de 20x. (b) CA1 de hipocampo de un hombre de 81 años con EA. Aumento de 20x. (c) CENT de una mujer control de 71 años. Aumento de 20x. (d) CENT de una mujer de 81 años con EA Braak V-VI. Aumento 20x. (e) PUT de una mujer control de 68 años. Aumento de 20x. (f) PUT de una mujer de 84 años con EA del estadio Braak III. Aumento 20x. (g) GP de un hombre control de 19 años. Aumento 20x. (h) GP de una mujer de 91 años con EA del estadio Braak V-VI. Aumento 20x. Barra de calibración: 30  $\mu$ m.



**Figura 19.-** Inmunohistoquímica de Tau revelada con DAB en varias zonas del cerebro humano: Zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1), corteza entorrinal (CENT), globo pálido (GP) y putamen (PUT). Contraste nuclear en azul con tiónina. (a) Neurona piramidal con degeneración granulovacuolar (estrella) y neuritas distróficas (flecha) de la CA1 del hipocampo de una mujer control de 100 años tomado a un aumento de 100x. (b) CENT de hipocampo de un hombre de 81 años con EA. Aumento de 100x. (c) PUT de una mujer de 76 años con EA del estadio Braak V-VI. Axón distrófico (cabezas de flecha). Aumento 100x. Barra de calibración: 20  $\mu$ m.

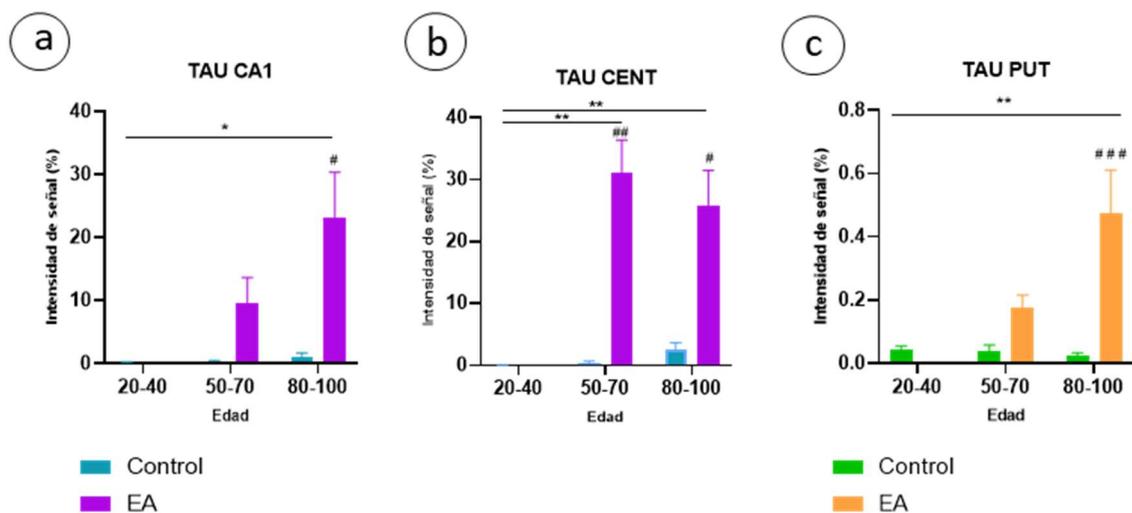
La cuantificación de la señal IHQ de Tau corroboró lo observado en las imágenes, es decir, que existe una mayor cantidad de la proteína ligada a la EA y que ésta aumenta significativamente en relación con los estadios de Braak (Figura 21). Esto se cumple tanto para la corteza como para los ganglios basales, aunque éstos presenten una menor cantidad relativa de Tau.



**Figura 20.-** Representación gráfica de la intensidad de marcaje para Tau en las diferentes áreas cerebrales analizadas, zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1), corteza entorrinal (CENT), y putamen (PUT). Las gráficas a, b y

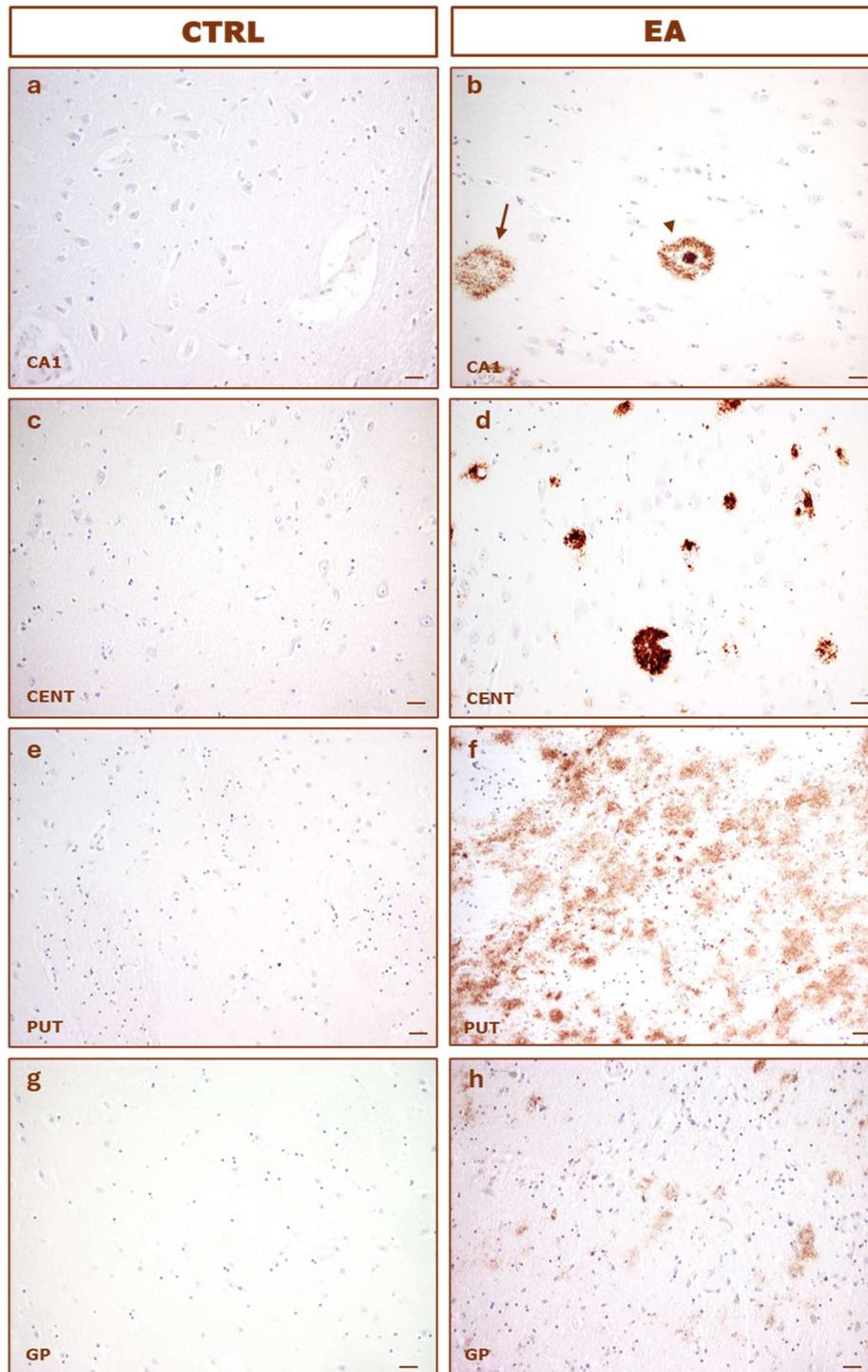
*c* muestran el porcentaje de intensidad de marcaje de Tau medio  $\pm$  SEM de pacientes EA respecto a los controles. En las gráficas *d*, *e* y *f* se representa el porcentaje de intensidad de marcaje de Tau medio  $\pm$  SEM de pacientes EA separados en dos grupos, EA leve (Braak del I-III) y grave (Braak del IV-VI), respecto a los controles. En ambos casos el análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. \*= diferencias estadísticamente significativas versus control \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Cuando se analizó la relación entre la cantidad de Tau y la edad, se observó un aumento significativo de la cantidad de esta proteína con la edad en los pacientes con EA tanto en la CA1 del hipocampo, como la CENT y la PUT (Figura 22).

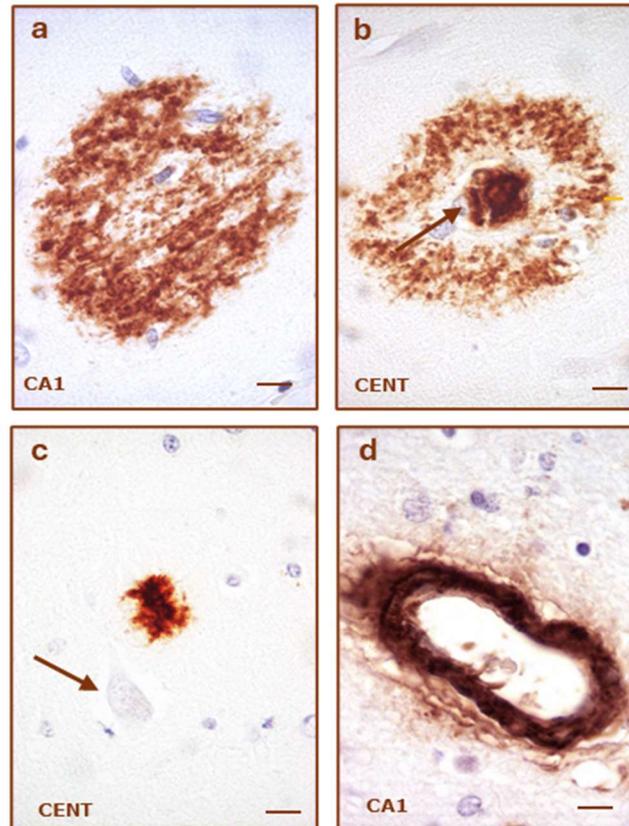


**Figura 21.-** Representación gráfica de la intensidad de marcaje para Tau en las diferentes áreas cerebrales analizadas, zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1), corteza entorrinal (CENT), y putamen (PUT). Las gráficas *a*, *b* y *c* muestran el porcentaje de intensidad de marcaje de Tau medio  $\pm$  SEM de pacientes EA respecto a los controles separados por grupos de edad, jóvenes (20-40), adultos (50-70) y ancianos (80-100). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de dos factores seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. \*= diferencias estadísticamente significativas entre grupos de edad \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . # = diferencias estadísticamente significativas EA versus control #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$ .

En lo que respecta al péptido A $\beta$ , el análisis IHQ demostró marcaje para el mismo en las PS difusas y maduras del neuropilo del hipocampo y la CENT, sobre todo en los casos con EA avanzado. Por el contrario, en los ganglios basales, la proteína se distribuía de forma difusa y no formaba PS con core, ni siquiera en los estadios más avanzados de la patología (Figuras 23 y 24). También se encontró un depósito de A $\beta$  alrededor de vasos sanguíneos de tamaño medio y grande en la corteza de algunos de los casos de EA (Figura 24).

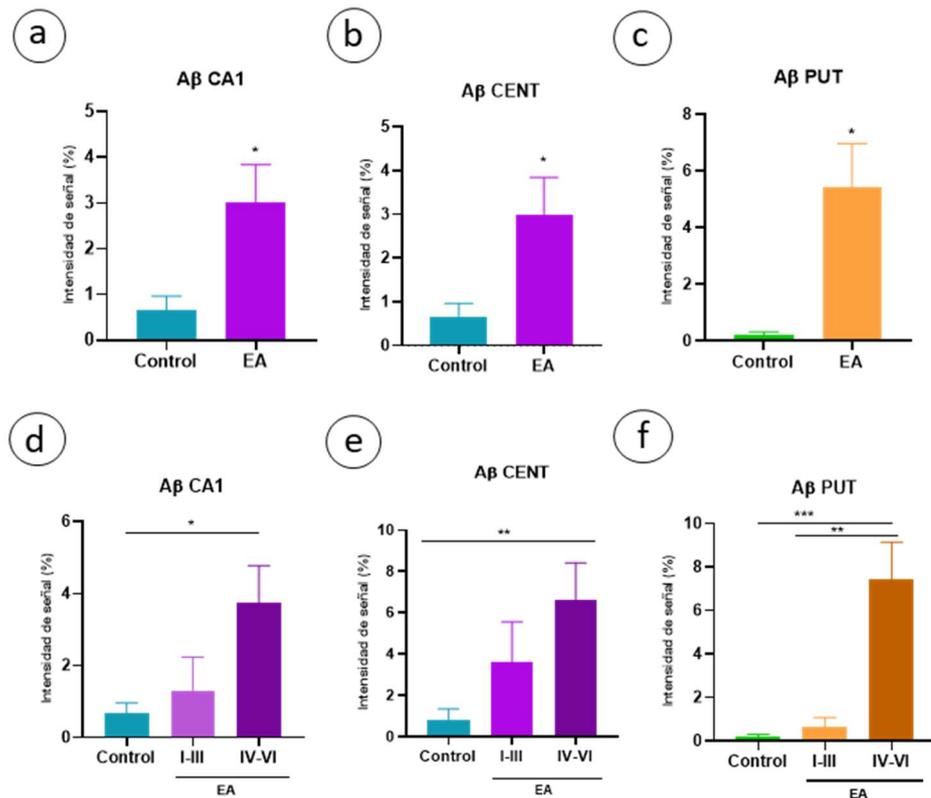


**Figura 22.-** Inmunohistoquímica de A $\beta$  revelada con DAB en varias zonas del cerebro humano: Zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1), corteza entorrinal (CENT), globo pálido (GP) y putamen (PUT). Contraste nuclear en azul con tiónina. (a) CA1 de hipocampo de una mujer control de 57 años. Aumento 20x. (b) Placa senil difusa (flecha) y placa madura (cabeza de flecha) en CA1 de hipocampo de un hombre de 62 años con EA estadio Braak VI. Aumento 20x. (c) CENT de una mujer control de 41 años. Aumento de 20x. (d) CENT de un hombre de 87 años con EA estadio de Braak VI. Aumento 20x. (e) PUT de una mujer control de 68 años. Aumento 20x. (f) PUT de un hombre de 68 años con EA en estadio de Braak VI. Aumento 20x. (g) GP de un hombre control de 19 años. Aumento 20x. (h) GP de una mujer de 91 años con EA con estadio Braak V-VI. Aumento 20x. Barra: 30  $\mu$ m.

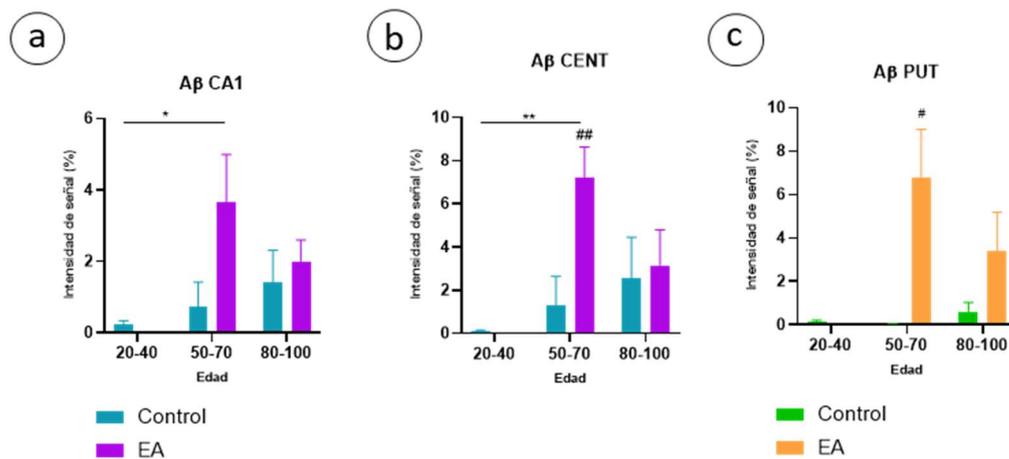


**Figura 23.-** Inmunohistoquímica de A $\beta$  revelada con DAB. Detalles en Zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1) y corteza entorrinal (CENT). Contraste nuclear en azul con tionina. (a) Placa difusa del CA1 del hipocampo de una mujer control de 100 años. Aumento 100x. Barra 30  $\mu$ m (b) Placa madura en el CENT de hipocampo de un hombre de 81 años con EA. Flecha azul marca en "core" de la placa. Aumento 100x. Barra 30  $\mu$ m (c) Deposito de A $\beta$  cerca de una neurona piramidal (cabeza de flecha) en el neuropilo de la CENT de una mujer de 76 años con EA del estadio Braak V-VI. Aumento 100x. Barra 20  $\mu$ m. (d) Deposito perivascular de A $\beta$  en una arteriola del CA1 en un hombre de 68 con EA. Aumento 40x. Barra 20  $\mu$ m.

La cuantificación de la señal IHQ puso de manifiesto una cantidad de A $\beta$  mayor en los casos de EA respecto a los controles en todas las zonas seleccionadas, aumentando en relación con la edad y el estadio de Braak (Figura 25). Por el contrario, no se observó una correlación positiva con la edad en el grupo de control, lo que sugiere que el cambio en la susceptibilidad en estas regiones se debe a cambios patológicos asociados a A $\beta$  (Figura 26).

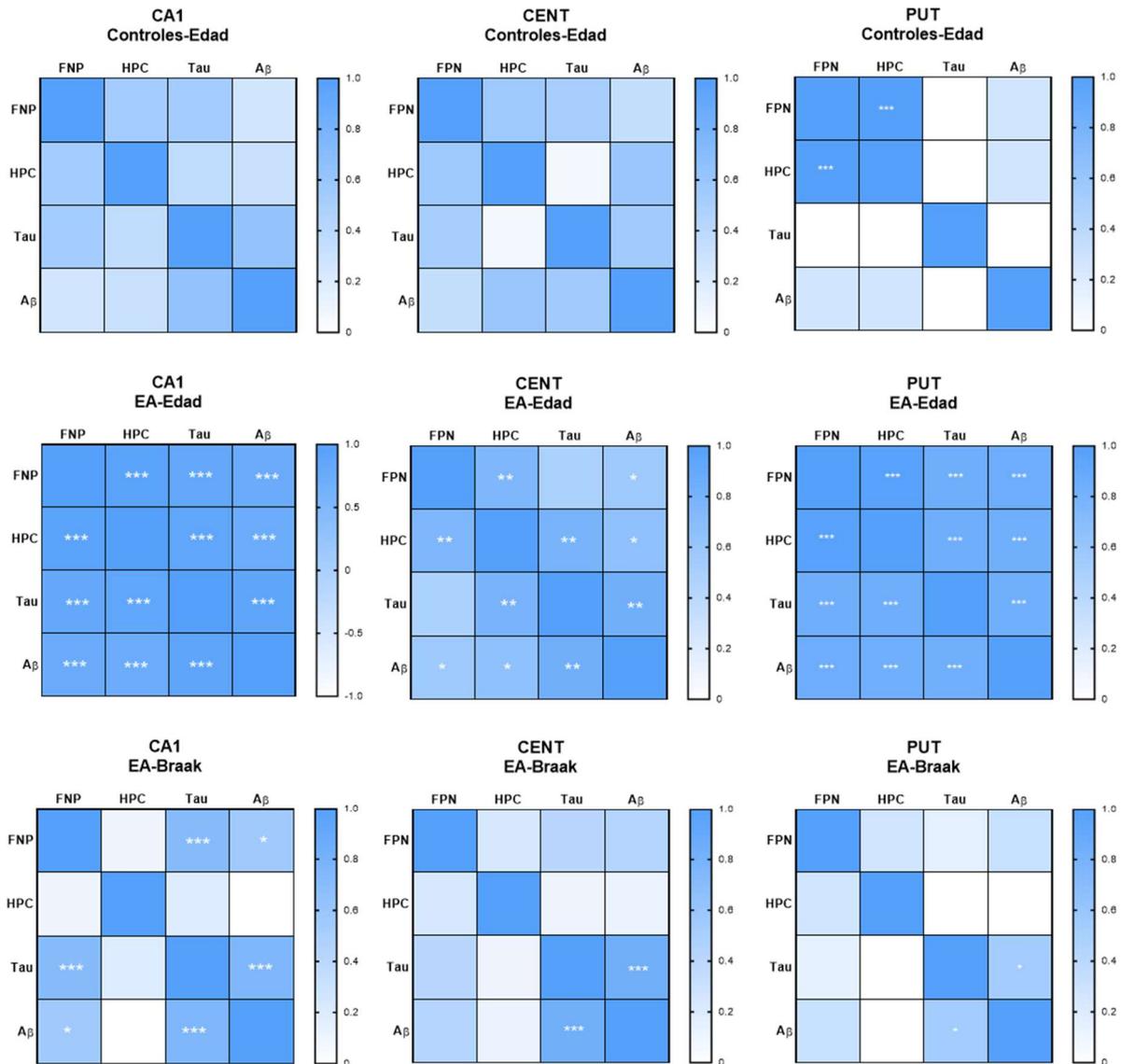


**Figura 24.-** Representación gráfica de la intensidad de marcaje para Aβ en las diferentes áreas cerebrales analizadas, zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1), corteza entorrinal (CENT), y putamen (PUT). Las gráficas **a**, **b** y **c** muestran el porcentaje de intensidad de marcaje de Aβ medio  $\pm$  SEM de pacientes EA respecto a los controles. En las gráficas **d**, **e** y **f** se representa el porcentaje de intensidad de marcaje de Aβ medio  $\pm$  SEM de pacientes EA separados en dos grupos, EA leve (Braak del I-III) y grave (Braak del IV-VI), respecto a los controles. En ambos casos el análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. \*= diferencias estadísticamente significativas versus control \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Figura 25.-** Representación gráfica de la intensidad de marcaje para Aβ en las diferentes áreas cerebrales analizadas, zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1), corteza entorrinal (CENT), y putamen (PUT). Las gráficas **a**, **b** y **c** muestran el porcentaje de intensidad de marcaje de Aβ medio  $\pm$  SEM de pacientes EA respecto a los controles separados por grupos de edad, jóvenes (20-40), adultos (50-70) y ancianos (80-100). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de dos factores seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. \*= diferencias estadísticamente significativas entre grupos de edad \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . # = diferencias estadísticamente significativas EA versus control #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ .

Ya que en la bibliografía se ha relacionado el enriquecimiento de hierro cerebral con la progresión de la EA y la presencia, cada vez mayor, de Tau y A $\beta$  en la corteza (Connor et al. 1992; Falangola et al. 2005; Meguro et al. 2008). El siguiente paso fue explorar las posibles correlaciones entre los niveles de marcadores moleculares (Tau, A $\beta$ ) y las proteínas transportadoras de hierro (FPN, HPC) con las etapas de Braak y la edad de los individuos en la CA1 del hipocampo, la CENT y el PUT.

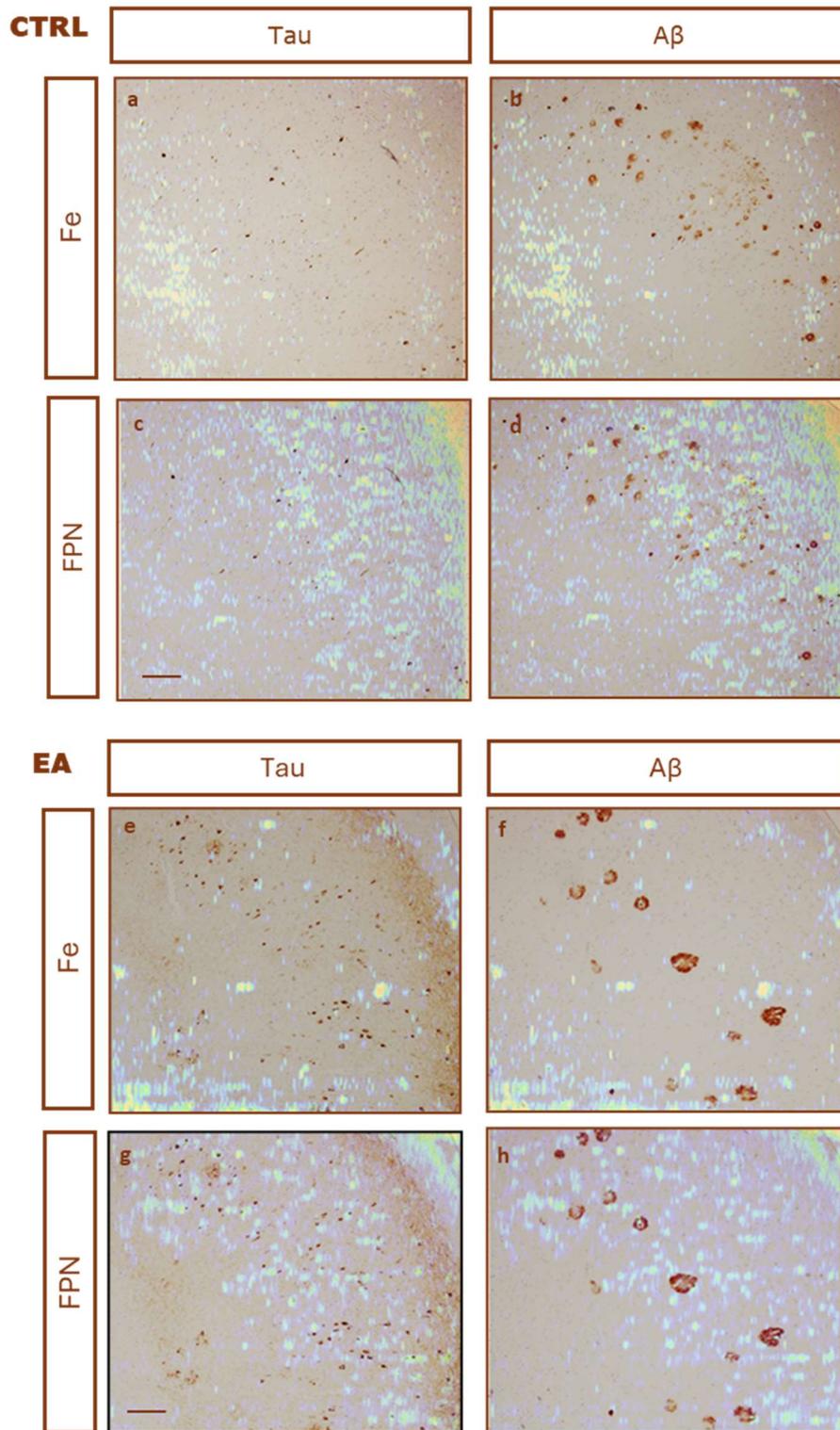


**Figura 26.-** Matrices de correlación  $\rho$  de Spearman entre los marcadores de la patología Tau y A $\beta$ , y las proteínas del transporte del hierro hepcidina (HPC) y ferroporfina (FPN). El color de cada cuadrícula está en relación con el grado de correlación de las variables, donde un color oscuro muestra correlación alta y un color claro muestra correlación baja. \*= significación estadística. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Los datos revelaron, que los niveles de FPN y HPC se correlacionaban de manera significativa a medida que avanzaba la edad en la EA en la CA1 del hipocampo y el PUT. Sin embargo, no se

encontraron estas asociaciones entre los niveles de estos transportadores de hierro con los estadios de Braak (Figura 26). Los resultados indican, además, que la relación entre los marcadores de la EA, A $\beta$  y Tau, y las proteínas transportadoras de hierro, FPN y HPC, varía según la región cerebral. Las diferencias observadas entre las regiones sugieren que la progresión de la EA y la regulación del hierro no son uniformes en todo el cerebro. Así, se encontró una correlación entre la FPN y el A $\beta$  y la Tau, así como entre la HPC y estos marcadores patológicos en la CA1 y en el PUT con la edad, lo que podría reflejar una mayor susceptibilidad de esta región a los cambios en el metabolismo del hierro y su impacto en la patología amiloide y Tau (Figura 26). Resultados similares se observaron para en el hipocampo según avanzaba la gravedad de la patología. Estos hallazgos implican que, si bien las alteraciones en el metabolismo del hierro pueden estar presentes en la EA, no necesariamente se alinean de manera simple con la progresión patológica descrita por las etapas de Braak, aunque si lo hacen con la edad de los pacientes, lo que hace pensar que otros factores, aparte del avance clásico de la patología, podrían influir en la regulación del hierro en el cerebro en el contexto de la EA.

Por último, y con el objetivo de confirmar la relación entre los transportadores de hierro y los marcadores típicos de la EA, se llevó a cabo una superposición de las imágenes de la localización del hierro y de FPN obtenidas con la LA-ICP-MS y de las IHQ realizadas para las proteínas Tau y A $\beta$  en la CA1 del hipocampo (Figura 27). Como se aprecia en las imágenes, las muestras de la materia gris cortical de la CA1 de individuos control exhiben niveles muy bajos o nulos de A $\beta$ , Tau y hierro sobre todo en las capas SO y SP. En la EA, como hemos visto anteriormente, se produce una acumulación significativa de hierro en la capa SMR, sin embargo, se observó un marcaje mínimo o nulo para Tau y A $\beta$  en la misma (Figura 27 a, b, e y f). En estas muestras, también se observaron cambios significativos en los niveles de hierro en todas las áreas analizadas, incluida aquella que ocupan las neuronas piramidales (SP), lo que coincide con la presencia de numerosas PS y numerosos ONF (Figura 27 f). Ya que los límites de la materia gris-blanca (SMR) coinciden con una señal alta de hierro, pero baja de los demás marcadores, tanto en controles como en EA, la acumulación del ion en esta región podría ser debida a factores como la alta actividad metabólica, o la presencia de BHE localizadas.



**Figura 27.-** Superposición de las imágenes de la localización del hierro (Fe) y de ferroportina (FPN) obtenidas con la LA-ICP-MS con las obtenidas por inmunohistoquímica clásica para Tau y A $\beta$  en una muestra control (**a, b, c, d**) (Donante #3) y otra de EA (**e, f, g, h**) (Donante #8). (**a**) Tau + Fe; (**b**) A $\beta$ +Fe; (**c**) Tau + FPN; (**d**) A $\beta$  + FPN de la muestra control (Donante #3). (**e**) Tau + Fe; (**f**) A $\beta$ +Fe; (**g**) Tau + FPN; (**h**) A $\beta$ + FPN de la muestra EA (Donante #8). Barra de calibración: 200  $\mu$ m.

De manera interesante, hemos visto que la mayor cantidad de A $\beta$  y Tau en la EA ocurre justamente en la capa de la materia gris cortical (SP) en la que se observa un mayor marcaje para la FPN (Figura 27 c, d y g, h), lo que sugiere un papel potencialmente protector o modulador de la FPN en el metabolismo del hierro en la EA.

En general, los resultados indican una diferencia clara en la distribución del hierro y de los marcadores patológicos entre las muestras de control y las de EA, específicamente en la región CA1 del hipocampo. En las muestras de control, se observaron niveles muy bajos o nulos de A $\beta$ , Tau y hierro, especialmente en las capas SO y SP. En las muestras de EA, aunque se detectó una acumulación significativa de hierro en la SMR, el marcaje para Tau y A $\beta$  fue mínimo en esa capa. Sin embargo, la capa SP presentó una notable colocalización de la FPN con A $\beta$  y Tau, a pesar de tener los niveles más bajos de hierro.

Aún hoy en día, sigue siendo un desafío para los investigadores determinar en qué medida los niveles elevados de hierro y otros metales depositados en el parénquima cerebral están relacionados con la formación y progresión de las PS y los ONF, o si por el contrario son procesos independientes y asociados a la progresión de la EA y/o al envejecimiento. Una gran cantidad de estudios han observado que tanto la RMN como el mapeo cuantitativo de susceptibilidad (QSM) pueden utilizarse para detectar cambios cerebrales tempranos en la sobreacumulación de hierro en regiones cerebrales subcorticales de personas con EA sintomática y asintomática (Lin et al. 2023; van Oostveen et al. 2021; Spotorno et al. 2020). Las técnicas basadas en RMN pueden medir el hierro en la materia blanca y gris cortical, y han resultado útiles para la clínica, pero difícilmente alcanzan un nivel de resolución lo suficientemente alto para ver la colocalización del hierro y la lesiones de la EA (McAllum et al. 2020). La QSM, aunque se considera más sensible para realizar medidas de hierro cortical en el estudio de las ENs, tampoco es demasiado específica (Gong et al. 2019; Nikparast et al. 2022). Su mayor ventaja radica en la posibilidad de poder asociar el hierro con el marcaje de las proteínas relacionadas con la neurodegeneración de la EA. Existe cierta evidencia *in vivo* de una asociación entre la deposición de hierro, la agregación de Tau y la neurodegeneración (Spotorno et al. 2020). De hecho, se ha encontrado una fuerte relación entre la acumulación de hierro relacionada con la edad y la PET de Tau en los ganglios basales, pero los datos encontrados en la corteza cerebral son inconsistentes (Cogswell and Fan 2023). Las relaciones QSM entre el hierro y el amiloide en áreas corticales han sido mucho más variables en la literatura previa. Algunos estudios encontraron correlaciones positivas entre susceptibilidad al hierro y el PET de amiloide en la corteza

frontotemporal (Ayton et al. 2017; Spotorno et al. 2020), mientras que otros no encontraron relaciones significativas (Cogswell et al. 2021). La limitación de esta técnica radica en que tanto el amiloide acumulado como la agregación de Tau en la corteza, pueden causar una señal QSM que se opone a la del hierro colocalizado en la EA (Cogswell and Fan 2023; Gong et al. 2019). Aunque se ha demostrado que el hierro se encuentra en PS y en asociación con la neurodegeneración, su cantidad es insuficiente para detectarlo de manera fiable en la corteza mediante esta metodología (Cogswell et al. 2021). Como decimos, las PS pueden reducir el contraste y, por tanto, la detección del hierro, especialmente en el cerebro humano; podría haber una gran carga de hierro alrededor de las PS, pero no se detectaría. Se hacen necesario más estudios para perfeccionar las técnicas QSM de forma que se generen nuevos marcadores basados en la susceptibilidad magnética para proteínas agregadas y hierro asociado (Gong et al. 2019).

En nuestras muestras y con la técnica LA-ICP-MS, hemos observado que el área de las neuronas piramidales en la EA, a pesar de la presencia de PS concentradas y numerosos ONF, cuenta con la menor cantidad de hierro de todas capas del CA1. Resulta extraña esta observación, ya que se esperaría encontrar mucho más hierro si lo consideramos implicado en la neurodegeneración y el depósito de amiloide.

Existe evidencia citohistológica limitada (con resolución a nivel celular) sobre la acumulación de hierro en PS y ONF. En muchas de las publicaciones, las imágenes obtenidas no son concluyentes, posiblemente debido al escaso contenido de hierro en estas áreas específicas, cómo hemos podido comprobar mediante la técnica de Perls y con la LA-ICP-MS (Cogswell et al. 2021; Cogswell and Fan 2023). Se ha descrito que el hierro normalmente se deposita dentro y alrededor de las PS mientras que solo se encontró una asociación limitada con los ONF (Connor et al. 1992; Falangola et al. 2005; Meguro et al. 2008; Nikparast et al. 2022). Plasencia-Villa y colaboradores, mediante un conjunto de técnicas avanzadas de microscopía electrónica analítica, han podido identificar y cuantificar las cantidades de algunos iones metálicos como el hierro, cobre y zinc presentes en el *core* de las PS. Así, observaron que el cobre y el zinc estaban directamente asociados con las fibras de A $\beta$ , mientras que la mayor parte del hierro era independiente de las fibras y se almacenaba en forma de nanopartículas de óxido de hierro altamente estructuradas y cristalinas (magnetita) (Plasencia-Villa et al. 2016). Estos autores han propuesto a éste como un posible mecanismo que presentarían las neuronas asociadas a las PS para mitigar el aumento del estrés oxidativo y el desequilibrio de los metales cerebrales.

En la EA esporádica, así como en la familiar, el péptido A $\beta$  es propenso a la agregación y forma parte de las PS que se observan en el cerebro de estos pacientes. Clásicamente, se ha descrito que el hierro férrico está más asociado con las PS difusas, que históricamente se describen como estructuras patológicas en etapa temprana, mientras que el hierro más particulado y cristalino (como la magnetita) se encuentra comúnmente dentro de regiones densas y amorfas que son los “core” de PS (Telling et al. 2017). También se ha propuesto que la neurotoxicidad que surge de la agregación del hierro y el péptido A $\beta$  puede explicarse, en parte, por la capacidad de reducción del hierro que tiene el amiloide (Telling et al. 2017). Se cree que el hierro puede almacenarse dentro de estos agregados amiloides (Everett et al., 2014) promoviendo la toxicidad del péptido A $\beta$  (Liu et al., 2011). Estas observaciones son relevantes para la enfermedad, ya que el hierro se concentra en las PS. Más importante aún, se ha reportado que el aumento del contenido de hierro es anterior a la formación de PS en un modelo animal de EA, con lo que es un dato más a favor de que este ion puede tener un papel importante en la etiología de esta enfermedad (Hare et al., 2013). Aunque existe la teoría de que el hierro pueda promover el depósito del A $\beta$  en las PS, los vínculos entre este péptido y la patología de la EA aún no se comprenden completamente. Actualmente no se cree que las fibrillas de amiloide maduras que constituyen estas placas sean el principal agente citotóxico. Realmente existe fuerte evidencia, tanto *in vitro* como *in vivo*, de que los agregados A $\beta$  más tóxicos son especies pequeñas y solubles que preceden, pero también pueden acompañar, a la aparición de fibrillas maduras. Algunos datos apoyan la hipótesis de que el hierro retrasa la formación de agregados bien ordenados de A $\beta$ , y por tanto, redundaría en la toxicidad del A $\beta$  en la EA (Liu et al. 2011).

En nuestro trabajo quizás no hemos alcanzado el nivel de precisión necesario para colocalizar, intra o extracelularmente, el hierro con las proteínas de depósito, Tau y A $\beta$ . Sin embargo, podemos afirmar que las áreas con máximos niveles de hierro y de gran cantidad de PS u ONF, no coinciden. Además, las áreas de acumulación de Tau no se alinearon con las regiones con concentraciones más altas de del ion, sino que correspondieron a regiones con abundante FPN, presumiblemente situada a nivel neuronal ya que esta proteína ha sido localizada casi exclusivamente en estas células (Everett et al. 2014; Raha et al. 2013). En las muestras de individuos control, la materia gris cortical del área CA1 del hipocampo mostró una tinción baja para A $\beta$ , Tau y hierro en las capas SO y SP, pero los niveles de FPN fueron notablemente elevados. A medida que avanzaba la EA, el marcaje de A $\beta$  y Tau se intensificaba en estas capas, mientras que los niveles de la FPN solo aumentaban levemente. En la capa SMR, con una presencia sustancial de fibras de mielina, se observó un marcaje mínimo o nulo

para Tau o A $\beta$ , pero se distinguió una acumulación significativa de hierro tanto en los casos de individuos control como en los de EA. Como se mencionó anteriormente, los límites de la materia gris-blanca coincidieron con niveles elevados de hierro, pero niveles disminuidos de la FPN.

El estudio de otras proteínas transportadoras de hierro como la Ft y la Tf demostró que ambas están alteradas en las proximidades de las PS y, en el caso de la Tf, también en la sustancia blanca de la corteza cerebral. La reacción difusa de la Tf observada alrededor de las PS y así como la del con hierro indicarían una naturaleza extracelular, lo que implica extravasación. La inmunotinción fuerte y atípica de la Ft observada a lo largo de los vasos sanguíneos en el tejido cerebral de pacientes con EA proporciona evidencias que respaldan la hipótesis de que el transporte del hierro al cerebro está alterado en la patología (Connor et al., 1992a; Connor et al., 1992b). La disminución de los niveles de la Tf podría indicar un descenso de la movilidad y la posterior acumulación del hierro en el cerebro, que según nuestras observaciones ocurriría en las capas cercanas a los vasos sanguíneos subcorticales del hipocampo, pero también en los vasos del putamen. Tal disminución en la exportación de hierro, o en la limpieza del exceso del mismo, podría desempeñar un papel importante en la degeneración neuronal y en el aumento del daño peroxidativo que se sabe que ocurre en la EA.

Otra relación entre el hierro y el A $\beta$  viene de la mano de la proteína PPA. Se ha demostrado que la sPPA a través de un motivo REWEE en el dominio E2 estabiliza la FPN, en la membrana plasmática y, por lo tanto, estimula el eflujo de hierro. Esta actividad, junto con el hecho de que la transcripción de PPA contiene un IRE en su UTR 5', sugiere que, entre otras posibles funciones fisiológicas, la PPA desempeña un papel en la homeostasis del hierro celular. Esta premisa es consistente también con el hecho de que los motivos en el extremo C de sPPA (y no de sPPA $\beta$ ) se unen a Fe<sup>2+</sup>. En la medida en que sPPA estabiliza la FPN de membrana, se ha llegado a la conclusión de que sPPA desempeña un papel agonista en el tráfico de hierro en contraste con el papel antagonista que desempeña la HPC. Podría ser que la expresión constitutiva de PPA pueda estar respondiendo a niveles elevados de hierro en neuronas individuales, con el propósito de ayudar a la exportación de hierro por parte de la FPN a través de la membrana plasmática (Dlouhy et al. 2019). La expresión de PPA no cambia en el córtex de la EA, pero lo que si se ha descrito, es que su capacidad ferrosidasa está deprimida en la patología (Hare et al., 2013). Esto podría entorpecer la salida de hierro mediada por la FPN y la entrada por Tf, lo que produciría retención de hierro en las células nerviosas. En este contexto, Tsatsanis y colaboradores demostraron que la PPA estabiliza la FPN en la membrana cuando existen

altas concentraciones de hierro, y de esta forma, el proceso amiloidogénico inhabilitaría la estabilización de FPN en la membrana, lo que alteraría la exportación del hierro (Tsatsanis, Wong, Gunn, Ayton, Bush, Devos, et al. 2020). El procesamiento de PPA por parte de la  $\beta$ -secretasa que ocurre en la EA podría promover indirectamente la ferroptosis, ya que se ha demostrado que es inducida por el agotamiento de FPN en células de neuroblastoma (Tsatsanis, Wong, Gunn, Ayton, Bush, Devos, et al. 2020).

El hierro también colocaliza con los ONF en la EA. Las fibrillas de Tau unirían hierro de una manera dependiente del estado redox celular, actuando como una fuente de ROS dentro de las neuronas (Ahmadi et al. 2017; Smith et al. 1997). El  $\text{Fe}^{3+}$ , pero no el  $\text{Fe}^{2+}$ , induce la agregación de Tau *in vitro*, agregación que nuevamente puede revertirse reduciendo el  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ . Sin embargo, el  $\text{Fe}^{2+}$  sería el causante de la hiperfosforilación de Tau (Hare et al. 2013; Wan et al. 2019). Aunque no existen pruebas directas, los niveles de Tau soluble se reducen en los cerebros con EA en comparación con los cerebros control, por tanto, el acúmulo de hierro podría resultar de la deposición de Tau en agregados insolubles durante el progreso de la enfermedad. Así mismo, la pérdida de Tau funcional podría perturbar aún más la exportación de hierro mediada por PPA, al restringir el transporte y la presentación de esta proteína en la superficie celular (Hare et al., 2013; Jakaria et al., 2021; Singh et al., 2014).

Por último, el supuesto papel del hierro en la patogénesis de la EA se ha revitalizado actualmente tras el descubrimiento de un mecanismo de muerte celular dependiente de este ion en el SNC, la ferroptosis. La ferroptosis es una forma única de muerte celular programada mediada por hierro, conservada evolutivamente entre los vertebrados. Este fenómeno depende del hierro intracelular, pero no de otros metales, y es morfológica, bioquímica y genéticamente distinta de la apoptosis, la necrosis y la autofagia. La muerte celular ferroptótica resulta de una desigualdad redox entre la producción de hidroperóxidos lipídicos inducida por el hierro y la acción de varias enzimas de defensa antioxidantes, principalmente la glutatión peroxidasa 4 (GPX4) que desintoxica los radicales libres y los productos de oxidación de lípidos (Jakaria et al. 2021). Si bien el hierro tiene un papel crucial en la muerte de las células ferroptóticas, esta muerte celular no se caracteriza por una elevación tóxica del ion. Así, según Dixon y colaboradores, el hierro lábil disponible dentro de la célula se libera incrementando la formación de ROS lipídicos tóxicos mediante dos mecanismos principales: la generación de ROS lipídicos a través de la reacción de Fenton y/o la dioxigenasa que contiene hierro y la lipooxigenasa, que, a su vez, cataliza la peroxidación de lípidos (Dixon et al. 2012). Por lo tanto,

parece que el hecho de que se produzca una elevación tóxica del hierro no es lo único necesario para la ferroptosis sino que, los niveles totales de hierro lábil dependen de otras variables homeostáticas celulares, y la muerte puede ser debida también a la susceptibilidad al mismo en las células afectadas (Dixon et al. 2012).

## 5.- DISCUSIÓN GENERAL

La acumulación de hierro es una característica común a varios tipos de patologías neurológicas, algunas de ellas neurodegenerativas como la EP, EA, la Esclerosis Múltiple (EM) y la enfermedad de Huntington (EH), pero también de otras situaciones como el cáncer, los accidentes cerebrovasculares y algunos desórdenes mentales. La diferencia entre ellas radica en la gravedad de la deposición del ion y las regiones anatómicas donde se éste se acumula (Lee and Kovacs 2024).

Durante años, se ha estudiado el papel de la deposición anormal del hierro en la patogénesis de la EA, considerada también una proteinopatía combinada de A $\beta$  y Tau, pero la solución a esta incógnita aún no se conoce. De hecho, hoy en día sigue sin darse respuesta algunas preguntas como: ¿Cuál es la causa del acumulo del hierro? o ¿es el hierro un impulsor o una consecuencia de esta patología proteica?

Para contestar a las cuestiones se ha de tener en cuenta que la homeostasis del hierro ya sea sistémica o cerebral, comprende la absorción, el almacenamiento y la excreción de este, todo bajo un estricto control (Kulaszyńska, Kwiatkowski, and Skonieczna-Żydecka 2024). La cantidad de hierro en el cerebro es bastante alta y además es más resistente a los cambios dietéticos que los tejidos periféricos, lo que induce a pensar que sus niveles están regulados por mecanismos homeostáticos propios del sistema nervioso (Ashraf, Clark, and So 2018).

El sistema celular y molecular de entrada del hierro al parénquima cerebral a través de la BHE, es decir atravesar de forma transcelular el endotelio, involucra a gran cantidad de proteínas de entrada (Tf, TfR, DMT1) y de salida (FPN) mediante un mecanismo bastante conocido (ver introducción). La entrada de hierro al cerebro también puede ocurrir a través de las células epiteliales del plexo coroideo al LCR y de éste al parénquima nervioso. A diferencia de la BHE, el plexo coroideo consta de capilares fenestrados por lo que el hierro puede cruzar el epitelio coroideo fácilmente para ingresar en los ventrículos, de forma semejante a cómo lo hace en el endotelio (Ashraf et al. 2018). Es importante enfatizar que no existe una barrera de difusión que separe el LCR ventricular del LI cerebral. Si bien se conoce bastante bien el mecanismo de la entrada de hierro de la sangre al cerebro, hay escasos datos sobre el transporte inverso desde el cerebro a la sangre, aunque se sabe que la Tf puede pasar a través de las vellosidades aracnoideas y la placa cribiforme hacia las venas para ingresar en la circulación sistémica (Johansson et al. 2008). El reciente descubrimiento del sistema glinfático, un sistema “linfático” en el cerebro, puede ser una de las rutas por las cuales los

metales de transición, incluido el hierro, se transportan y eliminan del cerebro, a través de un flujo convectivo masivo de LI, posiblemente ayudado por el canal acuaporina-4 de los astrocitos (Bohr et al. 2022; Toriello et al. 2021).

La discordancia entre el flujo de entrada y salida del hierro del cerebro podría provocar una acumulación excesiva del mismo, que por lo que sabemos, es una característica común en muchas ENs, pero también del proceso de envejecimiento fisiológico. De hecho, los estudios revelan una conexión significativa entre la disfunción de la BHE, los trastornos metabólicos y el avance de la EA. Durante el envejecimiento y, especialmente en la EA, se han observado daños en la BHE, tales como la degeneración de los pericitos, daño en las células endoteliales, despolarización de los astrocitos, disminución de la integridad de las uniones estrechas del endotelio y desorganización de la membrana basal (Bandyopadhyay 2021; Rius-Pérez et al. 2018). Por otra parte, el LCR e incluso el sistema glinfático, que es la ruta principal para la exportación de hierro desde el cerebro a la sangre desde el espacio subaracnoideo, puede también verse afectado con la edad (Rasmussen et al. 2018).

En base a esto, podríamos proponer que, si la funcionalidad de la BHE está disminuida, es posible que la mayor cantidad de hierro que entra en el parénquima nervioso salga de forma más lenta por el sistema de exportación/limpieza, lo que haría que se acumulara en aquellas áreas donde fuese mayor el daño vascular. En este sentido, se ha descrito que la Tf es muy baja en el LCR, por lo que la exportación de hierro del cerebro a la sangre es limitada. Algunas otras proteínas que almacenan hierro, como la lactoferrina o la Ft pueden ayudar a la exportación del ion, pero la función de estas proteínas también se ve afectada por algunas condiciones patológicas, como la EA (Wang et al. 2019).

De forma breve, en humanos la deposición total de hierro se correlaciona positivamente con la edad, encontrándose los mayores niveles en los ganglios basales, incluidos el PUT, el GB y la sustancia negra; mientras que las concentraciones más bajas se observan en la corteza cerebral, el tronco del encéfalo y cerebelo (Connor et al. 1992; Ramos et al. 2014; Zecca et al. 2004). En los cerebros afectados por la EA, el nivel elevado de hierro afecta también a varias áreas que incluyen la cortezas frontal, temporal, parietal, occipital, insular y cingulada. En las regiones subcorticales, el hierro se localiza sobre todo en el núcleo caudado y el PUT, donde una mayor carga del mismo se asocia estrechamente con la progresión de la enfermedad, definida por el deterioro cognitivo avanzado y la duración de la misma (Cogswell et al. 2021; Cogswell and Fan 2023; Tsatsanis et al. 2020). Nosotros hemos comprobado ese aumento de hierro en el área CA1 del hipocampo y en los ganglios basales de los pacientes con EA en relación con los controles. Al igual que ocurre con las proteínas A $\beta$  y Tau

en la EA, se ha descrito que el hierro se acumularía años antes del inicio clínico de la enfermedad y estaría relacionado con la edad del individuo (van Oostveen et al. 2021). En un futuro, sería interesante buscar marcadores de la disfunción vascular y linfática en las zonas perivasculares y periventriculares que apoyasen la teoría sobre este origen de los niveles incrementados de hierro en el envejecimiento y en la EA.

Debido al aumento progresivo del hierro en el parénquima nervioso, y posiblemente a otros cambios celulares y moleculares causados por el envejecimiento y la EA, el nivel intracelular del ion también puede verse afectado. Dado que la muerte neuronal es la causa primaria de la pérdida cognitiva en la EA, se ha puesto mucho énfasis en averiguar si ésta pudiese estar ocasionada por el exceso de hierro. En línea con esta suposición, se ha descubierto, recientemente, que la deposición intracelular de hierro y la posterior ferroptosis son un mecanismo potencial para la pérdida neuronal en muchas ENs (Wang et al., 2022). En los últimos años, se ha propuesto que el aumento del hierro neuronal sea consecuencia de un desbalance en los mecanismos transportadores. En este sentido, los niveles elevados de hierro en el envejecimiento y, particularmente en la EA, podrían explicarse mediante la “hipótesis de la ferroportina-hepcidina”, donde la unión de la HPC a la FPN daría como resultado un complejo sujeto a internalización y degradación lisosomal, lo que detendría la exportación de hierro y causaría la sobrecarga de este en las células. Sin embargo, de forma sorprendente se ha encontrado, tanto en cerebros humanos con EA como en modelos animales, que los niveles de ambas proteínas eran significativamente más bajos que los de los cerebros control (Raha et al. 2013, 2022) lo que ha sido explicado como el resultado de la internalización en el endosoma del complejo y su degradación.

Si tenemos en cuenta el papel del hierro sobre la expresión del gen de la HPC y la FPN, parece lógico esperar que el aumento de la cantidad de éste en las células nerviosas producido por la edad y la EA tuviese cierta influencia sobre la expresión de ambas moléculas, sobre todo la FPN, como parte de un mecanismo de respuesta celular de defensa frente al exceso del ion. Nuestros datos han mostrado niveles crecientes de la FPN y niveles estables de la HPC durante el envejecimiento y la EA. Esto sugiere que no hay una regulación negativa del exportador, sino más bien una regulación al alza. Consideramos que esto refleja la capacidad de las células nerviosas para intentar evitar el aumento de hierro intracelular, posiblemente causado por un mayor influjo del ion a través de otros transportadores. Sin embargo, se ha descrito que la disponibilidad de hierro férrico, tanto dentro como fuera de la célula, no tiene un efecto directo sobre la estabilidad de la proteína FPN, lo que destaca la importancia de otros mecanismos reguladores adicionales a nivel transcripcional y

postranscripcional (Link et al. 2021). En otras palabras, las células podrían estar reaccionando a los altos niveles del hierro aumentando su exportación mediante la síntesis de más FPN, mientras toleran el hierro guardado de forma intracelular y extracelular (LeVine 2024).

Resulta evidente que, como se ha comentado, la HPC pueda tener también un papel crucial en la cantidad de hierro intracelular, ya que es capaz de unirse a la FPN para bloquear la salida del ion de la célula. Los estudios sobre la HPC sugieren que existen dos fuentes en el cerebro; una local y otra proveniente de la circulación (Billesbølle et al. 2020; Fleszar et al. 2019; Ganz 2019).

La fuente local más importante de HPC la constituyen las células gliales, las cuales podrían influir en la homeostasis del hierro neuronal (Vela 2018). Efectivamente, en nuestras observaciones hemos visto que son las células de microglía y algunos astrocitos, las que mayor cantidad de HPC poseen. Se sabe poco sobre los mediadores moleculares de la expresión local de HPC. Por un lado, se ha demostrado que la inflamación y el exceso de hierro inducen su expresión en el cerebro pero, por otro lado, también se ha cuestionado que la HPC tenga un papel importante en la homeostasis de este ion, ya que los modelos *knock out* de HPC en condiciones basales no muestran una sobrecarga cerebral significativa del mismo (Kim et al. 2014). Debido a las aparentes contradicciones, se ha hipotetizado entonces un papel dual para la HPC. Ante señales inflamatorias se induciría una mayor importación y secuestro celular de hierro, pero aumentaría también la expresión de HPC en el cerebro. La acción de las moléculas inflamatorias se sumaría al efecto de la HPC al bloquear la exportación de hierro y empeoraría aún más la sobrecarga del ion observada en las neuronas. Cuando no hay inflamación, la HPC protegería de la sobrecarga de hierro debido a su papel en la reducción de la entrada de hierro y la salida de las neuronas (Vela 2018). Se considera que la EA es una patología con fuerte componente inflamatorio y mayor cantidad de hierro, por lo que, según esta teoría, la HPC empeoraría la situación de estrés oxidativo debido a esta situación. Se considera que la EA es una patología con fuerte componente inflamatorio y mayor cantidad de hierro, por lo que, según esta teoría, la HPC empeoraría la situación de estrés oxidativo. No obstante, trabajos recientes consideran que la HPC es una molécula con propiedades antiinflamatoria en los macrófagos. Bajo esta hipótesis se ha visto un papel antiinflamatorio de la HPC en los astrocitos y la microglía activados por A $\beta$ , y también un papel protector en las neuronas debido a la capacidad de reducir la señalización inflamatoria en células pretratadas (Urrutia et al. 2017).

Otra cuestión que es necesario dilucidar es el motivo por el cual algunas regiones del cerebro muestran diferente vulnerabilidad para acumular hierro en la EA lo cual coincide, como hemos visto,

con el comportamiento de las proteínas de depósito A $\beta$  y Tau (Braak & Braak, 1997). Recordemos que, generalmente y aunque se propagan conjuntamente a lo largo de la progresión de la enfermedad, la molécula más temprana en depositarse es el péptido A $\beta$  y posteriormente aparece Tau (Lv et al. 2017); la primera aparece inicialmente en las isocortezas y la segunda en la CENT. La patología A $\beta$  afecta progresivamente al hipocampo, la CENT, los ganglios basales y el diencefalo, el tronco del encéfalo y el cerebelo, mientras que la patología de Tau afecta a la CENT, las circunvoluciones temporales inferior y media y la corteza occipital (Braak & Braak, 1991; Braak & Braak, 1997). Los estudios post-mortem y de RMN que evalúan la carga patológica de hierro y las proteínas depositadas, revelan diferentes asociaciones con A $\beta$  y Tau (Ayton et al. 2017; Bulk et al. 2018; Gong et al. 2019).

En el contexto de la propagación de la patología proteica a lo largo de la progresión de la EA, la acumulación de hierro parece estar más estrechamente asociada con la deposición de Tau y los cambios estructurales del cerebro (atrofia) que con la deposición de A $\beta$ , tanto en términos temporales como en cantidad (Lee and Kovacs 2024). En este sentido, y para explicar las relaciones entre la acumulación de hierro y la patología proteica en la EA se han propuesto varias hipótesis (Lee and Kovacs 2024): (1) que el hierro es una consecuencia de la alteración patológica en las proteínas, (2) que el hierro promueve la patología proteica, y (3) que el desbalance del hierro es un fenómeno convergente o paralelo a la acumulación de proteínas.

En cuanto a la primera hipótesis, que el hierro es una consecuencia de la alteración patológica de las proteínas en la EA (*downstream role*), la bibliografía consultada coincide en la idea de que la PPA participa de forma fisiológica en la homeostasis celular del hierro al estabilizar la FPN en la membrana celular y facilitar la salida del mismo; su papel como ferroxidasa es un tema controvertido (Lee and Kovacs 2024).

Según esta teoría, las alteraciones de la PPA pueden inducir alteraciones de la homeostasis del hierro en las neuronas. Así, se ha demostrado la estabilización de PPA-FPN está mediada por Tau, que actúa como transportadora de PPA a la membrana celular (Wang et al. 2022). Según esto las neuronas de los cerebros afectados por taupatías serían más vulnerables a la toxicidad inducida por el hierro, sin embargo, todavía no hay evidencia directa que respalde la desregulación de este ion inducida por la agregación de Tau en estos casos (Ahmadi et al. 2017; Wakasaya et al. 2011; Wang et al. 2022; Yamamoto et al. 2002).

Los astrocitos, por su parte, serían más vulnerables a los depósitos extracelulares de A $\beta$ , provocando una desregulación de la entrada del hierro a través de la BHE (Li et al. 2011; Xu et al. 2020; Zhang et al. 2021). Tanto en células como en cerebros afectados por EA, este mecanismo puede estar exacerbado debido al secuestro de hierro extracelular por las placas A $\beta$ , provocando una escasez del ion disponible, lo cual sería una señal para su absorción por parte de los astrocitos en la BHE, aumentando así la carga local de hierro (Zhang et al. 2015, 2021). El péptido A $\beta$  también induciría cambios en la microglía, que junto con la exposición al interferón, conduciría a la conversión microglial en un fenotipo inflamatorio (Tang and Le 2016).

En este contexto, existe también interés en determinar si el acoplamiento de iones metálicos a los constituyentes proteicos de las lesiones en la EA se debe a su propia naturaleza o si es una consecuencia de la modificación de estas proteínas por mediadores del estrés oxidativo, como son los productos finales de la glicación avanzada o los aldehídos derivados de la lipoxidación como el hidroxinonenal (HNE) (Sayre et al. 2000; Smith et al. 1997). Se ha visto que la modificación por glicación, aumenta el potencial de unión de metales a las cadenas laterales de dichas proteínas de forma extracelular (Sayre et al. 2000).

En esta teoría se está suponiendo que la presencia de hierro en las lesiones de la EA está ligada de forma principal a las proteínas mal plegadas. Sin embargo, el cerebro tiene mecanismos para neutralizar el hierro activo tanto intracelular como extracelularmente a través de la Ft (Pérez et al. 1998; Quintana et al. 2006; Quintana and Gutiérrez 2010). La función fisiológica de la Ft es proteger a las células del hierro redox activo (Fe<sup>2+</sup>). En condiciones normales, la respuesta a un aumento en la producción de hierro Fe<sup>3+</sup>, tanto intra como extracelularmente, es la rápida absorción de hierro en los núcleos de Ft preexistentes. Si se produce un fallo en el secuestro de hierro, el resultado es estrés oxidativo inducido por el hierro ferroso Fe<sup>2+</sup>. Se ha demostrado que en las lesiones de EA también aparece la Ft de forma sistemática, localizada en la periferia y en el corazón de las PS intercalada entre las fibrillas de A $\beta$  pero no en los ONF (Quintana and Gutiérrez 2010). Se ha descrito que la Ft fisiológica se presenta como óxido de hierro férrico hexagonal (ferrihidrita), mientras que en las fases principales de la EA cerebral la Ft patológica adopta la forma de dos óxidos de hierro férrico-ferroso cúbicos mixtos, magnetita y wüstita (Quintana et al. 2006). La presencia adicional de Hs en la EA sería un argumento a favor de esta hipótesis, ya que se considera que el Hs es un producto de degradación del Ft (Quintana et al. 2006; Quintana and Gutiérrez 2010). En la actualidad se ha propuesto que dentro de las placas existiría una interacción A $\beta$ /Ft lo que ha sido observado en el

modelo animal PPA/PS1 de EA, en tejido humano y en los corazones aislados de PS (Everett et al. 2020; Telling et al. 2017). Dada la abundancia de Ft en todo el cerebro humano y la capacidad del A $\beta$  para crear un entorno en el que la Ft se reduce químicamente, lo que podría conducir a la producción sostenida de un exceso de ROS y, por lo tanto, al estrés oxidativo en los tejidos con EA (Everett et al. 2020). Por otra parte se ha descrito la presencia de Ft junto a los filamentos Tau, lo que ha sido interpretado por distintos autores como un intento de la célula para neutralizar el hierro unido a los filamentos de Tau para eliminar el metal tóxico (Pérez et al. 1998).

En lo que respecta a la segunda hipótesis, que el hierro promueve la patología proteica (*upstream role*), parece que las alteraciones en la homeostasis de este ion serían uno de los factores clave en la deposición de A $\beta$ . Así como la PPA contribuye a la regulación del hierro, éste a su vez regula la expresión de PPA a través de la interacción entre IRP/IRE. Una alta concentración intracelular de hierro mejora la interacción de IRP/IRE, lo que induce la regulación positiva de la PPA. La PPA regulada al alza se escinde por la acción de la  $\beta$ -secretasa a A $\beta$ 40/42, acelerando su deposición. Mientras tanto, la PPA ya no puede ayudar a la FPN, lo que resulta en un eflujo de hierro deteriorado y una deposición agravada (Wang et al. 2022).

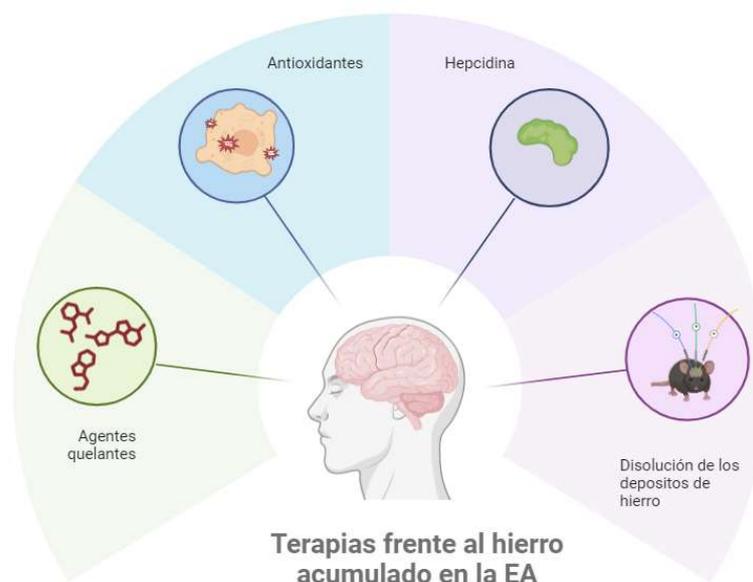
Algunos investigadores han propuesto incluso que el A $\beta$  no es tóxico en ausencia de metales redox, y que su agregación requiere la participación de dichos metales (Li et al. 2014; Plascencia-Villa et al. 2016; Tsatsanis, Wong, Gunn, Ayton, Bush, and Duce 2020). El A $\beta$  soluble se uniría a Fe<sup>3+</sup> cuando aumenta el hierro extracelular, para eliminar su exceso, pero es difícil disociarlos después de que interactúan. El hierro liberado de las células durante la patología permitía que el A $\beta$  se deposite más fácil y rápidamente, formando más PS (Ha, Ryu, and Chan 2007). De hecho, algunos investigadores creen que la deposición de este ion debería incluirse en la “hipótesis de la cascada del A $\beta$ ” de la EA. La colocalización observada entre el hierro y las placas de A $\beta$  a nivel celular sería una prueba que apoyaría esta idea (Chourrout et al. 2023; Plascencia-Villa et al. 2016). Sin embargo, la participación del hierro en la oligomerización y fibrilación de A $\beta$  requiere un examen detenido, ya que mientras algunos estudios demuestran que este ion promueve la agregación de A $\beta$ , otros estudios indican que el hierro disminuye la formación de estructuras fibrilares de láminas  $\beta$  y produce una “cepa” diferente de A $\beta$  más tóxica (Chia et al. 2024).

Así mismo, se ha demostrado que el hierro también promueve la fosforilación y agregación de Tau, tanto en cultivos celulares como en modelos experimentales de EA (Wan et al. 2019). El ion ferroso y el férrico se unen a la proteína Tau produciendo cambios estructurales. Además, se especula que

los iones de hierro, particularmente el ferroso, median las interacciones Tau-Tau, lo que resulta en la dimerización y agregación de la proteína (Ahmadi et al. 2017; Yamamoto et al. 2002). De hecho, para estos autores, las interacciones de la Tau con los metales no están mediadas por la fosforilación, lo que debilita la hipótesis de que el hierro se acumula como resultado de la formación de ONF, pero no es la causa de la formación.

Por último, y en lo que se refiere a la tercera hipótesis, que la homeostasis del hierro y la acumulación de proteínas son vías paralelas y convergentes, se ha descrito que existen correlaciones entre este ion y las funciones cognitivas en diferentes regiones del cerebro con EA, incluso en ausencia de un aumento significativo de los niveles de hierro y en etapas patológicas bajas en proteínas (Chen et al. 2021; Cogswell and Fan 2023). La falta de correlación (o correlación negativa) entre los niveles regionales de hierro y A $\beta$  en las observaciones de RMN de los pacientes de EA sugieren que la deposición del ion puede no tener una relación lineal con la del péptido en la progresión de la EA. Estos datos, junto con la falta de estudios funcionales que respalden la desregulación del hierro inducida por A $\beta$ , podrían interpretarse como que ambas deposiciones, de A $\beta$  y de hierro, son independientes (Chen et al. 2021; Cogswell et al. 2021; Lv et al. 2017).

Se ha hipotetizado, entonces, un papel adicional del hierro como efector de la neurodegeneración, actuando independientemente de las patologías Tau o amiloide. El nivel de este ion en el tejido es un rasgo que dictaría la probabilidad de neurodegeneración en la EA por ferroptosis (Ayton et al. 2021; Wang et al. 2022).



**Ilustración 19.-** Tipos de terapias para luchar contra el depósito de hierro y las especies reactivas de oxígeno que se generan en el contexto de la enfermedad de Alzheimer. Creación propia con Biorender.com.

A medida que avanzamos con nuestro estudio, hemos ido haciéndonos una idea de cuáles son las incógnitas que sobre el papel del hierro faltan en el contexto de la EA y aunque el papel del hierro en la EA aún no ha sido completamente clarificado es indudable que la acumulación patológica progresiva de hierro en la EA está fuertemente asociada con el deterioro cognitivo. Esto lo convierte en una diana terapéutica potencialmente valiosa.

Hasta que comprendamos mejor las causas de esta acumulación de hierro y los mecanismos en los que podemos intervenir para detener su depósito, una estrategia factible podría ser su eliminación a nivel cerebral, ya sea de manera general o focalizada en áreas específicas. Esta intervención, realizada sin provocar una deficiencia sistémica de hierro, podría ofrecer beneficios terapéuticos significativos y es una línea de investigación muy interesante. Varios tipos de abordajes se están realizando en la actualidad (Ilustración 29). Entre los abordajes, destacan las terapias de quelación, que tienen como objetivo el secuestro del exceso global de hierro. Sin embargo, una limitación es la eliminación completa de las funciones del hierro sistémico que podría causar también resultados adversos.

Varios tipos de agentes quelantes se han probado en pacientes de EA y en modelos experimentales de esta patología con éxito bajo o moderado habiéndose probado que revierten en mayor o menor grado los déficits de memoria inducidos por hierro e inhiben el procesamiento amiloidogénico de la PPA y la agregación de A $\beta$  (Guo et al. 2013; Klopstock et al. 2019; McLachlan et al. 1991; Wang et al. 2023). Sin embargo, muchos requieren una inyección, lo que resulta incómodo y puede dificultar el cumplimiento del tratamiento. A pesar de los avances en la síntesis y administración de quelantes, el requisito principal de los quelantes sigue estando fuera del alcance terapéutico, los quelantes más eficaces (es decir, los que tienen una alta afinidad y especificidad por los metales de transición como el hierro y el cobre) son voluminosos e hidrófilos, lo que dificulta que atraviesen la BHE y limitan su alcance fisiológico. Además, los quelantes pequeños y lipófilos, que pueden atravesar la pared defensiva del cerebro, pecan esencialmente por su sobreeficacia. Es decir, inducen toxicidad en las células al eliminar los metales de transición de las enzimas vitales de la célula (Bonda et al. 2012; Wang et al. 2023).

Debido a que para muchos quelantes existe la duda de si penetran por la BHE o cual es la eficacia de su entrada, otros estudios se han centrado en refinar la vía de administración de estos utilizando nanopartículas (NP). Se ha demostrado que la administración y el transporte de quelantes de hierro desde la sangre hasta el cerebro se puede mejorar encapsulándolos dentro de NP o uniéndolos covalentemente a sus superficies, y se ha demostrado su viabilidad en el tratamiento de la EA (Bonda

et al. 2012; Liu et al. 2010). Sin embargo, se necesitan más estudios para demostrar la eficacia y seguridad de los sistemas de nanopartículas quelantes de hierro para la administración al SNC y para evaluar su toxicidad con más detalle.

Además de los quelantes de hierro, se están realizando estudios para identificar opciones terapéuticas alternativas. Una vía terapéutica lucha contra el estrés oxidativo generado por el hierro en la EA a través de antioxidantes debido a su poder de reducir los ROS, la lipoperoxidación y la ferroptosis generados en la patología. Entre los antioxidantes estudiados destacan la vitamina C, la vitamina E, el selenio, la ferrostatina y el ácido  $\alpha$ -lipoico aunque sin resultados concluyentes (Wang et al. 2022). Otro grupo potencial de quelantes naturales del hierro en estudio, son la curcumina y los polifenoles, que también muestran efectos antioxidantes y antiinflamatorios que se juntarían a la quelación (Gucký and Hamuláková 2024).

Como ya ha sido comentado, la HPC es un péptido sistémico que puede reducir el transporte de hierro a través de la BHE y prevenir la sobrecarga de hierro en el cerebro (Nemeth and Ganz 2023). Algunos investigadores han propuesto que la terapia con HPC podría revertir la sobrecarga de hierro en el cerebro sobrecargado de hierro al inhibir las proteínas transportadoras de hierro, lo que se ha confirmado en experimentos con células y animales. De manera consistente, un estudio encontró que el tratamiento con adenovirus recombinante que porta el gen de la HPC redujo la retención de hierro y el estrés oxidativo en el cerebro (Gong et al. 2019; Xu et al. 2020). Basándose en estos estudios y explorando el potencial de la hepcidina para el tratamiento de la EA, la HPC se está investigando para utilizarla en estudios preclínicos.

Por otro lado, están los estudios basados en el intento de disolver los depósitos de óxido de hierro redox-activos, distintos de los iones de hierro lábiles celulares, que existen en forma de agregados proteicos insolubles y sus efectos neurotóxicos son continuos a través de la inducción de neuroinflamación. Los tratamiento de estimulación de protones en un modelo de ratón de EA demostraron una reducción de la deposición de hierro en las placas A $\beta$  y una mejora del deterioro cognitivo (Seo et al. 2021).

En un novedoso abordaje, se ha intentado la estimulación del campo eléctrico transcraneal sin contacto en el cerebro, sobre los depósitos de hierro tóxico en la estructura de fibrillas A $\beta$  o en la placa A $\beta$  en un modelo de ratón de EA. Los resultados previos sugieren una degradación efectiva de las fibrillas o placas amiloides unidas a magnetita en el cerebro con EA mediante el efecto electro-

Fenton de la magnetita sensibilizada por el campo eléctrico, lo que ofrece una posible opción de tratamiento electroquímico para la EA (Choi et al. 2023).



## 6.-CONCLUSIONES

1.- La detección de hierro a nivel cerebral es más sensible y precisa mediante la técnica analítica del LA-ICP-MS que mediante la técnica histoquímica de Perls.

2.- La cantidad de hierro se incrementa en la CA1 del hipocampo de los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer, respecto a los individuos control, pero su distribución es diferente en las distintas capas que la conforman. Hay mayor cantidad de hierro en la zona de fibras que en la capa de células de piramidales. Además, no existe colocalización en CA1 entre las zonas con mayor cantidad de hierro y las que presentan mayor cantidad de ferroportina, que corresponde con la zona de neuronas piramidales.

3.- La expresión tanto de ferroportina como de hepcidina aumenta en todas las áreas estudiadas con la edad en la enfermedad de Alzheimer, aunque no presentan correlación significativa con los estadios de Braak.

4.- Los niveles de ferroportina y hepcidina se correlacionan de manera significativa a medida que avanza la edad en la EA en la CA1 del hipocampo y el putamen, pero no con las etapas de Braak. También se encontró una asociación entre los principales marcadores histopatológicos de la enfermedad, como son las placas de A $\beta$  y los ovillos de Tau, y la expresión de ferroportina y hepcidina en el hipocampo y putamen con la edad.

5.- Los hallazgos de este trabajo sugieren que, si bien las alteraciones en el metabolismo del hierro pueden estar presentes en la enfermedad de Alzheimer, no necesariamente se alinean de manera simple con la progresión patológica, lo que sugiere que otros factores, aparte del avance clásico de la patología, podrían influir en la regulación del hierro en este contexto.



## 7.- BIBLIOGRAFÍA

- Ahmadi, Soha, Iraklii I. Ebralidze, Zhe She, and Heinz Bernhard Kraatz. 2017. "Electrochemical Studies of Tau Protein-Iron Interactions—Potential Implications for Alzheimer's Disease." *Electrochimica Acta* 236:384–93.
- Allen. 2019. "Brain Map - Brain-Map.Org." *Allen Mouse Brain Atlas* Available from: <http://mouse.brain-map.org>.
- Alzheimer's and Dementia. 2021. *2021 Alzheimer's Disease Facts and Figures*. Vol. 17. John Wiley & Sons, Ltd.
- Anon. 2018. *World Alzheimer Report 2018 The State of the Art of Dementia Research: New Frontiers*.
- Aquino, Domenico, Alberto Bizzi, Marina Grisoli, Barbara Garavaglia, Maria Grazia Bruzzone, Nardo Nardocci, Mario Savoiaro, and Luisa Chiapparini. 2009. "Age-Related Iron Deposition in the Basal Ganglia: Quantitative Analysis in Healthy Subjects." *Radiology* 252(1):165–72.
- Arnsten, Amy F. T., Dibyadeep Datta, Kelly Del Tredici, and Heiko Braak. 2021. "Hypothesis: Tau Pathology Is an Initiating Factor in Sporadic Alzheimer's Disease." *Alzheimer's and Dementia* 17(1):115–24.
- Ashraf, Azhaar, Maryam Clark, and Po-wah Wah So. 2018. "The Aging of Iron Man." *Frontiers in Aging* 10(65):1–23.
- Ayers, Jacob I., Benoit I. Giasson, and David R. Borchelt. 2018. *Prion-like Spreading in Tauopathies*. Vol. 83. Biol Psychiatry.
- Ayton, Scott, Amir Fazlollahi, Pierrick Bourgeat, Parnesh Raniga, Amanda Ng, Yen Ying Lim, Ibrahima Diouf, Shawna Farquharson, Jurgen Fripp, David Ames, James Doecke, Patricia Desmond, Roger Ordidge, Colin L. Masters, Christopher C. Rowe, Paul Maruff, Victor L. Villemagne, Olivier Salvado, and Ashley I. Bush. 2017. "Cerebral Quantitative Susceptibility Mapping Predicts Amyloid- $\beta$ -Related Cognitive Decline." *Brain* 140(8):2112–19.
- Ayton, Scott, Stuart Portbury, Pawel Kalinowski, Puja Agarwal, Ibrahima Diouf, Julie A. Schneider, Martha Clare Morris, and Ashley I. Bush. 2021. "Regional Brain Iron Associated with Deterioration in Alzheimer's Disease: A Large Cohort Study and Theoretical Significance." *Alzheimer's and Dementia* 17(7):1244–56.
- Ayton, Scott, Yamin Wang, Ibrahima Diouf, Julie A. Schneider, John Brockman, Martha Clare Morris, and Ashley I. Bush. 2020. "Brain Iron Is Associated with Accelerated Cognitive Decline in People with Alzheimer Pathology." *Molecular Psychiatry* 25(11):2932–41.
- Bandyopadhyay, Sanghamitra. 2021. "Role of Neuron and Glia in Alzheimer's Disease and Associated Vascular Dysfunction." *Frontiers in Aging Neuroscience* 13(June):1–21.
- Bandyopadhyay, Sanghamitra, and Jack T. Rogers. 2014. "Alzheimer's Disease Therapeutics Targeted to the Control of Amyloid Precursor Protein Translation: Maintenance of Brain Iron Homeostasis." *Biochemical Pharmacology* 88(4):486–94.
- Bao, Wen Dai, Pei Pang, Xiao Ting Zhou, Fan Hu, Wan Xiong, Kai Chen, Jing Wang, Fudi Wang, Dong Xie, Ya Zhuo Hu, Zhi Tao Han, Hong Hong Zhang, Wang Xia Wang, Peter T. Nelson, Jian Guo Chen, Youming Lu, Heng Ye Man, Dan Liu, and Ling Qiang Zhu. 2021. "Loss of Ferroportin Induces Memory Impairment by Promoting Ferroptosis in Alzheimer's Disease." *Cell Death and Differentiation* 28(5):1548–62.
- De Barros, Amaury, Germain Arribarat, Jeanne Combis, Patrick Chaynes, and Patrice Péran. 2019. "Matching Ex Vivo MRI with Iron Histology: Pearls and Pitfalls." *Frontiers in Neuroanatomy* 13(July).
- Bautista, Chaveco, Frómeta Luna, Flora Iluminada, Babié Reyes, Belkis Estela, Ronda León, Mercedes Febronia, and Menéndez Franco. 2008. "Valor Utilitario Específico de La Técnica Modificada de Perls Para El Diagnóstico Anatomopatológico." *MEDISAN* 12(2).
- Billesbølle, Christian B., Caleigh M. Azumaya, Rachael C. Kretsch, Alexander S. Powers, Shane Gonen, Simon

- Schneider, Tara Arvedson, Ron O. Dror, Yifan Cheng, and Aashish Manglik. 2020. "Structure of Hepcidin-Bound Ferroportin Reveals Iron Homeostatic Mechanisms." *Nature* 586(7831):807–11.
- Blom, Elin S., Peter Holmans, Sampath Arepalli, Omanma Adighibe, Marian L. Hamshere, Margaret Gatz, Nancy L. Pedersen, A. L. Min. Bergem, Michael J. Owen, Paul Hollingworth, Alison Goate, Julie Williams, Lars Lannfelt, John Hardy, Fabienne Wavrant-De Vrièze, and Anna Glaser. 2008. "Does APOE Explain the Linkage of Alzheimer's Disease to Chromosome 19q13?" *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics* 147(6):778–83.
- Boeve, Bradley F., Adam L. Boxer, Fiona Kumfor, Yolande Pijnenburg, and Jonathan D. Rohrer. 2022. "Advances and Controversies in Frontotemporal Dementia: Diagnosis, Biomarkers, and Therapeutic Considerations." *The Lancet Neurology* 21(3):258–72.
- Bohr, Tomas, Poul G. Hjorth, Sebastian C. Holst, Sabina Hrab, Vesa Kiviniemi, Tuomas Lilius, and Kent-andre Mardal. 2022. "The Glymphatic System: Current Understanding and Modeling." *IScience* 29(104987):1–33.
- Bonda, David J., Gang Liu, Ping Men, George Perry, Mark A. Smith, and Xiongwei Zhu. 2012. "Nanoparticle Delivery of Transition-Metal Chelators to the Brain: Oxidative Stress Will Never See It Coming! NIH Public Access." *CNS Neurol Disord Drug Targets* 11(1):81–85.
- Braak, H., and E. Braak. 1991. "Neuropathological Staging of Alzheimer-Related Changes." *Acta Neuropathologica* 82(4):239–59.
- Braak, Heiko, Irina Alafuzoff, Thomas Arzberger, Hans Kretschmar, and Kelly Del Tredici. 2006. "Staging of Alzheimer Disease-Associated Neurofibrillary Pathology Using Paraffin Sections and Immunocytochemistry." *Acta Neuropathologica* 112(4):389–404.
- Braak, Heiko, and Eva Braak. 1991. "Neuropathological Staging of Alzheimer-Related Changes." *Acta Neuropathologica* 82:239–59.
- Braak, Heiko, and Eva Braak. 1995. "Staging of Alzheimer's Disease-Related Neurofibrillary Changes." *Neurobiology of Aging* 16(3):271–84.
- Braak, Heiko, and Eva Braak. 1997. "Diagnostic Criteria for Neuropathologic Assessment of Alzheimer's Disease." *Neurobiology of Aging* 18(4 SUPPL.):85–88.
- Breijyeh, Zeinab, and Rafik Karaman. 2020. "Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment." *Molecules* 25(24).
- Bulk, Marjolein, Walid M. Abdelmoula, Hanneke Geut, Wim Wiarda, Itamar Ronen, Jouke Dijkstra, Louise van der Weerd, Wico Breimer, Nikita Lebedev, Andrew Webb, Jelle J. Goeman, Roberta J. Ward, Martina Huber, Tjerk H. Oosterkamp, Lucia Bossoni, Walid M. Abdelmoula, Hanneke Geut, Wim Wiarda, Itamar Ronen, Jouke Dijkstra, and Louise van der Weerd. 2020. "Quantitative MRI and Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry Imaging of Iron in the Frontal Cortex of Healthy Controls and Alzheimer's Disease Patients." *NeuroImage* 215(1).
- Bulk, Marjolein, Walid M. Abdelmoula, Rob J. A. Nabuurs, Linda M. van der Graaf, Coen W. H. Mulders, Aat A. Mulder, Carolina R. Jost, Abraham J. Koster, Mark A. van Buchem, Remco Natté, Jouke Dijkstra, and Louise van der Weerd. 2018. "Postmortem MRI and Histology Demonstrate Differential Iron Accumulation and Cortical Myelin Organization in Early- and Late-Onset Alzheimer's Disease." *Neurobiology of Aging* 62:231–42.
- Chang, Yan-zhong. 2019. *Brain Iron Metabolism and CNS Diseases*. edited by Yan-Zhong Chang. Shijiazhuang, Hebei, China ISSN: Springer.
- Chaudhary, Suman, Ajay Ashok, Dallas McDonald, Aaron S. Wise, Alexander E. Kritikos, Neil A. Rana, Clifford V Harding, and Neena Singh. 2021. "Upregulation of Local Hepcidin Contributes to Iron Accumulation in Alzheimer's Disease Brains." *Journal of Alzheimer's Disease* 82(4):1487–97.

- Cheignon, C., M. Tomas, D. Bonnefont-Rousselot, P. Faller, C. Hureau, and F. Collin. 2018. "Oxidative Stress and the Amyloid Beta Peptide in Alzheimer's Disease." *Redox Biology* 14:450–64.
- Chen, Lin, Anja Soldan, Kenichi Oishi, Andreia Faria, Yuxin Zhu, Marilyn Albert, Peter C. M. van Zijl, and Xu Li. 2021. "Quantitative Susceptibility Mapping of Brain Iron and  $\beta$ -Amyloid in MRI and PET Relating to Cognitive Performance in Cognitively Normal Older Adults." *Radiology* 298(2):353–62.
- Chia, Sean, Rodrigo Lessa Cataldi, Francesco Simone Ruggeri, Ryan Limbocker, Itzel Condado-Morales, Katarina Pisani, Andrea Possenti, Sara Linse, Tuomas P. J. Knowles, Johnny Habchi, Benedetta Mannini, and Michele Vendruscolo. 2024. "A Relationship between the Structures and Neurotoxic Effects of A $\beta$  Oligomers Stabilized by Different Metal Ions." *ACS Chemical Neuroscience* 15(6):1125–34.
- Choi, Younshick, Won Seok Lee, Jaemeun Lee, Sun Hyun Park, Sunwoung Kim, Ki Hong Kim, Sua Park, Eun Ho Kim, and Jong Ki Kim. 2023. "Capacitive Electrode-Based Electric Field Treatments on Redox-Toxic Iron Deposits in Transgenic AD Mouse Models: The Electroceutical Targeting of Alzheimer's Disease Feasibility Study." *International Journal of Molecular Sciences* 24(11).
- Chourrout, Matthieu, Christophe Sandt, Timm Weitkamp, Tanja Dučić, David Meyronet, Thierry Baron, Jan Klohs, Nicolas Rama, Hervé Boutin, Shifali Singh, Cécile Olivier, Marlène Wiart, Emmanuel Brun, Sylvain Bohic, and Fabien Chauveau. 2023. "Virtual Histology of Alzheimer's Disease: Biometal Entrapment within Amyloid- $\beta$  Plaques Allows for Detection via X-Ray Phase-Contrast Imaging." *Acta Biomaterialia* 170:260–72.
- Cogswell, Petrice M., and Audrey P. Fan. 2023. "Multimodal Comparisons of QSM and PET in Neurodegeneration and Aging." *NeuroImage* 273(March):120068.
- Cogswell, Petrice M., Heather J. Wiste, Matthew L. Senjem, Jeffrey L. Gunter, Stephen D. Weigand, Christopher G. Schwarz, Arvin Arani, Terry M. Therneau, Val J. Lowe, David S. Knopman, Hugo Botha, Jonathan Graff-Radford, David T. Jones, Kejal Kantarci, Prashanthi Vemuri, Bradley F. Boeve, Michelle M. Mielke, Ronald C. Petersen, and Clifford R. Jack. 2021. "Associations of Quantitative Susceptibility Mapping with Alzheimer's Disease Clinical and Imaging Markers." *NeuroImage* 224(August 2020):117433.
- Conde, M. A., E. Navarro, and J. Olazarán. 2015. "Differential Etiopathogenic Diagnosis of Dementias: Alzheimer's Disease." *Medicine (Spain)* 11(72):4340–44.
- Connor, J R., S. L. Menzies, S. M. St. Martin, and E. J. Mufson. 1992. "A Histochemical Study of Iron, Transferrin, and Ferritin in Alzheimer's Diseased Brains." *Journal of Neuroscience Research* 31(1):75–83.
- Connor, J R, B. S. Snyder, J. L. Beard, R. E. Fine, and E. J. Mufson. 1992. "Regional Distribution of Iron and Iron-regulatory Proteins in the Brain in Aging and Alzheimer's Disease." *Journal of Neuroscience Research* 31(2):327–35.
- Cristóvão, Joana S., Renata Santos, and Cláudio M. Gomes. 2016. "Metals and Neuronal Metal Binding Proteins Implicated in Alzheimer's Disease." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016.
- Cruz-Alonso, María, Beatriz Fernandez, Montserrat García, Héctor González-Iglesias, and Rosario Pereiro. 2018. "Quantitative Imaging of Specific Proteins in the Human Retina by Laser Ablation ICPMS Using Bioconjugated Metal Nanoclusters as Labels." *Analytical Chemistry* 90(20):12145–51.
- Cruz-Alonso, María, Beatriz Fernandez, Ana Navarro, Susana Junceda, Aurora Astudillo, and Rosario Pereiro. 2019. "Laser Ablation ICP-MS for Simultaneous Quantitative Imaging of Iron and Ferroportin in Hippocampus of Human Brain Tissues with Alzheimer's Disease." *Talanta* 197:413–21.
- Derry, Paul J., Muralidhar L. Hegde, George R. Jackson, Rakez Kaye, James M. Tour, Ah Lim Tsai, Thomas A. Kent, and Ah-lim Tsai. 2020. "Revisiting the Intersection of Amyloid, Pathologically Modified Tau and Iron in Alzheimer's Disease from a Ferroptosis Perspective." *Progress in Neurobiology* 184(August 2019):101716.
- Devi, Gayatri. 2023. "The Tauopathies." Pp. 251–65 in *Handbook of Clinical Neurology*. Vol. 196. Elsevier B.V.

- Dixon, SJ, KM Lemberg, MR Lamprecht, R. Skouta, EM Zaitsev, CE Gleason, AM Patel, DN, Bauer, AJ, Cantley, Yang WS, B. Morrison, and BR Stockwell. 2012. "Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Non-Apoptotic Cell Death." *Cell* 149(5):1060–72.
- Dlouhy, Adrienne C., Danielle K. Bailey, Brittany L. Steimle, Haley V Parker, and Daniel J. Kosman. 2019. "Fluorescence Resonance Energy Transfer Links Membrane Ferroportin, Hephaestin but Not Ferroportin, Amyloid Precursor Protein Complex with Iron Efflux." *Journal of Biological Chemistry* 294(11):4202–14.
- Du, Fang, Zhong Ming Qian, Qianqian Luo, Wing Ho Yung, and Ya Ke. 2015. "Hepcidin Suppresses Brain Iron Accumulation by Downregulating Iron Transport Proteins in Iron-Overloaded Rats." *Molecular Neurobiology* 52(1):101–14.
- Dubois, Bruno, Howard H. Feldman, Claudia Jacova, Harald Hampel, José Luis Molinuevo, Kaj Blennow, Steven T. Dekosky, Serge Gauthier, Dennis Selkoe, Randall Bateman, Stefano Cappa, Sebastian Crutch, Sebastiaan Engelborghs, Giovanni B. Frisoni, Nick C. Fox, Douglas Galasko, Marie Odile Habert, Gregory A. Jicha, Agneta Nordberg, Florence Pasquier, Gil Rabinovici, Philippe Robert, Christopher Rowe, Stephen Salloway, Marie Sarazin, Stéphane Epelbaum, Leonardo C. de Souza, Bruno Vellas, Pieter J. Visser, Lon Schneider, Yaakov Stern, Philip Scheltens, and Jeffrey L. Cummings. 2014. "Advancing Research Diagnostic Criteria for Alzheimer's Disease: The IWG-2 Criteria." *The Lancet Neurology* 13(6):614–29.
- Duce, James A., Andrew Tsatsanis, Michael A. Cater, Simon A. James, Elysia Robb, Krutika Wikhe, Su Ling Leong, Keyla Perez, Timothy Johanssen, Mark A. Greenough, Hyun Hee Cho, Denise Galatis, Robert D. Moir, Colin L. Masters, Catriona McLean, Rudolph E. Tanzi, Roberto Cappai, Kevin J. Barnham, Giuseppe D. Ciccotosto, Jack T. Rogers, and Ashley I. Bush. 2010. "Iron-Export Ferroxidase Activity of  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein Is Inhibited by Zinc in Alzheimer's Disease." *Cell* 142(6):857–67.
- Van Duijn, Sara, Marjolein Bulk, Sjoerd G. Van Duinen, Rob J. A. Nabuurs, Mark A. Van Buchem, Louise Van Der Weerd, and Remco Natté. 2017. "Cortical Iron Reflects Severity of Alzheimer's Disease." *Journal of Alzheimer's Disease* 60(4):1533–45.
- Everett, J., E. Céspedes, L. R. Shelford, C. Exley, J. F. Collingwood, J. Dobson, G. Van Der Laan, C. A. Jenkins, E. Arenholz, and N. D. Telling. 2014. "Ferrous Iron Formation Following the Co-Aggregation of Ferric Iron and the Alzheimer's Disease Peptide  $\beta$ -Amyloid (1-42)." *Journal of the Royal Society Interface* 11(95).
- Everett, James, Jake Brooks, Frederik Lermyte, Peter B. O'Connor, Peter J. Sadler, Jon Dobson, Joanna F. Collingwood, and Neil D. Telling. 2020. "Iron Stored in Ferritin Is Chemically Reduced in the Presence of Aggregating A $\beta$  (1-42)." *Scientific Reports* 10(1):1–16.
- Falangola, Maria F., Sang Pil Lee, Ralph A. Nixon, Karen Duff, and Joseph A. Helpert. 2005. "Histological Co-Localization of Iron in A $\beta$  Plaques of PS/APP Transgenic Mice." *Neurochemical Research* 30(2):201–5.
- Ferreira, Sofia, Ana F. Raimundo, Regina Menezes, and Ivo C. Martins. 2021. "Islet Amyloid Polypeptide & Amyloid Beta Peptide Roles in Alzheimer's Disease: Two Triggers, One Disease Dementia and Amyloid Beta Peptide." *Neuronal Regeneratio Research* 16(6):1127–30.
- Fleszar, Mariusz G., Jerzy Wiśniewski, Izabela Berdowska, Bogdan Zieliński, Marzena Zboch, Dorota Diakowska, Andrzej Gamian, and Małgorzata Krzystek-Korpacka. 2019. "Systemic Hepcidin Quantified with LC-MS/MS in Dementia in Association with Disease Pathology and Severity and with Structural Changes in the Brain." *Peptides* 122(May):170169.
- Folstein, MF, SE Folstein, and PR McHugh. 1975. "'Mini-Mental State'. A Practical Method for Grading the Cognitive State of Patients for the Clinician." *Journal of Psychiatric Research* 12:189–98.
- Forrest, Shelley L., and Gabor G. Kovacs. 2023. "Current Concepts of Mixed Pathologies in Neurodegenerative Diseases." *Canadian Journal of Neurological Sciences* 50(3):329–45.
- Gammella, Elena, Margherita Correnti, Gaetano Cairo, and Stefania Recalcati. 2021. "Iron Availability in Tissue Microenvironment: The Key Role of Ferroportin." *International Journal of Molecular Sciences* 22(6):1–15.

- Ganz, Tomas. 2019. "The Discovery of the Iron-Regulatory Hormone Heparin." *Clinical Chemistry* 65(10):1330–31.
- Garre-Olmo, Josep. 2018. "Epidemiology of Alzheimer's Disease and Other Dementias." *Revista de Neurologia* 66(11):377–86.
- Gibbons, Garrett S., Virginia M. Y. Lee, and John Q. Trojanowski. 2019. "Mechanisms of Cell-to-Cell Transmission of Pathological Tau: A Review." *JAMA Neurology* 76(1):101–8.
- Ginzburg, Yelena Z. 2019. "Hepcidin-Ferroportin Axis in Health and Disease." Pp. 17–45 in *Vitamins and Hormones*. Vol. 110. Vitam Horm.
- Goedert, M., M. G. Spillantini, M. C. Potier, J. Ulrich<sup>1</sup>, and R. A. Crowther. 1989. "Cloning and Sequencing of the cDNA Encoding an Isoform of Microtubule-Associated Protein Tau Containing Four Tandem Repeats: Differential Expression of Tau Protein MRNAs in Human Brain." *The EMBO Journal* 8(2):393–99.
- Gong, Nan Jie, Russell Dibb, Marjolein Bulk, Louise van der Weerd, and Chunlei Liu. 2019. "Imaging Beta Amyloid Aggregation and Iron Accumulation in Alzheimer's Disease Using Quantitative Susceptibility Mapping MRI." *NeuroImage* 191(100):176–85.
- Graeber, Manuel B. 1999. "No Man Alone: The Rediscovery of Alois Alzheimer's Original Cases." *Brain Pathology* 9(2):237–40.
- Graham, Stewart F., Muhammad Bin Nasaruddin, Manus Carey, Christian Holscher, Bernadette McGuinness, Patrick G. Kehoe, Seth Love, Peter Passmore, Christopher T. Elliott, Andrew A. Meharg, and Brian D. Green. 2014. "Age-Associated Changes of Brain Copper, Iron, and Zinc in Alzheimer's Disease and Dementia with Lewy Bodies." *Journal of Alzheimer's Disease* 42(4):1407–13.
- Gravina, Stephen A., Libin Ho, Christopher B. Eckman, Kristin E. Long, Laszlo Otvos, L. H. Younkin, Nobuhiro Suzuki, and Steven G. Younkin. 1995. "Amyloid  $\beta$  Protein ( $A\beta$ ) in Alzheimer's Disease Brain. Biochemical and Immunocytochemical Analysis with Antibodies Specific for Forms Ending at  $A\beta$ 40 or  $A\beta$ 42(43)." *Journal of Biological Chemistry* 270(13):7013–16.
- Gucký, Adrián, and Slávka Hamuláková. 2024. "Targeting Biometals in Alzheimer's Disease with Metal Chelating Agents Including Coumarin Derivatives." *CNS Drugs* 38(7):507–32.
- Guimerà, Arantxa, Xavier Gironès, and Félix F. Cruz-sánchez. 2002. "Actualización Sobre La Patología de La Enfermedad de Alzheimer." *Revista Española de Patología* 35(October):21–48.
- Guo, Chuang, Tao Wang, Wei Zheng, Zhong Yan Shan, Wei Ping Teng, and Zhan You Wang. 2013. "Intranasal Deferoxamine Reverses Iron-Induced Memory Deficits and Inhibits Amyloidogenic APP Processing in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease." *Neurobiology of Aging* 34(2):562–75.
- Ha, Chanki, Jungki Ryu, and Beum Park Chan. 2007. "Metal Ions Differentially Influence the Aggregation and Deposition of Alzheimer's  $\beta$ -Amyloid on a Solid Template." *Biochemistry* 46(20):6118–25.
- Hadziahmetovic, Majda, Ying Song, Padmavathi Ponnuru, Jared Iacovelli, Allan Hunter, Nadine Haddad, John Beard, James R. Connor, Sophie Vaulont, and Joshua L. Dunaief. 2011. "Age-Dependent Retinal Iron Accumulation and Degeneration in Heparin Knockout Mice." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 52(1):109–18.
- Hardy, John A., and Gerald A. Higgins. 1992. "Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis." *Science* 256(5054):184–85.
- Hardy, John, and David Allsop. 1991. "Amyloid Deposition as the Central Event in the Aetiology of Alzheimer's Disease." *TIPS* 12.
- Hare, Dominic, Scott Ayton, Ashley Bush, and Peng Lei. 2013. "A Delicate Balance: Iron Metabolism and Diseases of the Brain." *Frontiers in Aging Neuroscience* 5(JUL).

- Hare, Dominic J., Erika P. Raven, Blaine R. Roberts, Mirjana Bogeski, Stuart D. Portbury, Catriona A. McLean, Colin L. Masters, James R. Connor, Ashley I. Bush, Peter J. Crouch, and Philip A. Doble. 2016. "Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry Imaging of White and Gray Matter Iron Distribution in Alzheimer's Disease Frontal Cortex." *NeuroImage* 137:124–31.
- Hofer, Tim, and George Perry. 2016. "Nucleic Acid Oxidative Damage in Alzheimer's Disease—Explained by the Hecpidin-Ferroportin Neuronal Iron Overload Hypothesis?" *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 38:1–9.
- Hyman, Bradley T., Creighton H. Phelps, Thomas G. Beach, Eileen H. Bigio, Nigel J. Cairns, Maria C. Carrillo, Dennis W. Dickson, Charles Duyckaerts, Matthew P. Frosch, Eliezer Masliah, Suzanne S. Mirra, Peter T. Nelson, Julie A. Schneider, Dietmar Rudolf Thal, Bill Thies, John Q. Trojanowski, Harry V. Vinters, and Thomas J. Montine. 2012. "National Institute on Aging-Alzheimer's Association Guidelines for the Neuropathologic Assessment of Alzheimer's Disease." *Alzheimer's and Dementia* 8(1):1–13.
- Iloff, Jeffrey J., Minghuan Wang, Yonghong Liao, Benjamin A. Plogg, Weiguo Peng, Georg A. Gundersen, Helene Benveniste, G. Edward Vates, Rashid Deane, Steven A. Goldman, Erlend A. Nagelhus, and Maiken Nedergaard. 2012. "A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid  $\beta$ ." *Science Translational Medicine* 4(147):147–111.
- Iloff, JJ, and M. Nedergaard. 2008. "Is There a Cerebral Lymphatic System?" *Stroke* 44(6):S93–95.
- Iov, Tatiana, Diana Bulgaru-Iliescu, Anton Knieling, Simona Irina Damian, and Laura Rîșcanu. 2019. "Macroscopic and Microscopic Diagnosis in Alzheimer's Disease." *Romanian Journal of Legal Medicine* 27(2):89–94.
- Jack, Clifford R., Marilyn S. Albert, David S. Knopman, Guy M. McKhann, Reisa A. Sperling, Maria C. Carrillo, Bill Thies, and Creighton H. Phelps. 2011. "Introduction to the Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association Workgroups on Diagnostic Guidelines for Alzheimer's Disease." *Alzheimer's and Dementia* 7(3):257–62.
- Jack, Clifford R., David A. Bennett, Kaj Blennow, Maria C. Carrillo, Billy Dunn, Samantha Budd Haeberlein, David M. Holtzman, William Jagust, Frank Jessen, Jason Karlawish, Enchi Liu, Jose Luis Molinuevo, Thomas Montine, Creighton Phelps, Katherine P. Rankin, Christopher C. Rowe, Philip Scheltens, Eric Siemers, Heather M. Snyder, Reisa Sperling, Cerise Elliott, Eliezer Masliah, Laurie Ryan, and Nina Silverberg. 2018. "NIA-AA Research Framework: Toward a Biological Definition of Alzheimer's Disease." *Alzheimer's and Dementia* 14(4):535–62.
- Jakaria, Md, Abdel Ali Belaidi, Ashley I. Bush, and Scott Ayton. 2021. "Ferroptosis as a Mechanism of Neurodegeneration in Alzheimer's Disease." *Journal of Neurochemistry* 159(5):804–25.
- Janeiro, MH, Carlos G. Ardanaz, Noemí Sola-Sevilla, JD Dong, M. Cortes-Erice, M. Solas, E. Puerta, and MJ Ramirez. 2021. "Biomarcadores En La Enfermedad de Alzheimer y Otras Demencias." *Advanced Lab Med* 2(1):39–50.
- Johansson, Pia A., Katarzyna M. Dziegielewska, Shane A. Liddelow, and Norman R. Saunders. 2008. "The Blood-CSF Barrier Explained: When Development Is Not Immaturity." *BioEssays* 30(3):237–48.
- Khachaturian, Zaven S. 2011. "Revised Criteria for Diagnosis of Alzheimer's Disease: National Institute on Aging-Alzheimer's Association Diagnostic Guidelines for Alzheimer's Disease." *Alzheimer's and Dementia* 7(3):253–56.
- Kiernan, J. A. 2008. *Histological and Histochemical Methods : Theory and Practice*. 4th ed. Oxfordshire: Scion.
- Kim, Airie, Eileen Fung, Sona G. Parikh, Erika V. Valore, Victoria Gabayan, Elizabeta Nemeth, and Tomas Ganz. 2014. "A Mouse Model of Anemia of Inflammation: Complex Pathogenesis with Partial Dependence on Hecpidin." *Blood* 123(8):1129–36.
- Klopstock, Thomas, Fernando Tricta, Lynne Neumayr, Ivan Karin, Giovanna Zorzi, Caroline Fradette, Tomasz

- Kmieć, Boriana Büchner, Hannah E. Steele, Rita Horvath, Patrick F. Chinnery, Anna Basu, Clemens Küpper, Christiane Neuhofer, Bernadette Kálmán, Petr Dušek, Zuhail Yapici, Ian Wilson, Feng Zhao, Federica Zibordi, Nardo Nardocci, Christine Aguilar, Susan J. Hayflick, Michael Spino, Andrew M. Blamire, Penelope Hogarth, and Elliott Vichinsky. 2019. "Safety and Efficacy of Deferiprone for Pantothenate Kinase-Associated Neurodegeneration: A Randomised, Double-Blind, Controlled Trial and an Open-Label Extension Study." *The Lancet Neurology* 18(7):631–42.
- Kulaszyńska, Monika, Sebastian Kwiatkowski, and Karolina Skonieczna-Żydecka. 2024. "The Iron Metabolism with a Specific Focus on the Functioning of the Nervous System." *Biomedicines* 12(3):1–17.
- De la Torre, J. C. 2002. "Vascular Basis of Alzheimer's Pathogenesis." Pp. 196–215 in *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol. 977. John Wiley & Sons, Ltd.
- De La Torre, J. C. 1999. "Critical Threshold Cerebral Hypoperfusion Causes Alzheimer's Disease?" *Acta Neuropathologica* 98(1):1–8.
- Lee, Seojin, and Gabor G. Kovacs. 2024. "The Irony of Iron: The Element with Diverse Influence on Neurodegenerative Diseases." *International Journal of Molecular Sciences* 25(8):4269.
- Lei, Peng, Scott Ayton, and Ashley I. Bush. 2021. "The Essential Elements of Alzheimer's Disease." *Journal of Biological Chemistry* 296:1–61.
- LeVine, Steven M. 2024. "Exploring Potential Mechanisms Accounting for Iron Accumulation in the Central Nervous System of Patients with Alzheimer's Disease." *Cells* 13(8).
- Li, Lin, C. Holscher, B. B. Chen, Z. F. Zhang, and Yue Ze Liu. 2011. "Hepcidin Treatment Modulates the Expression of Divalent Metal Transporter-1, Ceruloplasmin, and Ferroportin-1 in the Rat Cerebral Cortex and Hippocampus." *Biological Trace Element Research* 143(3):1581–93.
- Li, X., T. Q. Li, N. Andreasen, M. K. Wiberg, E. Westman, and L. O. Wahlund. 2014. "The Association between Biomarkers in Cerebrospinal Fluid and Structural Changes in the Brain in Patients with Alzheimer's Disease." *Journal of Internal Medicine* 275(4):418–27.
- Lin, Qixiang, Salman Shahid, Antoine Hone-Blanchet, Shuai Huang, Junjie Wu, Aditya Bisht, David Loring, Felicia Goldstein, Allan Levey, Bruce Crosson, James Lah, and Deqiang Qiu. 2023. "Magnetic Resonance Evidence of Increased Iron Content in Subcortical Brain Regions in Asymptomatic Alzheimer's Disease." *Human Brain Mapping* 44(8):3072–83.
- Link, Camille, Julia D. Knopf, Oriana Marques, Marius K. Lemberg, and U. Muckenthaler. 2021. "The Role of Cellular Iron Deficiency in Controlling Iron Export." *BBA - General Subjects* 1865(3):129829.
- Liu, B., Aileen Moloney, Sarah Meehan, Kyle Morris, Sally E. Thomas, Louise C. Serpell, Robert Hider, Stefan J. Marciniak, David A. Lomas, and Damian C. Crowther. 2011. "Iron Promotes the Toxicity of Amyloid B Peptide by Impeding Its Ordered Aggregation." *The Journal of Biological Chemistry* 286(6):4248–56.
- Liu, Gang, Ping Men, George Perry, and Mark A. Smith. 2010. "Nanoparticle and Iron Chelators as a Potential Novel Alzheimer Therapy." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 610:123–44.
- Liu, Jun Lin, Yong Gang Fan, Zheng Sheng Yang, Zhan You Wang, and Chuang Guo. 2018. "Iron and Alzheimer's Disease: From Pathogenesis to Therapeutic Implications." *Frontiers in Neuroscience* 12(SEP).
- Liu, Pei Pei, Yi Xie, Xiao Yan Meng, and Jian Sheng Kang. 2019. "History and Progress of Hypotheses and Clinical Trials for Alzheimer's Disease." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 4(1).
- Livingston, Gill, Jonathan Huntley, Andrew Sommerlad, David Ames, Clive Ballard, Sube Banerjee, Carol Brayne, Alistair Burns, Jiska Cohen-mansfield, Claudia Cooper, Sergi G. Costafreda, Amit Dias, Nick Fox, Laura N. Gitlin, Robert Howard, Helen C. Kales, Mika Kivimäki, Eric B. Larson, Adesola Ogunniyi, Vasiliki Orgeta, Karen Ritchie, Kenneth Rockwood, Elizabeth L. Sampson, Quincy Samus, and Lon S. Schneider. 2020. "Dementia Prevention, Intervention, and Care: 2020 Report of the Lancet Commission." *The*

*Lancet Commissions* 396:413–46.

- Lu, Li Na, Zhong Ming Qian, Ka Chun Wu, Wing Ho Yung, and Ya Ke. 2017. “Expression of Iron Transporters and Pathological Hallmarks of Parkinson’s and Alzheimer’s Diseases in the Brain of Young, Adult, and Aged Rats.” *Molecular Neurobiology* 54(7):5213–24.
- Lv, Zhong Yue, Chen Chen Tan, Jin Tai Yu, and Lan Tan. 2017. “Spreading of Pathology in Alzheimer’s Disease.” *Neurotoxicity Research* 32(4):707–22.
- Mackenzie, Ian R. A., Manuela Neumann, Eileen H. Bigio, Nigel J. Cairns, Irina Alafuzoff, Jillian Kril, Gabor G. Kovacs, Bernardino Ghetti, Glenda Halliday, Ida E. Holm, Paul G. Ince, Wouter Kamphorst, Tamas Revesz, Annemieke J. M. Rozemuller, Samir Kumar-Singh, Haruhiko Akiyama, Atik Baborie, Salvatore Spina, Dennis W. Dickson, John Q. Trojanowski, and David M. A. Mann. 2010. “Nomenclature and Nosology for Neuropathologic Subtypes of Frontotemporal Lobar Degeneration: An Update.” *Acta Neuropathologica* 119(1):1–4.
- Martín, Francisco Javier, and Pedro Gil. 2006. “Valoración Funcional En La Demencia Grave.” *Revista Espanola de Geriatria y Gerontologia* 41(SPEC. ISS. 1):43–49.
- Martínez-Tapia, Ricardo Jesús, Francisco Estrada-Rojo, Alonso Alejandro, Antonio Barajas-Martínez, Luis Arturo Flores-Avalos, Anahí Chavarría, and Luz Navarro. 2018. “Una Nueva Vía de Drenaje Cerebral: El Sistema Glinfático. Revisión Histórica y Conceptual.” *Revista Mexicana de Neurociencia* 19(1):104–16.
- Mayo Clinic. 2019. “Estadios Del Alzheimer: Cómo Avanza La Enfermedad.” *Mayoclinic*. Retrieved January 29, 2024 (<https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/alzheimers-disease/in-depth/alzheimers-stages/art-20048448>).
- McAllum, Erin J., Dominic J. Hare, Irene Volitakis, Catriona A. McLean, Ashley I. Bush, David I. Finkelstein, and Blaine R. Roberts. 2020. “Regional Iron Distribution and Soluble Ferroprotein Profiles in the Healthy Human Brain.” *Progress in Neurobiology* 186(December):101744.
- McKhann, Guy, David Drachman, Marshall Folstein, Robert Katzman, Donald Price, and Emanuel M. Stadlan. 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):939–44.
- McLachlan, D. R. C., T. P. A. Kruck, W. Kalow, D. F. Andrews, A. J. Dalton, M. Y. Bell, and W. L. Smith. 1991. “Intramuscular Desferrioxamine in Patients with Alzheimer’s Disease.” *The Lancet* 337(8753):1304–8.
- Meguro, Reiko, Yoshiya Asano, Hiroyasu Iwatsuki, and Kazuhiko Shoumura. 2003. “Perfusion-Perls and -Turnbull Methods Supplemented by DAB Intensification for Nonheme Iron Histochemistry: Demonstration of the Superior Sensitivity of the Methods in the Liver, Spleen, and Stomach of the Rat.” *Histochemistry and Cell Biology* 120(1):73–82.
- Meguro, Reiko, Yoshiya Asano, Saori Odagiri, Chengtai Li, Hiroyasu Iwatsuki, and Kazuhiko Shoumura. 2007. “Nonheme-Iron Histochemistry for Light and Electron Microscopy: A Historical, Theoretical and Technical Review.” *Archives of Histology and Cytology* 70(1):1–19.
- Meguro, Reiko, Yoshiya Asano, Saori Odagiri, Chengtai Li, and Kazuhiko Shoumura. 2008. “Cellular and Subcellular Localizations of Nonheme Ferric and Ferrous Iron in the Rat Brain: A Light and Electron Microscopic Study by the Perfusion-Perls and -Turnbull Methods.” *Archives of Histology and Cytology* 71(4):205–22.
- Meyron-Holtz, Esther G., Manik C. Ghosh, Kazuhiro Iwai, Timothy Lavaute, Xavier Brazzolotto, Urs V Berger, William Land, Hayden Ollivierre-Wilson, Alex Grinberg, Paul Love, and Tracey A. Rouault. 2004. “Genetic Ablations of Iron Regulatory Proteins 1 and 2 Reveal Why Iron Regulatory Protein 2 Dominates Iron Homeostasis.” *The EMBO Journal* 23(2):386–95.
- Mirra, SS. 1997. “The CERAD Neuropathology Protocol and Consensus Recommendations for the Postmortem

Diagnosis of Alzheimer's Disease: A Commentary." *Neurobiology of Aging* 18(4 SUPPL.).

- Mirra, SS, A. Heyman, D. McKeel, S. M. Sumi, B. J. Crain, L. M. Brownlee, F. S. Vogel, J. P. Hughes, G. van Belle, L. Berg, Melvyn J. Ball, Linda M. Bierer, Diana Claasen, Law Rence Hansen, Michael Hart, John Hedreen, B. Baltimore, Victor Hen Derson, Bradley T. Hyman, Catharine Joachim, William Mark-Esbery, A. Julio Mar Tinez, Ann McKee, Carol Miller, John Moossy, David Nochlin, Daniel Perl, Carol Petito, Gutti R. Rao, Robert L. Schelper, Ursula Slager, and Robert D. Terry. 1991. "The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the Neuropathologic Assessment of Alzheimer's Disease." *Neurology* 41(4):479–86.
- Miyajima, Hiroaki. 2015. "Aceruloplasminemia." *Neuropathology* 35(1):83–90.
- Mleczko-Sanecka, Katarzyna, and Laura Silvestri. 2021. "Cell-Type-Specific Insights into Iron Regulatory Processes." *American Journal of Hematology* 96(1):110–27.
- Moloney, Christina M., Sydney A. Labuzan, Julia E. Crook, Habeeba Siddiqui, Monica Castanedes-Casey, Christian Lachner, Ronald C. Petersen, Ranjan Duara, Neill R. Graff-Radford, Dennis W. Dickson, Michelle M. Mielke, and Melissa E. Murray. 2023. "Phosphorylated Tau Sites That Are Elevated in Alzheimer's Disease Fluid Biomarkers Are Visualized in Early Neurofibrillary Tangle Maturity Levels in the Post Mortem Brain." *Alzheimer's and Dementia* 19(3):1029–40.
- Moloney, Christina M., Val J. Lowe, and Melissa E. Murray. 2021. "Visualization of Neurofibrillary Tangle Maturity in Alzheimer's Disease: A Clinicopathologic Perspective for Biomarker Research." *Alzheimer's and Dementia* 17(9):1554–74.
- Montagne, Axel, Zhen Zhao, and Berislav V. Zlokovic. 2017. "Alzheimer's Disease: A Matter of Blood-Brain Barrier Dysfunction?" *Journal of Experimental Medicine* 214(11):3151–69.
- Montine, Thomas J., Creighton H. Phelps, Thomas G. Beach, Eileen H. Bigio, Nigel J. Cairns, Dennis W. Dickson, Charles Duyckaerts, Matthew P. Frosch, Eliezer Masliah, Suzanne S. Mirra, Peter T. Nelson, Julie A. Schneider, Dietmar Rudolf Thal, John Q. Trojanowski, Harry V. Vinters, and Bradley T. Hyman. 2012. "National Institute on Aging-Alzheimer's Association Guidelines for the Neuropathologic Assessment of Alzheimer's Disease: A Practical Approach." *Acta Neuropathologica* 123(1):1–11.
- Moos, Torben, and Thomas R. Nielsen. 2006. "Ferroportin in the Postnatal Rat Brain: Implications for Axonal Transport and Neuronal Export of Iron." *Seminars in Pediatric Neurology* 13(3):149–57.
- Muralidar, Shibi, Senthil Visaga Ambi, Saravanan Sekaran, Diraviyam Thirumalai, and Balamurugan Palaniappan. 2020. "Role of Tau Protein in Alzheimer's Disease: The Prime Pathological Player." *International Journal of Biological Macromolecules* 163:1599–1617.
- Navarro, A., E. Del Valle, E. Martínez, C. Ordóñez, C. Pérez, and J. Tolia. 2013. "Highly Selective and Fast Diagnosis of Alzheimer's Disease Hallmark Lesions Using Congo Red in Isopropyl Alcoholic Solution." *Journal of Alzheimer's Disease* 35(3).
- Navarro, Ana, Jorge Tolia, and Eva Del Valle. 1999. "Congo Red Method for Demonstrating Amyloid in Paraffin Sections." *Journal of Histotechnology* 22(4):305–8.
- Navarro, Ana, Eva Del Valle, Eva Martínez, Cristina Ordóñez, Cristina Pérez, and Jorge Tolia. 2013. "Highly Selective and Fast Diagnosis of Alzheimer's Disease Hallmark Lesions Using Congo Red in Isopropyl Alcoholic Solution." *Journal of Alzheimer's Disease* 35(3):589–97.
- Nemeth, Elizabeta, and Tomas Ganz. 2021. "Hepcidin-Ferroportin Interaction Controls Systemic Iron Homeostasis." *International Journal of Molecular Sciences* 22(12).
- Nemeth, Elizabeta, and Tomas Ganz. 2023. "Hepcidin and Iron in Health and Disease." *Annual Review of Medicine* 74:261–77.
- Nemeth, Elizabeta, Marie S. Tuttle, Julie Powelson, Michael D. Vaughn, Adriana Donovan, Diane Mc Vey Ward,

- Tomas Ganz, and Jerry Kaplan. 2004. "Hepcidin Regulates Cellular Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization." *Science* 306(5704):2090–93.
- Nikparast, Farzaneh, Zohreh Ganji, Mohammad Danesh Doust, Reyhane Faraji, and Hoda Zare. 2022. "Brain Pathological Changes during Neurodegenerative Diseases and Their Identification Methods: How Does QSM Perform in Detecting This Process?" *Insights into Imaging* 13(1):74.
- van Oostveen, Wieke M., Elizabeth C. M. M. de Lange, and Arkadiusz Orzechowski. 2021. "Imaging Techniques in Alzheimer's Disease: A Review of Applications in Early Diagnosis and Longitudinal Monitoring." *International Journal of Molecular Sciences* 22(4):1–34.
- Pérez, Mar, José M. Valpuesta, Esteban Montejo De Garcini, Carmen Quintana, Montserrat Arrasate, José L. López-Carrascosa, Alberto Rábano, Justo García De Yébenes, and Jesús Avila. 1998. "Ferritin Is Associated with the Aberrant Tau Filaments Present in Progressive Supranuclear Palsy." *American Journal of Pathology* 152(6):1531–39.
- Peters, Alan, and Douglas L. Rosene. 2003. "In Aging, Is It Gray or White?" *Journal of Comparative Neurology* 462(2):139–43.
- Petrushanko, Irina Yu, Vladimir A. Mitkevich, and Alexander A. Makarov. 2023. "Effect of  $\beta$ -Amyloid on Blood-Brain Barrier Properties and Function." *Biophysical Reviews* 15(2):183–97.
- Pettersen, RC. 2016. "Mild Cognitive Impairment." *Continuum (Minneapolis, Minn)* 22(2):404–18.
- Plascencia-Villa, Germán, Arturo Ponce, Joanna F. Collingwood, M. Josefina Arellano-Jiménez, Xiongwei Zhu, Jack T. Rogers, Israel Betancourt, Miguel José-Yacamán, and George Perry. 2016. "High-Resolution Analytical Imaging and Electron Holography of Magnetite Particles in Amyloid Cores of Alzheimer's Disease." *Scientific Reports* 6(March):1–12.
- Proaño, Jefferson, and Franciso Aguilar. 2004. "Enfermedad de Alzheimer. Clínica, Diagnóstico y Neuropatología." *Plast & Rest Neurol* 3(1–2):95–105.
- Qian, Zhong-Ming, and Ya Ke. 2020. "Hepcidin and Its Therapeutic Potential in Neurodegenerative Disorders." *Medicinal Research Reviews* 40(2):633–53.
- Qian, Zhong Ming, and Ya Ke. 2019. "Brain Iron Transport." *Biological Reviews* 94(5):1672–84.
- Qian, Zhong Ming, Wei Li, and Qian Guo. 2023. "Ferroportin1 in the Brain." *Ageing Research Reviews* 88(May):101961.
- Quintana, C., S. Bellefqih, J. Y. Laval, J. L. Guerquin-Kern, T. D. Wu, J. Avila, I. Ferrer, R. Arranz, and C. Patiño. 2006. "Study of the Localization of Iron, Ferritin, and Hemosiderin in Alzheimer's Disease Hippocampus by Analytical Microscopy at the Subcellular Level." *Journal of Structural Biology* 153(1):42–54.
- Quintana, Carmen, and Lucía Gutiérrez. 2010. "Could a Dysfunction of Ferritin Be a Determinant Factor in the Aetiology of Some Neurodegenerative Diseases?" *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1800(8):770–82.
- Raha-Chowdhury, Ruma;, Animesh Alexander; Raha, Serhiy; Forostyak, Jing-Wei Wei; Zhao, Simon Russell William; Stott, Adrian; Bomford, Animesh; Alexander Raha, Serhiy; Forostyak, Jing-Wei Wei; Zhao, Simon; Russell William Stott, and Adrian; Bomford. 2015. "Expression and Cellular Localization of Hepcidin mRNA and Protein in Normal Rat Brain." *BMC Neuroscience* 16(1):24.
- Raha-Chowdhury, Ruma, Animesh Alexander Raha, Serhiy Forostyak, Jing Wei Zhao, Simon Russell William Stott, and Adrian Bomford. 2015. "Expression and Cellular Localization of Hepcidin mRNA and Protein in Normal Rat Brain." *BMC Neuroscience* 16(1):24.
- Raha, Animesh Alexander, Anwesha Biswas, James Henderson, Subhojit Chakraborty, Anthony Holland, Robert P. Friedland, Elizabeta Mukaetova-Ladinska, Shahid Zaman, and Ruma Raha-Chowdhury. 2022. "Interplay of Ferritin Accumulation and Ferroportin Loss in Ageing Brain: Implication for Protein Aggregation in

- Down Syndrome Dementia, Alzheimer's, and Parkinson's Diseases." *International Journal of Molecular Sciences* 23(3).
- Raha, Animesh Alexander, Seyedeh Deniz Ghaffari, James Henderson, Subhojit Chakraborty, Kieren Allinson, Robert P. Friedland, Anthony Holland, Shahid H. Zaman, Elizabeta B. Mukaetova-Ladinska, and Ruma Raha-Chowdhury. 2021. "Hepcidin Increases Cytokines in Alzheimer's Disease and Down's Syndrome Dementia: Implication of Impaired Iron Homeostasis in Neuroinflammation." *Frontiers in Aging Neuroscience* 13(April):1–17.
- Raha, Animesh Alexander, Radhika Anand Vaishnav, Robert Paul Friedland, Adrian Bomford, and Ruma Raha-Chowdhury. 2013. "The Systemic Iron-Regulatory Proteins Hepcidin and Ferroportin Are Reduced in the Brain in Alzheimer's Disease." *Acta Neuropathologica Communications* 1(55).
- Ramos, Patrícia, Agostinho Santos, Nair Rosas Pinto, Ricardo Mendes, Teresa Magalhães, and Agostinho Almeida. 2014. "Iron Levels in the Human Brain: A Post-Mortem Study of Anatomical Region Differences and Age-Related Changes." *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 28(1):13–17.
- Rasmussen, MK, H. Mestre, and M. Nedergaard. 2018. "The Glymphatic Pathway in Neurological Disorders." *Lancet Neurology* 17(11):1016–24.
- Reusche, E. 1991. "Silver Staining of Senile Plaques and Neurofibrillary Tangles in Paraffin Sections: A Simple and Effective Method." *Pathology - Research and Practice* 187(8):1045–49.
- Rius-Pérez, S., A. M. Tormos, S. Pérez, and R. Taléns-Visconti. 2018. "Vascular Pathology: Cause or Effect in Alzheimer Disease?" *Neurologia* 33(2):121–28.
- Rogers, Jack T., Vivek Venkataramani, Cecilia Washburn, Yanyan Liu, Vinusha Tummala, Hong Jiang, Ann Smith, and Catherine M. Cahill. 2016. "A Role for Amyloid Precursor Protein Translation to Restore Iron Homeostasis and Ameliorate Lead (Pb) Neurotoxicity." *Journal of Neurochemistry* 479–94.
- Rojo, E. 2014. "Enfermedad de Alzheimer. Nuevos Criterios Diagnósticos e Implicaciones En La Practica Clínica." *Anales de La Real Academia de Medicina y Cirugia de Valladolid* 51:67–75.
- Sacuiu, S. F. 2016. "Dementias." Pp. 123–51 in *Handbook of Clinical Neurology*. Vol. 138, edited by E. C. Rosano, M.A. Ikram, and M. Ganguli.
- Sayre, Lawrence M., George Perry, Peggy L. R. Harris, Yahua Liu, Kathryn A. Schubert, and Mark A. Smith. 2000. "In Situ Oxidative Catalysis by Neurofibrillary Tangles and Senile Plaques in Alzheimer's Disease." *Journal of Neurochemistry* 74(1):270–79.
- Schiavolin, Silvia, Giorgia Camarda, Alessia Mazzucchelli, Arianna Mariniello, and Giulia Marinoni. 2024. "Cognitive and Psychological Characteristics in Patients with Cerebral Amyloid Angiopathy : A Literature Review." *Neurological Sciences* 45(7):3031–49.
- Seo, Seung Jun, Won Seok Chang, Jae Geun Jeon, Younshick Choi, Eun Ho Kim, and Jong Ki Kim. 2021. "Proton Stimulation Targeting Plaque Magnetite Reduces Amyloid- $\beta$  Plaque and Iron Redox Toxicity and Improves Memory in an Alzheimer's Disease Mouse Model." *Journal of Alzheimer's Disease* 84(1):377–92.
- Shen, Zhiwei, Jianfeng Lei, Xueyuan Li, Zhanjing Wang, Xinjie Bao, and Renzhi Wang. 2018. "Multifaceted Assessment of the APP/PS1 Mouse Model for Alzheimer's Disease: Applying MRS, DTI, and ASL." *Brain Research* 1698(July):114–20.
- Singh, Neena, Swati Haldar, Ajai K. Tripathi, Katharine Horback, Joseph Wong, Deepak Sharma, Amber Beserra, Srinivas Suda, Charumathi Anbalagan, Som Dev, Chinmay K. Mukhopadhyay, and Ajay Singh. 2014. "Brain Iron Homeostasis: From Molecular Mechanisms to Clinical Significance and Therapeutic Opportunities." *Antioxidants and Redox Signaling* 20(8):1324–63.
- Smith, Mark A., Peggy L. R. Harris, Lawrence M. Sayre, and George Perry. 1997. "Iron Accumulation in Alzheimer Disease Is a Source of Redox-Generated Free Radicals." *Proceedings of the National Academy*

*of Sciences of the United States of America* 94(18):9866–68.

- Solis, E., KN Hascup, and ER Hascup. 2020. "Alzheimer's Disease: The Link Between Amyloid- $\beta$  and Neurovascular Dysfunction." *J Alzheimers Dis.* 76(4):1179–98.
- Spotorno, Nicola, Julio Acosta-Cabronero, Erik Stomrud, Björn Lampinen, Olof T. Strandberg, Danielle van Westen, and Oskar Hansson. 2020. "Relationship between Cortical Iron and Tau Aggregation in Alzheimer's Disease." *Brain* 143(5):1341–49.
- Sternberg, Zohara, Zihua Hu, Daniel Sternberg, Shayan Waseh, Joseph F. Quinn, Katharine Wild, Jeffrey Kaye, Lin Zhao, and Michael Garrick. 2017. "Serum Hepcidin Levels, Iron Dyshomeostasis and Cognitive Loss in Alzheimer'S Disease." *Aging and Disease* 8(2):215–27.
- Sugawara, Etsuko, and Hiroshi Nikaido. 2014. "Properties of AdeABC and AdelJK Efflux Systems of Acinetobacter Baumannii Compared with Those of the AcrAB-TolC System of Escherichia Coli." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58(12):7250–57.
- Tahami-Monfared, Amir Abbas, Michael J. Byrnes, Leigh Ann White, and Quanwu Zhang. 2022. "Alzheimer's Disease: Epidemiology and Clinical Progression." *Neurology and Therapy* 11(2):553–69.
- Tang, Yu, and Weidong Le. 2016. "Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases." *Molecular Neurobiology* 53(2):1181–94.
- Telling, Neil D., James Everett, Joanna F. Collingwood, Jon Dobson, Gerrit van der Laan, Joseph J. Gallagher, Jian Wang, and Adam P. Hitchcock. 2017. "Iron Biochemistry Is Correlated with Amyloid Plaque Morphology in an Established Mouse Model of Alzheimer's Disease." *Cell Chemical Biology* 24(10):1205-1215.e3.
- Tolivia, Jorge, Ana Navarro, Eva Del Valle, Cristina Perez, Cristina Ordoñez, and Eva Martínez. 2006. "Application of Photoshop and Scion Image Analysis to Quantification." *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* 28(1):43–53.
- Toriello, María, Vicente González-Quintanilla, and Julio Pascual. 2021. "The Glymphatic System and Its Involvement in Disorders of the Nervous System." *Medicina Clinica* 156(7):339–43.
- Tsatsanis, Andrew, Bruce X. Wong, Adam P. Gunn, Scott Ayton, Ashley I. Bush, David Devos, and James A. Duce. 2020. "Amyloidogenic Processing of Alzheimer's Disease  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein Induces Cellular Iron Retention." *Molecular Psychiatry* 25(9):1958–66.
- Tsatsanis, Andrew, Bruce X. Wong, Adam P. Gunn, Scott Ayton, Ashley I. Bush, and James A. Duce. 2020. "Amyloidogenic Processing of Alzheimer' s Disease  $\beta$  -Amyloid Precursor Protein Induces Cellular Iron Retention." *Molecular Psychiatry*.
- Uchida, Kazuhiko. 2022. "Waste Clearance in the Brain and Neuroinflammation: A Novel Perspective on Biomarker and Drug Target Discovery in Alzheimer's Disease." *Cells* 11(5):919.
- Uchida, Yuto, Hirohito Kan, Keita Sakurai, Yoshihiko Horimoto, Emi Hayashi, Akihiko Iida, Nobuyuki Okamura, Kenichi Oishi, and Noriyuki Matsukawa. 2022. "APOE E4 Dose Associates with Increased Brain Iron and  $\beta$ -Amyloid via Blood-Brain Barrier Dysfunction." *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 93(7):772–78.
- Uchida, Yuto, Hirohito Kan, Keita Sakurai, Kenichi Oishi, and Noriyuki Matsukawa. 2022. "Quantitative Susceptibility Mapping as an Imaging Biomarker for Alzheimer's Disease: The Expectations and Limitations." *Frontiers in Neuroscience* 16(August):1–17.
- Uddin, Md Sahab, Md Tanvir Kabir, Md Sohanur Rahman, Tapan Behl, Philippe Jeandet, Ghulam Md Ashraf, Agnieszka Najda, May N. Bin-Jumah, Hesham R. El-Seedi, and Mohamed M. Abdel-Daim. 2020. "Revisiting the Amyloid Cascade Hypothesis: From Anti-A $\beta$  Therapeutics to Auspicious New Ways for Alzheimer's Disease." *International Journal of Molecular Sciences* 21(16):1–33.

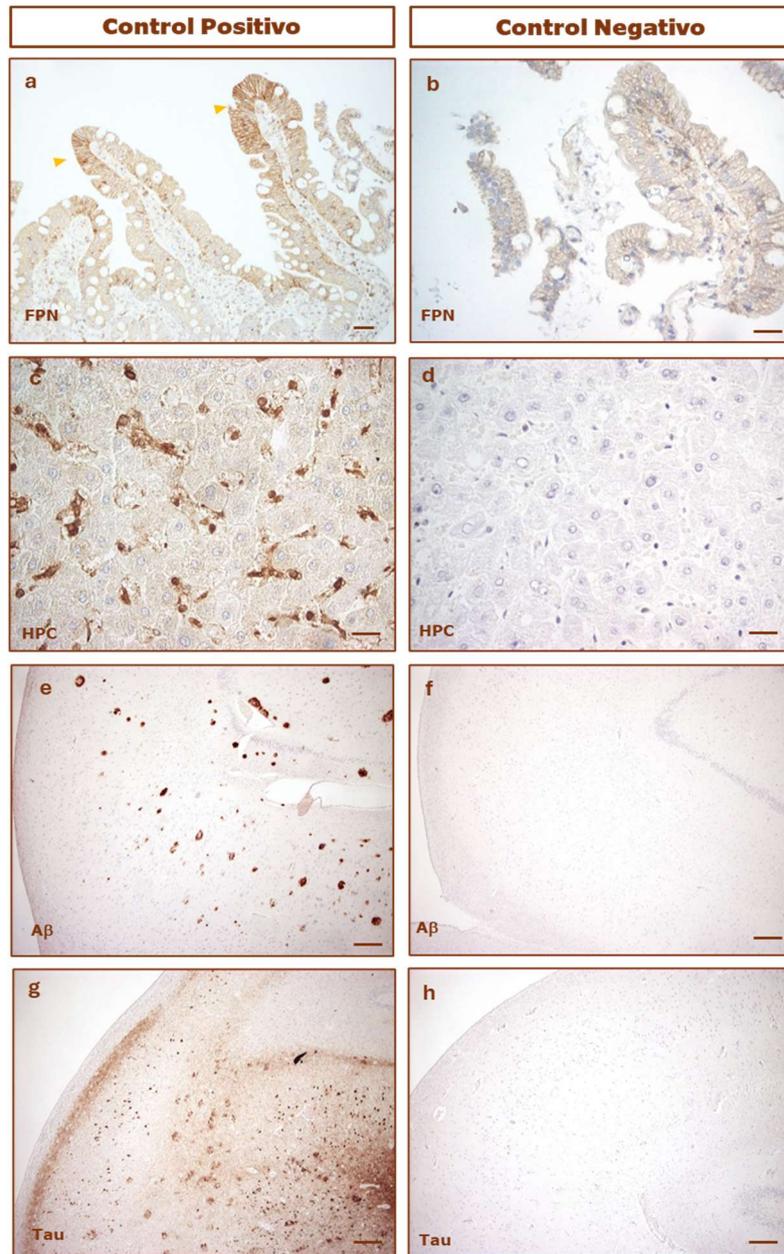
- Urrutia, Pamela, Pabla Aguirre, Andrés Esparza, Victoria Tapia, Natalia P. Mena, Miguel Arredondo, Christian González-Billault, and Marco T. Núñez. 2013. "Inflammation Alters the Expression of DMT1, FPN1 and Hcpidin, and It Causes Iron Accumulation in Central Nervous System Cells." *Journal of Neurochemistry* 126(4):541–49.
- Urrutia, Pamela J., Etienne C. Hirsch, Christian González-Billault, and Marco T. Núñez. 2017. "Hcpidin Attenuates Amyloid Beta-Induced Inflammatory and pro-Oxidant Responses in Astrocytes and Microglia." *Journal of Neurochemistry* 142(1):140–52.
- Valensin, Daniela, Chiara Gabbiani, and Luigi Messori. 2012. "Metal Compounds as Inhibitors of  $\beta$ -Amyloid Aggregation. Perspectives for an Innovative Metallotherapeutics on Alzheimer's Disease." *Coordination Chemistry Reviews* 256(19–20):2357–66.
- Vela, Driton. 2018. "Hcpidin, an Emerging and Important Player in Brain Iron Homeostasis." *Journal of Translational Medicine* 16(1).
- Verheggen, Inge C. M., Whitney M. Freeze, Joost J. A. de Jong, Jacobus F. A. Jansen, Alida A. Postma, Martin P. J. van Boxtel, Frans R. J. Verhey, and Walter H. Backes. 2021. "Application of Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging in the Assessment of Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Integrity." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 127:171–83.
- Verheggen, Inge C. M., Joost J. A. de Jong, Martin P. J. van Boxtel, Ed H. B. M. Gronenschild, Walter M. Palm, Alida A. Postma, Jacobus F. A. Jansen, Frans R. J. Verhey, and Walter H. Backes. 2020. "Increase in Blood-Brain Barrier Leakage in Healthy, Older Adults." *GeroScience* 42(4):1183–93.
- Villarejo, A., and V. Puertas-Martín. 2011. "Utilidad de Los Test Breves En El Cribado de Demencia." *Neurologia* 26(7):425–33.
- Wakasaya, Yasuhito, Takeshi Kawarabayashi, Mitsunori Watanabe, Yukiko Yamamoto-Watanabe, Ayumi Takamura, Tomoko Kurata, Tetsuro Murakami, Koji Abe, Kiyofumi Yamada, Koichi Wakabayashi, Atsushi Sasaki, David Westaway, Peter St George Hyslop, Etsuro Matsubara, and Mikio Shoji. 2011. "Factors Responsible for Neurofibrillary Tangles and Neuronal Cell Losses in Tauopathy." *Journal of Neuroscience Research* 89(4):576–84.
- Wan, Wenbin, Lan Cao, Bill Kalionis, Padma Murthi, Shijin Xia, and Yangtai Guan. 2019. "Iron Deposition Leads to Hyperphosphorylation of Tau and Disruption of Insulin Signaling." *Frontiers in Neurology* 10(JUN):1–13.
- Wang, Dan, Yan Ying Li, Jian Hua Luo, and Yue Hua Li. 2014. "Age-Related Iron Deposition in the Basal Ganglia of Controls and Alzheimer Disease Patients Quantified Using Susceptibility Weighted Imaging." *Archives of Gerontology and Geriatrics* 59(2):439–49.
- Wang, Feixue, Jiandong Wang, Ying Shen, Hao Li, Wolf Dieter Rausch, and Xiaobo Huang. 2022. "Iron Dyshomeostasis and Ferroptosis: A New Alzheimer's Disease Hypothesis?" *Frontiers in Aging Neuroscience* 14(March):1–14.
- Wang, Jian, Jiaying Fu, Yuanxin Zhao, Qingqing Liu, Xiaoyu Yan, and Jing Su. 2023. "Iron and Targeted Iron Therapy in Alzheimer's Disease." *International Journal of Molecular Sciences* 24(22).
- Wang, Tao, Shuang Feng Xu, Yong Gang Fan, Lin Bo Li, and Chuang Guo. 2019. "Iron Pathophysiology in Alzheimer's Diseases." Pp. 67–104 in *Brain Iron Metabolism and CNS Diseases*. Vol. 1173. Springer, Singapore.
- Weisman, David, Edwin Hakimian, and Gilbert J. Ho. 2006. "Interleukins, Inflammation, and Mechanisms of Alzheimer's Disease." Pp. 505–30 in *Vitamins and Hormones*. Vol. 74. Vitam Horm.
- Wilson, David M., Mark R. Cookson, Ludo Van Den Bosch, Henrik Zetterberg, David M. Holtzman, and Ilse Dewachter. 2023. "Hallmarks of Neurodegenerative Diseases." *Cell* 186(4):693–714.

- Wu, L., A. G. Miria. Leenders, Sharon Cooperman, Esther Meyron-Holtz, Sophia Smith, William Land, Robert Y. L. Tsai, Urs V. Berger, Zu Hang Sheng, and Tracey A. Rouault. 2004. "Expression of the Iron Transporter Ferroportin in Synaptic Vesicles and the Blood-Brain Barrier." *Brain Research* 1001(1–2):108–17.
- Wu, Wenda, Xuezhen Xue, Yan Chen, Ning Zheng, and Jichuang Wang. 2022. "Targeting Prolyl Isomerase Pin1 as a Promising Strategy to Overcome Resistance to Cancer Therapies." *Pharmacological Research* 184(September):106456.
- Xian-Hui, Dong, Gao Wei-Juan, Shao Tie-Mei, Xie Hong-Lin, Bai Jiang-Tao, Zhao Jing-Yi, and Chai Xi-Qing. 2015. "Age-Related Changes of Brain Iron Load Changes in the Frontal Cortex in APPswe/PS1 $\delta$ E9 Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease." *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 30:118–23.
- Xu, He, David I. Finkelstein, and Paul A. Adlard. 2014. "Interactions of Metals and Apolipoprotein e in Alzheimer's Disease." *Frontiers in Aging Neuroscience* 6(JUN):1–7.
- Xu, Yong, Yating Zhang, Jian Hua Zhang, Kang Han, Xinwei Zhang, Xue Bai, Lin Hao You, Peng Yu, Zhenhua Shi, Yan Zhong Chang, and Guofen Gao. 2020. "Astrocyte Hecidin Ameliorates Neuronal Loss through Attenuating Brain Iron Deposition and Oxidative Stress in APP/PS1 Mice." *Free Radical Biology and Medicine* 158:84–95.
- Yamamoto, Akira, Ryong Woon Shin, Kazuhiro Hasegawa, Hironobu Naiki, Hiroyuki Sato, Fumio Yoshimasu, and Tetsuyuki Kitamoto. 2002. "Iron (III) Induces Aggregation of Hyperphosphorylated  $\tau$  and Its Reduction to Iron (II) Reverses the Aggregation: Implications in the Formation of Neurofibrillary Tangles of Alzheimer's Disease." *Journal of Neurochemistry* 82(5):1137–47.
- Yanase, Ken, Naoya Uemura, Yoichi Chiba, Ryuta Murakami, Ryuji Fujihara, Koichi Matsumoto, Gotaro Shirakami, Nobukazu Araki, and Masaki Ueno. 2020. "Immunoreactivities for Hecidin, Ferroportin, and Hephaestin in Astrocytes and Choroid Plexus Epithelium of Human Brains." *Neuropathology* 40(1):75–83.
- Yanatori, Izumi, and Fumio Kishi. 2019. "DMT1 and Iron Transport." *Free Radical Biology and Medicine* 133:55–63.
- Zecca, Luigi, Moussa B. H. Youdim, Peter Riederer, James R. Connor, and Robert R. Crichton. 2004. "Iron, Brain Ageing and Neurodegenerative Disorders." *Nature Reviews Neuroscience* 5(11):863–73.
- Zechel, S., and K. Huber-Wittmer. 2006. "Distribution of the Iron-Regulating Protein Hecidin in the Murine Central Nervous System." *Journal of Neuroscience Research* 84:790–800.
- Zhang, Chao, Christopher Qian, Guang Yang, Yu Xin Bao, and Zhong Ming Qian. 2021. "Hecidin Inhibits Autophagy in Intracerebral Hemorrhage Models in Vitro and in Vivo." *Molecular and Cellular Neuroscience* 111(January):103589.
- Zhang, Shuting, Chunyan Lei, Peng Liu, Mingming Zhang, Wendan Tao, Hua Liu, and Ming Liu. 2015. "Association between Variant Amyloid Deposits and Motor Deficits in FAD-Associated Presenilin-1 Mutations: A Systematic Review." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 56:180–92.
- Zhao, Zhen, Amy R. Nelson, Christer Betsholtz, and Berislav V. Zlokovic. 2015. "Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier." *Cell* 163(5):1064–78.
- Zlokovic, Berislav V. 2011. "Neurovascular Pathways to Neurodegeneration in Alzheimer's Disease and Other Disorders." *Nature Reviews Neuroscience* 12(12).
- Zou, Zhenyou, Fengyao Wu, Liguan Chen, Hua Yao, Zengxian Wang, Yongfeng Chen, Ming Qi, Yang Jiang, Longhua Tang, Xinying Gan, Lingjia Kong, Zhicheng Yang, Xiaolan Huang, Wei Shu, Bixue Li, Xinyu Tan, Liwen Huang, Shi Bai, Lijuan Wu, Jinping Mo, Huilin Hu, Huihua Liu, Ruyi Zou, and Yuhua Wei. 2024. "The J Bs-5YP Peptide Can Alleviate Dementia in Senile Mice by Restoring the Transcription of Slc40a1 to Secrete the Excessive Iron from Brain." *Journal of Advanced Research* (xxxx).



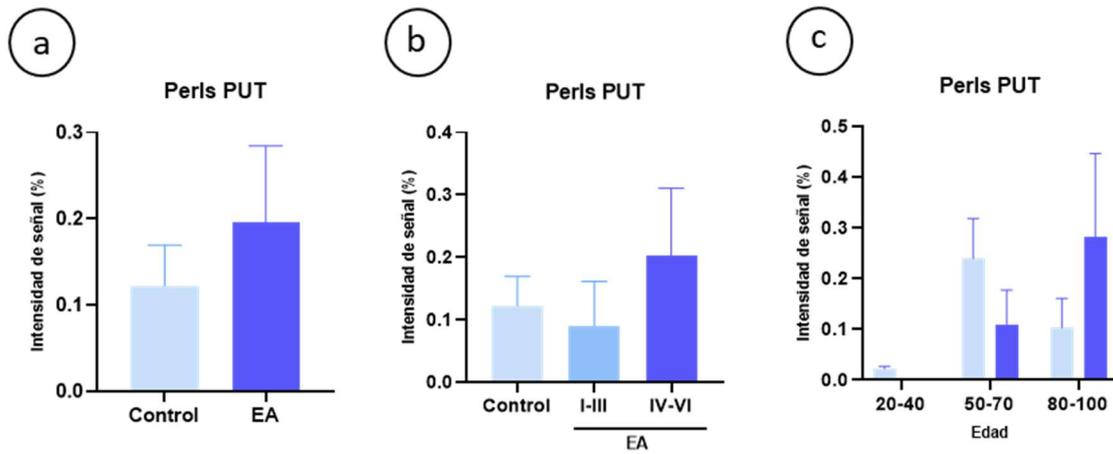
## 8.-ANEXOS

Figura suplementaria S1



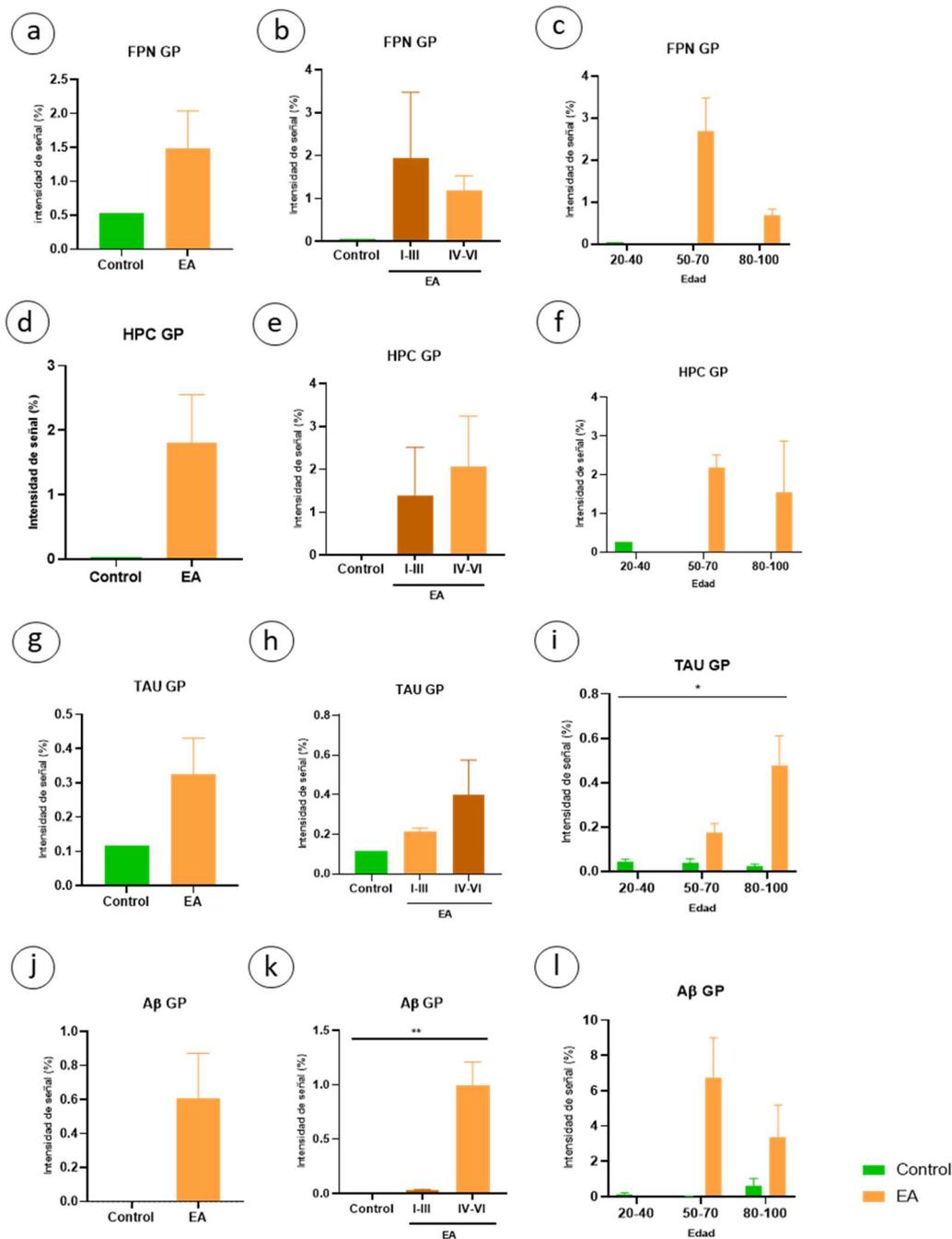
**Figura S1.-** Controles inmunohistoquímicos para los anticuerpos utilizados en el estudio. A la izquierda el control positivo revelado con DAB (marrón) y con tinción de contraste azul para los núcleos de las células. A la derecha el control negativo, se han realizado los mismos pasos excepto incubación con el anticuerpo primario. **(a)** Control positivo para el anticuerpo de ferroportina (FPN) en intestino de un paciente control de 41 años. Nótese el marcaje marrón de la membrana de los enterocitos (cabeza de flecha). Aumento de 20x. Barra 20  $\mu\text{m}$ . **(b)** Control negativo para el anticuerpo FPN en el mismo intestino humano. Aumento de 40x. Barra 30  $\mu\text{m}$ . **(c)** Control positivo para el anticuerpo de hepcidina (HPC) en hígado humano. Existe señal positiva en las células esperadas, células endoteliales y células de Kuffer. Aumento de 40x. Barra 20  $\mu\text{m}$ . **(d)** Control negativo para el anticuerpo HPC, donde no se ha incubado con el anticuerpo primario. Aumento de 20x. Barra 20  $\mu\text{m}$ . **(e)** Control positivo para el anticuerpo para beta amiloide ( $A\beta$ ) en el hipocampo de un hombre de 77 con EA Braak IV. Aumento de 4x. Barra 200  $\mu\text{m}$ . **(f)** Control negativo sin anticuerpo para  $A\beta$  en el hipocampo de una mujer control de 100 años. Aumento de 4x. Barra 200  $\mu\text{m}$  **(g)** Control positiva para Tau en el hipocampo de un hombre de 68 con EA Braak VI. Aumento de 4x. Barra 200  $\mu\text{m}$  **(h)** Control negativo para Tau en el hipocampo de una mujer de 61 años con EA Braak VI. Aumento de 4x. Barra 200  $\mu\text{m}$ .

Figura suplementaria S2



**Figura S2.-** Representación gráfica de la intensidad de marcaje para Azul de Prusia tras la reacción de Perls en el putamen (PUT). Las gráficas **a**, **b** y **c** muestran el porcentaje de intensidad de marcaje medio  $\pm$  SEM de pacientes EA respecto a los controles.

Figura suplementaria S3



**Figura S3-** Representación gráfica de la intensidad de marcaje para FPN, HPC, Tau y A $\beta$  en el globo pálido (GP). Las gráficas **a, d, g, j** muestran el porcentaje de intensidad de marcaje medio  $\pm$  SEM de FPN, HPC, Tau y A $\beta$  de pacientes EA respecto a los controles. En las gráficas **b, e, h, k** se representa el porcentaje de intensidad de marcaje medio  $\pm$  SEM de FPN, HPC, Tau y A $\beta$  de pacientes EA separados en dos grupos, EA leve (Braak del I-III) y grave (Braak del IV-VI), respecto a los controles. En ambos casos el análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. \* = diferencias estadísticamente significativas versus control \*  $p < 0,05$ . Las gráficas **c, f, i, l** muestran el porcentaje de intensidad de marcaje medio  $\pm$  SEM de FPN, HPC, Tau y A $\beta$  de pacientes EA respecto a los controles separados por grupos de edad, jóvenes (20-40), adultos (50-70) y ancianos (80-100). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de dos factores seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. \* = diferencias estadísticamente significativas entre grupos de edad \*  $p < 0,05$ ; \*\* = diferencias estadísticamente significativas entre grupos de EA \*\*  $p < 0,05$ ;

## Figuras suplementarias S4

Tabla S5.- Coeficiente de correlación de la prueba  $\rho$  de Spearman entre los marcadores patológicos de la patología, Tau y A $\beta$  y las proteínas del transporte del hierro, ferroportina (FPN) y hepcidina (HPC) en CA1 del hipocampo.

R de Spearman	Edad-CTRL	Edad-EA	Estadio Braak
<b>FPN</b>	0,6147	<b>0,8858</b>	<b>0,4665</b>
<b>HPC</b>	0,3742	<b>0,7800</b>	0,1071
<b>Tau</b>	<b>0,7483</b>	<b>0,7902</b>	<b>0,8125</b>
<b>A<math>\beta</math></b>	0,4543	<b>0,6591</b>	<b>0,6694</b>

Tabla S6.- Coeficiente de correlación de la prueba  $\rho$  de Spearman entre los marcadores patológicos de la patología, Tau y A $\beta$  y las proteínas del transporte del hierro, FPN y HPC en la corteza entorrinal (CENT).

R de Spearman	Edad-CTRL	Edad-EA	Estadio Braak
<b>FPN</b>	<b>0,8463</b>	<b>0,7223</b>	0,4368
<b>HPC</b>	0,4722	<b>0,8427</b>	0,1199
<b>Tau</b>	<b>0,8107</b>	<b>0,6621</b>	<b>0,8557</b>
<b>A<math>\beta</math></b>	0,6441	0,5718	<b>0,8004</b>

Tabla S7.- Coeficiente de correlación de la prueba  $\rho$  de Spearman entre los marcadores patológicos de la patología, Tau y A $\beta$  y las proteínas del transporte del hierro, FPN y HPC en el putamen (PUT) de los ganglios basales.

R de Spearman	Edad-CTRL	Edad-EA	Estadio Braak
<b>FPN</b>	0,4900	<b>0,8340</b>	0,2469
<b>HPC</b>	0,4900	<b>0,8131</b>	-0,2899
<b>Tau</b>	-0,3207	<b>0,9163</b>	<b>0,8180</b>
<b>A<math>\beta</math></b>	0,3936	<b>0,739</b>	<b>0,5855</b>

## ÍNDICE

<b>1.-INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
1.1.- Etiología, patogenia y patocronia.....	8
1.2.- Diagnóstico diferencial de la Enfermedad de Alzheimer.....	12
1.3.- Criterios de diagnóstico anatomopatológicos de la Enfermedad de Alzheimer.....	13
1.4.- Teorías sobre el origen de la Enfermedad de Alzheimer.....	21
1.4.1.- Papel del péptido amiloide en la progresión de la Enfermedad de Alzheimer.....	22
1.4.2.- Papel de la proteína Tau en la Enfermedad de Alzheimer.....	27
1.4.3.- Teoría vascular de la EA.....	30
1.4.4.- Teoría de la clarificación de productos tóxicos en la Enfermedad de Alzheimer.....	32
1.5.- Importancia del ion hierro en la progresión de Enfermedad de Alzheimer.....	34
1.5.1.- El hierro como molécula imprescindible en el sistema nervioso.....	34
1.5.2.-Metabolismo y transporte del hierro en el sistema nervioso central.....	36
1.5.3.- Regulación del hierro.....	38
1.5.4.-Distribución del hierro en el cerebro.....	40
1.5.5.-Regulación del hierro en la Enfermedad de Alzheimer.....	41
1.5.6.- Técnicas para cuantificar el hierro en el sistema nervioso central.....	44
<b>2.-HIPÓTESIS DE PARTIDA Y OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
<b>3.-MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
3.1.-Obtención de muestras.....	47
3.2.-Procesamiento de muestras.....	49
3.3.- Histoquímica.....	50
3.4.- Inmunohistoquímica.....	50
3.5.- Registro del hierro utilizando LA-ICP-MS.....	50

3.6.- Observación de muestras y captación de imágenes.....	53
3.7.- Análisis de imágenes inmunohistoquímicas.....	54
3.8.- Análisis estadístico.....	55
<b>4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>57</b>
4.1.- Detección de hierro cerebral mediante técnicas histoquímicas.....	57
4.2.- La cantidad de hierro, medida con técnicas analíticas, se incrementa en la CA1 de cerebros con Enfermedad de Alzheimer, pero su distribución es diferente entre capas.....	61
4.3.- La expresión de la FPN aumenta en la corteza temporal y los ganglios basales con la edad y en la enfermedad de Alzheimer.....	67
4.4.- La mayor cantidad de hierro en la CA1 del hipocampo no se correlaciona con una mayor cantidad de FPN en la enfermedad de Alzheimer.....	77
4.5.- La expresión de la HPC aumenta en la corteza temporal y los ganglios basales con la edad, pero no en la enfermedad de Alzheimer.....	80
4.6.- Colocalización del hierro, las proteínas transportadoras y los marcadores clásicos de la enfermedad de Alzheimer.....	87
<b>5.- DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>103</b>
<b>6.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>115</b>
<b>7.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>117</b>
<b>8.- ANEXOS.....</b>	<b>133</b>

## 1.-INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno del cerebro que se caracteriza por destruir de forma paulatina la memoria y las habilidades del pensamiento, llegando a impedir la capacidad de realizar las tareas de la vida cotidiana y, finalmente, producir el fallecimiento de la persona que la sufre. La EA fue descubierta por Alois Alzheimer en 1906, al identificar y describir las lesiones encefálicas que padecía una paciente que falleció a causa de un trastorno mental (Graeber 1999). En la actualidad la EA es la forma más común de demencia y está detrás de aproximadamente el 75% de las personas que sufren daños cerebrales relacionados con la senilidad. A nivel mundial, se estima que entre 18 y 22 millones de personas están afectadas, con una prevalencia que oscila entre el 3% y el 15%, y una incidencia anual que va del 0,3% al 0,7% (Tahami-Monfared et al. 2022). Estudios recientes señalan que en 2050 la prevalencia de la EA podría llegar a duplicarse en Europa, e incluso a triplicarse a nivel mundial (Anon 2018).

La EA se diagnostica basándose en el historial médico, pruebas del estado mental, hallazgos clínicos e imágenes cerebrales. Los individuos que albergan los cambios descritos pueden ser asintomáticos o pueden presentar manifestaciones clínicas que van desde lapsos de memoria hasta una pérdida grave y debilitante de ésta, así como de la función cognitiva. A medida que avanza la EA pueden aparecer síntomas neuropsiquiátricos adicionales, incluidos períodos de confusión, desorientación, cambios de humor, agresión/agitación y, finalmente, delirios/alucinaciones en etapas posteriores. La demencia es pues, uno de los síntomas más comunes, siendo compartido por otras enfermedades neurodegenerativas (ENs), un conjunto de trastornos neurológicos que como su nombre indica llevan a la pérdida y/o disfunción de las células del sistema nervioso central (SNC) de una forma progresiva (Wilson et al. 2023). La pérdida neuronal, junto con la de las redes de comunicación establecidas entre ellas, es lo que culmina en las manifestaciones clínicas de características propias de cada tipo de demencia. Por ello se hace importante ahondar en la clasificación tanto de las demencias como de las ENs, lo cual nos ayudará a entender mejor lo que ocurre en la EA.

A pesar de todo, la confirmación diagnóstica de la EA solo puede realizarse después de la muerte, relacionando los datos clínicos con el estudio anatómico del órgano e histológico de sus diferentes áreas cerebrales en el momento de la autopsia (Uddin et al. 2020). En términos generales, el cerebro de un paciente de EA presenta una atrofia significativa y un aumento de los ventrículos cerebrales. Además, El rasgo anatomopatológico característico de esta enfermedad incluye la pérdida de neuronas y sinapsis, la presencia de ovillos neurofibrilares intraneuronales (ONF) y placas seniles (PS)

(Derry et al. 2020; Lei, Ayton, and Bush 2021). Los ONF consisten en acumulaciones de filamentos helicoidales de proteína tau hiperfosforilada. Las PS están compuestas por depósitos extracelulares de filamentos de  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), rodeados por procesos neuríticos y gliales alterados. Además, contienen trazas de metales como zinc, cobre, aluminio y hierro en concentraciones variables, que también se encuentran cerca de los ovillos. Dado que resulta complejo establecer una secuencia temporal clara de estos cambios patológicos, se han propuesto dos hipótesis sobre el origen de la EA basadas en estos procesos (Derry et al. 2020).

Teniendo esto en cuenta, resulta muy complicado establecer una secuencia temporal de los cambios fisiopatológicos, por ello se han formulado varias hipótesis del origen de la EA relacionadas con ellos, de las que hablaremos a continuación.

### **1.1.- Etiología, patogenia y patocronia**

La EA es considerada una enfermedad multifactorial asociada con numerosos factores de riesgo tales como la edad, la genética, infecciones, patologías vasculares, daños cerebrales previos, y factores medioambientales como la exposición a metales pesados. No obstante, los cambios cerebrales en los pacientes con EA no tienen una causa conocida aún (Breijyeh and Karaman 2020).

Desde el punto de vista etiológico la EA se puede clasificar en dos tipos:

- La EA de tipo familiar (fEA) o genética ocurre en alrededor del 10% de los casos. Se caracteriza por una herencia autosómica dominante de presentación temprana, por lo que se le conoce también como EOAD (del inglés *early onset Alzheimer's disease*). Se produce como consecuencia de mutaciones en diversos genes que promueven el acúmulo descontrolado de la  $A\beta$ , y que llevan a padecer la patología. Algunos de los genes afectados son el gen de la proteína precursora amiloide (PPA) que se sitúa en el cromosoma 21, el gen de la presenilina 1 (PSEN1) localizado en el cromosoma 14, y el gen de la presenilina 2 (PSEN2) en el cromosoma 1 (Guimerà, Gironès, and Cruz-sánchez 2002).
- La EA de tipo esporádica (eEA) es el tipo más común de EA. La etiopatogenia sigue siendo compleja y se reconoce como multifactorial, ya que, aunque puede existir cierta predisposición genética en algunos casos, no ocurre así en otros, y además su desarrollo se encuentra influenciado por factores ambientales conocidos. El factor de riesgo más relevante para esta neuropatología es la edad, aunque la patología puede comenzar posiblemente 20-30 años antes del inicio de la clínica (Derry et al. 2020; Lei et al. 2021). Los casos que se

presentan en personas mayores de 65 años se engloban en lo que se conoce como Demencia Senil tipo Alzheimer, y se corresponde también con el llamado Alzheimer senil o tardío o LOAD (del inglés *late onset Alzheimer's disease*). No obstante, se han identificado diversos factores genéticos que aumentan el riesgo de padecerla, como por ejemplo la presencia del alelo  $\epsilon 4$  de la apolipoproteína E (gen *APOE*), que se encuentra en el cromosoma 19 humano (Blom et al. 2008). Entre otros factores de riesgo destacan el sexo (más frecuente en mujeres), los traumatismos craneoencefálicos, hábitos de vida no saludables, inactividad física y síndromes metabólicos (que incluyen diabetes, hipertensión, y obesidad), todos ellos actuando negativamente sobre dianas del parénquima cerebral, y la salud vascular y metabólica del cerebro (Livingston et al. 2020). Las similitudes anatomopatológicas entre las formas autosómica dominante y esporádica sugieren una etiología compartida, pero la evidencia bibliográfica indica que la eEA podría tener un origen diferente (Arnsten et al. 2021).

La EA es una enfermedad neurodegenerativa devastadora, caracterizada por una pérdida progresiva de la memoria y otras capacidades mentales a medida que las células nerviosas (sobre todo neuronas) mueren y diferentes áreas del cerebro se deterioran. Clínicamente, se manifiesta de manera lenta y gradual. Los primeros síntomas están relacionados con el deterioro cognitivo leve que cursa con una pérdida de la "memoria reciente". Posteriormente, se presentan dificultades en la ejecución de los movimientos corporales, confusión, desorientación temporal y espacial, y trastornos del sueño, entre otros (Rojo 2014; Sacuiu 2016). Es común, también, que los pacientes desarrollen anomalías a nivel del lenguaje y cambios en su comportamiento y personalidad, incluyendo depresión, ansiedad o apatía. Por último, de forma ocasional, pueden presentarse características neuropatológicas adicionales tales como convulsiones, mioclonías y paraparesia espástica (Proaño and Aguilar 2004).

El deterioro progresivo de la función cognitiva en personas con EA varía según los elementos cognitivos afectados. Una revisión sistemática en la que se examinaron los puntos de aceleración del deterioro cognitivo, mostró que los déficits de memoria verbal aparecieron primero, seguidos de los relacionados con la capacidad visoespacial, para finalmente afectar a las funciones ejecutivas, a la fluidez y el coeficiente intelectual verbal (Tahami-Monfared et al. 2022).

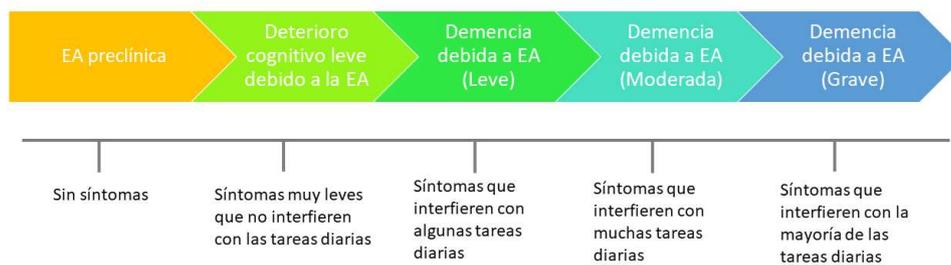
Los síntomas característicos de la EA como las dificultades con la memoria, el lenguaje, la resolución de problemas y otras habilidades de pensamiento que afectan la capacidad de una persona para realizar las actividades de la vida cotidiana son, no obstante, comunes a muchas demencias (Sacuiu

2016). La demencia, por tanto, es un término general que engloba un grupo particular de síntomas que afectan a la función cerebral y que puede ser debidas a varias causas. Se puede, en primera instancia, distinguir entre demencias primarias y secundarias, siendo las primarias degenerativas y progresivas y las secundarias causadas por otras patologías subyacentes (Tabla I). A nivel clínico, es importante realizar un diagnóstico diferencial ante un paciente con sospecha de EA, ya que las demencias secundarias presentan síntomas similares pero la causa de éstas podría ser reversible si se detecta a tiempo (Conde, Navarro, and Olazarán 2015).

*Tabla I.- Causas comunes de demencia en orden de importancia y sus características asociadas. Tomado de "Alzheimer's and Dementia". The Journal of the Alzheimer's Association.*

Causa de la demencia	Características
<b>Enfermedad de Alzheimer (EA)</b>	<p>La EA es la causa más común de demencia y se estima que representa entre el 60% y el 80% de los casos.</p> <p>Las patologías características de la EA son la acumulación del fragmento de proteína beta-amiloide (placas) fuera de las neuronas del cerebro y hebras retorcidas de la proteína Tau (ovillos) dentro de las neuronas.</p>
<b>Demencia cerebrovascular</b>	<p>Se dice que las personas con demencia cuyos cerebros muestran evidencia de enfermedad cerebrovascular tienen demencia vascular. Alrededor del 5 % al 10 % de las personas con demencia muestran evidencia de demencia vascular únicamente.</p>
<b>Demencia de cuerpos de Lewy (DCL)</b>	<p>Las personas con DCL tienen algunos de los síntomas comunes del Alzheimer, pero es más probable que tengan síntomas iniciales o tempranos de alteraciones del sueño, alucinaciones visuales bien formadas y deterioro visuoespacial. Alrededor del 5% de las personas con demencia muestran evidencia de ECL únicamente, pero la mayoría de las personas con DCL también tienen patología de la EA.</p> <p>Presenta cuerpos de Lewy que son agregaciones anormales de la proteína <math>\alpha</math>-sinucleína en las neuronas.</p>
<b>Degeneración del lóbulo frontotemporal (DLFT)</b>	<p>La DLFT incluye demencias como la DLFT variante conductual, la afasia primaria progresiva, la enfermedad de Pick, la degeneración corticobasal y la parálisis supranuclear progresiva.</p> <p>Los primeros síntomas típicos incluyen cambios marcados en la personalidad y el comportamiento y/o dificultad para producir o comprender el lenguaje. A diferencia de la EA, la memoria normalmente se conserva en las primeras etapas de la enfermedad.</p> <p>Presenta inclusiones anormales de proteínas (generalmente proteína Tau o la proteína de unión al ADN de respuesta transactiva, TDP-43)</p>
<b>Enfermedad de Parkinson (EP)</b>	<p>Presenta problemas de movimiento (lentitud, rigidez, temblores y cambios en la marcha) pero también síntomas cognitivos que se desarrollan justo antes de los comentados o más adelante en la enfermedad.</p> <p>Son característicos los cuerpos de Lewy en las neuronas de la sustancia negra.</p>
<b>Esclerosis del hipocampo (EH)</b>	<p>El síntoma más pronunciado de la EH es la pérdida de memoria de hecho, las personas pueden ser diagnosticadas erróneamente con la EA.</p> <p>Los cambios cerebrales de EH suelen ir acompañados de acumulaciones de una forma mal plegada de una proteína llamada TDP-43.</p>
<b>Patologías mixtas</b>	<p>Cuando un individuo presenta cambios cerebrales de más de una causa de demencia, se considera que existe comorbilidad. Cuando estas patologías derivan en síntomas de demencia durante la vida, se dice que la persona tiene demencia mixta.</p>

En este continuo de la enfermedad, se reconocen tres fases: la EA preclínica, el deterioro cognitivo leve (DCL) debido a la EA y demencia debido a la EA (Mayo Clinic 2019). La fase de demencia se divide a su vez en tres etapas (leve, moderada y grave) que reflejan el grado en que los síntomas interfieren con la capacidad de realizar las actividades cotidianas. Si bien se sabe que el continuo comienza con la EA preclínica y termina con la demencia de EA grave, el tiempo que los individuos pasan en cada etapa de la enfermedad varía (Ilustración 1). De hecho, la duración de cada fase del continuo está influenciada por la edad, la genética, el sexo biológico y otros factores (Alzheimer's and Dementia 2021).



*Ilustración 1.-Evolución de enfermedad de Alzheimer (EA). Aunque las flechas son del mismo tamaño, los componentes del continuo EA no tienen la misma duración. Modificado de Alzheimer's and Dementia, 2021.*

Debido a que el envejecimiento normal también implica un deterioro cognitivo sutil, a menudo puede ser difícil distinguir el deterioro cognitivo debido a la EA de aquel asociado con la edad. Síntomas como la disminución de la velocidad de procesamiento, pérdida de ciertas habilidades relacionadas con la memoria o el lenguaje, y alteraciones en las funciones visuoespaciales y ejecutivas, pueden darse en el transcurso del proceso de envejecimiento normal. El deterioro cognitivo leve es una patología que hace que las personas que lo padecen tengan más problemas de memoria o alteraciones del pensamiento que lo esperable para alguien de su edad. Es un proceso relacionado con la pérdida de la "memoria reciente" y los síntomas son comunes a la EA inicial y a otras demencias no Alzheimer (Pettersen 2016).

## 1.2.- Diagnóstico diferencial de la Enfermedad de Alzheimer

Como resultado de los desafíos del diagnóstico y de una percepción histórica de la falta de beneficio de este debido a la ausencia de una terapia eficaz para la enfermedad, el subdiagnóstico es muy común. De hecho, algunas pruebas sugieren que más de la mitad de los pacientes que desarrollan demencia por EA nunca serán diagnosticados formalmente (Tahami-Monfared et al. 2022). Son

muchos y muy variados los tipos de demencia que pueden presentarse, pero ni la clínica ni las marcas anatomopatológicas permiten un diagnóstico claro (Tabla I). La clasificación etiológica de diferentes tipos de demencia ha demostrado ser una tarea difícil, tanto en el ámbito clínico como en el de investigación (Sacuiu 2016). Por ello, el objetivo final de las revisiones continuas de los criterios diagnósticos ha sido siempre el de mejorar la detección de la demencia en estadios leves.

Ya que no existe una prueba única para detectar la demencia debida a la EA, a nivel clínico su diagnóstico se realiza de forma multidisciplinar incluyendo a diferentes especialistas como neurólogos, neuropsicólogos, geriatras y psiquiatras geriátricos. Unas de las demencias que pueden interferir en un correcto diagnóstico de EA son las demencias secundarias a una patología vascular que ocurren como resultado de diferentes lesiones en vasos sanguíneos cerebrales y que disminuyen o interrumpen el flujo de sangre hacia el tejido cerebral. La hipertensión, las alteraciones del ritmo cardíaco, la diabetes y niveles alterados de colesterol son factores de riesgo para la demencia vascular. Los síntomas son muy similares los producidos por la EA en estadios iniciales, por ello es tan importante incluirlas en el diagnóstico diferencial ante la primera sospecha de EA. Además de una anamnesis pormenorizada, historial clínico y estudio sobre el estilo del vida del paciente, el diagnóstico en estos casos se apoya en pruebas de imagen que son clave para determinar si la causa de los síntomas depende de una patología vascular (Garre-Olmo 2018).

Hoy en día, existen test de cribado de demencia, estudiados y validados, que se caracterizan por su brevedad (tiempo de realización menor de 10 minutos) y la posibilidad de ser aplicados en Atención Primaria. Estas pruebas son de gran ayuda para realizar un primer cribado de la posible enfermedad, son sencillos de realizar para el paciente y de fácil aplicación desde un punto de vista clínico. Se pueden dividir en dos grupos, por un lado los test cognitivos breves y por otro lado las escalas funcionales (Villarejo and Puertas-Martín 2011). Del primer grupo destaca el test *Mini-Mental State Examination* o MMSE, utilizado por primera vez en 1975 por Folstein y colaboradores (Folstein, Folstein, and McHugh 1975). Entre ellos también están el *Memory Impairment Screen* (MIS), Fototest, y el Test del reloj. Las escalas funcionales, por su parte, se utilizan para determinar la capacidad de un paciente para realizar ciertas actividades de la vida cotidiana (Martín and Gil 2006). Dentro de ellas encontramos la escala de Lawton y Brody (IADL) que valora 8 áreas funcionales (cuidado del hogar, alimentación, compras, capacidad de usar el teléfono, realizar la colada, medio de transporte, toma de medicación y manejo de las finanzas), la Escala Bayer de actividades de la vida diaria (Bayer-ADL), o el Cuestionario de Actividades Instrumentales (Villarejo and Puertas-Martín 2011).

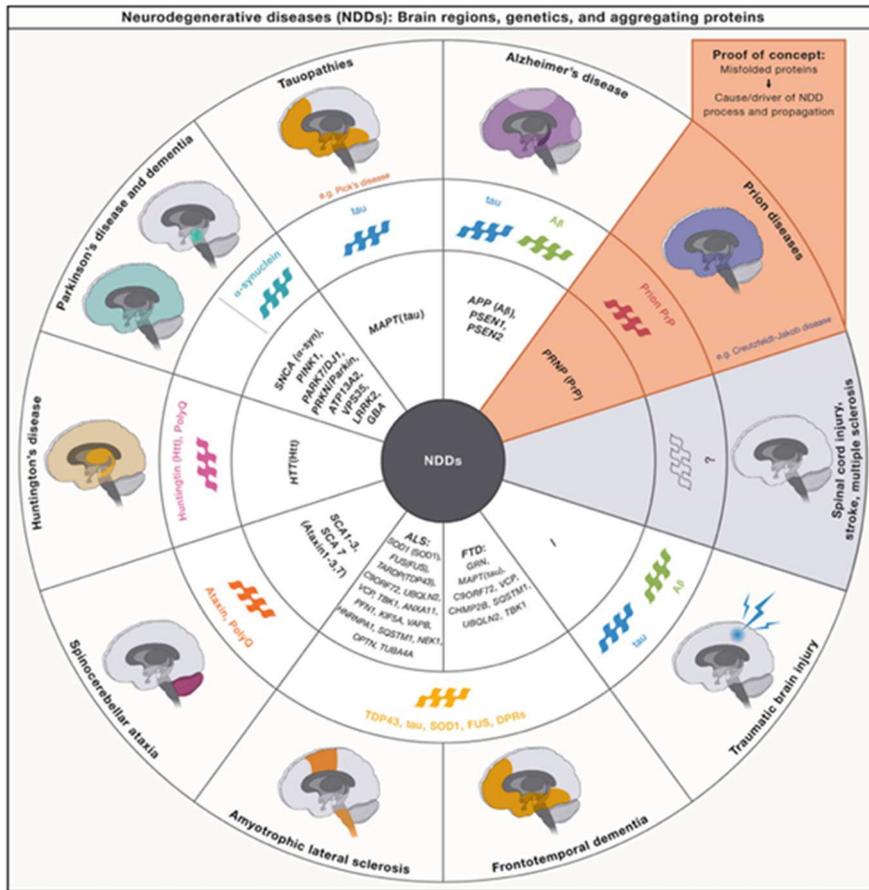
Tradicionalmente y desde un punto de vista únicamente sintomatológico, la EA se ha diagnosticado según los siguientes criterios (Jack et al. 2011):

- a) Demencia clínicamente establecida y documentada mediante un examen formal del estado mental.
- b) Déficits en  $\geq 2$  áreas de la cognición.
- c) Inicio gradual (es decir, de meses a años) y empeoramiento progresivo de la memoria y otras funciones cognitivas, sin alteración en el nivel de consciencia.
- d) Inicio después de los 40 años, generalmente después de los 65.
- e) Sin trastornos sistémicos ni encefálicos (tumores, accidentes cerebrovasculares...) que puedan explicar los síntomas.

### 1.3.- Criterios de diagnóstico anatomopatológicos de la Enfermedad de Alzheimer

Clínicamente y en base a la sintomatología se puede determinar si una persona tiene demencia, sin embargo, resulta difícil identificar el origen exacto. La EA es la causa más común de demencia, pero hay que matizar que los pacientes muestran normalmente síntomas mixtos y superpuestos poniendo de manifiesto, no solo la complejidad y heterogeneidad de la patología, sino los puntos en común con otras ENs (Tabla I). En estos casos, la herramienta que permite el diagnóstico más acertado es el análisis neuropatológico del tejido cerebral *post-mortem*.

A lo largo de los años se han ido describiendo varios tipos de marcadores, más y menos específicos de cada una, que permiten la clasificación de las ENs y su identificación. Uno de los marcadores distintivos de estas patologías es la agregación aberrante de algunas proteínas. Desde el punto de vista patológico, estos trastornos se caracterizan por la presencia de agregados proteicos específicos en las neuronas o las células de glía, denominándose **proteinopatías**. Muchas ENs muestran una posición de la misma proteína, depositada de forma anormal, en regiones anatómicamente distintas, lo que da lugar a patrones específicos con fenotipos clínicos, cognitivos y motores diferentes (Wilson et al. 2023). Las proteínas agregantes características en las ENs incluyen a los péptidos A $\beta$  formados por escisión de la proteína precursora amiloide (PPA) (gen *APP*), la Tau (gen *MAPT*), la  $\alpha$ -sinucleína (gen *SNCA*), la proteína de unión al ADN TAR 43 (TDP-43) (gen *TARDBP*), la superóxido dismutasa [Cu-Zn] (*SOD1*) (gen *SOD1*), las proteínas de repetición de dipéptidos (DPR) (gen *C9orf72*), la proteína de unión al ARN FUS (gen *FUS*), las poliglutaminopatías huntingtina (gen *HTT*) y ataxinas (gen *ATXN*), y la proteína priónica celular (PrPC) (gen *PRNP*) [revisión de (Wilson et al. 2023)] (Ilustración 2).



*Ilustración 2.- Proteínas agregantes más características, genes vinculados y regiones cerebrales afectadas en las Enfermedades Neurodegenerativas (ENS). En el círculo interior (mayúscula, cursiva) se indica una lista no exhaustiva de genes causales y de mayor riesgo vinculados a las diferentes ENS. Tomado de Wilson et al. 2023.*

Actualmente, se sabe que las combinaciones de una o más proteinopatías, con o sin enfermedad cerebrovascular, se dan con frecuencia en un mismo individuo. Además, algunos estudios longitudinales han descrito que esta mezcla de marcadores también se relacionan con los procesos de envejecimiento (Forrest and Kovacs 2023; Wilson et al. 2023). La coexistencia de proteínas agregantes, características de diferentes ENS, en un mismo individuo se llama “copatología” (Forrest and Kovacs 2023). No obstante, aun teniendo en cuenta este detalle, la mayoría de las ENS se caracterizan, como hemos dicho, por el predominio de una o dos proteínas agregadas; en el caso de la EA por la agregación de A $\beta$  y Tau, entre las que pueden establecerse interacciones que de alguna forma aceleran el proceso neurodegenerativo (Tahami-Monfared et al. 2022).

Por ejemplo, la demencia con cuerpos de Lewy (DCL) es la tercera demencia en prevalencia, por detrás de la EA y las demencias vasculares. La causa de ésta es la acumulación intracitoplasmática de agregados esféricos y eosinofílicos de  $\alpha$ -sinucleína que forman los cuerpos de Lewy. Estos cuerpos también se identifican en cerebros de pacientes con enfermedad de Parkinson (EP), los cuales desarrollan demencia en estadios avanzados. A veces, los cuerpos de Lewy pueden aparecer en

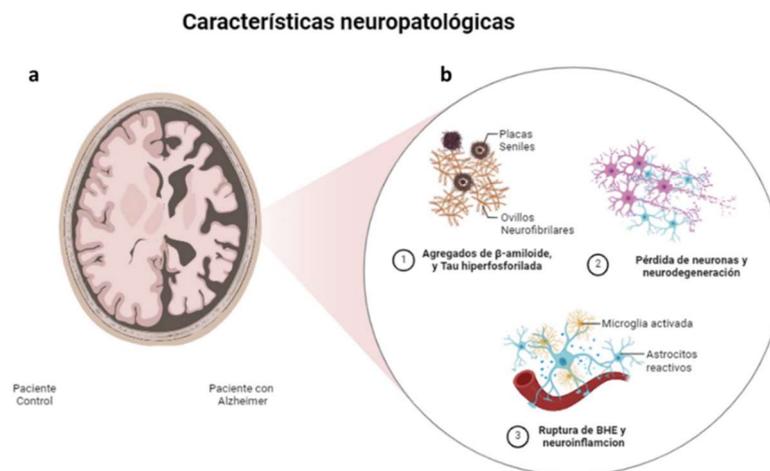
cerebros de pacientes con EA, al igual que en pacientes con DCL se pueden identificar PS y ONF (Forrest and Kovacs 2023). Los síntomas de la DCL incluyen síntomas extrapiramidales (rigidez, bradicinesia o inestabilidad en la marcha), fluctuaciones en las funciones cognitivas (periodos de alerta y orientación que se intercalan con periodos de confusión de forma habitual), o alteración de la memoria y de la capacidad visuoespacial de forma más intensa que en otras demencias, siendo habituales las alucinaciones visuales (Conde et al. 2015).

Las **taupatías** son un grupo clínica y neuropatológicamente heterogéneo de trastornos neurodegenerativos caracterizados por agregados anormales de Tau. Las taupatías pueden ser primarias o secundarias. Las primarias se clasifican según la isoforma Tau y los tipos de células donde ésta se acumule. Entre ellas se incluyen la enfermedad de Pick, la degeneración corticobasal, la parálisis supranuclear progresiva y la enfermedad del grano argirofílico. Las taupatías ambientales o secundarias incluyen la encefalopatía traumática crónica y taupatías geográficamente aisladas, como el complejo Guam-Parkinsoniano-demencia. En ellas, el *splicing* alternativo del gen de la proteína Tau, localizado en el cromosoma 17, da lugar a seis isoformas diferentes. En función de cuál de las seis isoformas se acumule, la enfermedad será y se comportará de forma diferente. En general, la presentación clínica de las taupatías varía según las áreas cerebrales afectadas, aunque, normalmente, se presenta con una combinación de síntomas cognitivos y motores. Como los síntomas se superponen y a menudo coexisten, el diagnóstico clínico preciso de taupatías como la EA y la enfermedad del grano argirófilo, es un desafío al no disponer de biomarcadores específicos (Devi 2023).

La demencia lobar frontotemporal (DLFT) comprende un grupo de síndromes clínicos que se caracterizan por cambios progresivos en el comportamiento, la función ejecutiva o el lenguaje. Las demencias frontotemporales son proteinopatías que afectan, sobre todo, a los lóbulos frontales y temporales (Boeve et al. 2022). Hoy en día se clasifican en tres grupos patológicos según las proteínas agregadas que predominen: DLFT asociada a Tau (DLFT-Tau), DLFT asociada a la proteína fijadora de ADN TAR-43 (DLFT-TDP), y DLFT asociada a la proteína de fusión en sarcoma (DLFT-FUS) (MacKenzie et al. 2010).

En el caso de la EA, las marcas histopatológicas más importantes, relacionadas con una agregación proteica defectuosa, son las PS y los ONF (Ilustración 3). Las PS son depósitos extracelulares de A $\beta$  en la sustancia gris del cerebro con un tamaño de entre 50-200  $\mu$ m. Se forman por el depósito de productos del procesamiento de la PPA que se acumulan en forma tóxicas para el tejido cerebral. En

cambio, los ONF son acúmulos intracitoplasmáticos de proteína Tau hiperfosforilada. En las neuronas la proteína Tau es esencial para la estabilidad de los microtúbulos, sin embargo, al agregarse de forma patológica causa la muerte neuronal debido a la inestabilidad de estos elementos del citoesqueleto. En este contexto, los métodos de diagnóstico neuropatológico de la EA incluyen técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas que persiguen poner de relieve las PS y/o los ONF y también el acúmulo de A $\beta$  (Hyman et al. 2012).



**Ilustración 3.-** Características macroscópicas y microscópicas clásicas de la enfermedad de Alzheimer. (a) Cambios macroscópicos de atrofia cerebral y aumento de los ventrículos. (b) Cambios microscópicos. 1. Agregación de las proteínas Tau y A $\beta$ . 2. Pérdida neuronal, de prolongaciones y de sinapsis. 3. Ruptura de la barrera hematoencefálica y neuroinflamación asociadas. Creación propia con Biorender.com.

En este contexto, los métodos de diagnóstico neuropatológico de la EA incluyen técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas que persiguen poner de relieve las PS y/o los ONF y también el acúmulo de A $\beta$  (Hyman et al. 2012).

Las técnicas de hematoxilina-eosina y de Nissl son utilizadas para visualizar la arquitectura general del tejido cerebral muestreado, sin embargo, no permiten observar en detalle las lesiones típicas y características de la EA. Algunos tipos de impregnaciones con sales de plata se han desarrollado y utilizado, clásicamente, para la detección tanto de ONF como de PS, ya que con ellas se impregnan específicamente los microtúbulos y los microfilamentos del citoesqueleto neuronal. Entre ellas destacan la que utilizan la Metenamina de Plata (PAM) y también la técnica de Reusche (Reusche 1991).

En la localización de las lesiones de la EA también se ha utilizado, tradicionalmente, el colorante Rojo Congo, debido a que es capaz de intercalarse entre las proteínas plegadas; en el caso de los ONF se intercala entre la proteína Tau, y en el de las PS hace lo propio con las hojas plegadas  $\beta$  del amiloide. La técnica original recurre a la luz polarizada para visualizar las lesiones en verde manzana, pero

mediante un protocolo de Rojo Congo modificado se consigue la visualización de las lesiones mediante la fluorescencia emitida por el depósito del amiloide (Navarro et al., 1999; Navarro et al., 2013). Otras técnicas que tienen como base la utilización de fluorocromos, como la tioflavina S, son también útiles para poner de relieve las señales histológicas de la patología. Además de todos estos métodos de detección, las técnicas inmunohistoquímicas para muchas de las moléculas implicadas de algún modo en la patología, como Tau y A $\beta$ , son actualmente claves a la hora de detectar las PS y los ONF, y realizar un diagnóstico fiable.

Microscópicamente, la EA se diagnostica, además de por las PS y los ONF descritos, por otras alteraciones tales como degeneración neuronal, depósito de amiloide en vasos sanguíneos cerebrales y meníngeos, presencia de cuerpos de Hirano, aumento del número de células gliales y degeneración gránulo-vacuolar en las células piramidales del hipocampo. Las zonas más afectadas, en este sentido, son el hipocampo, el subículo, las amígdalas y las áreas de asociación neocorticales (Guimerà et al. 2002; Lei et al. 2021).

Pero, además de estos cambios a nivel microscópico, en la EA también se observan cambios anatomopatológicos *post-mortem* característicos a nivel macroscópico (Ilustración 3). El principal es la reducción del volumen y peso de los hemisferios cerebrales, debido a la atrofia del encéfalo, a expensas de la atrofia de la sustancia gris de la corteza cerebral. Se identifican, por ello, circunvoluciones más separadas y una mayor profundidad de los surcos interhemisféricos, así como un aumento de la dilatación del sistema ventricular, derivada posiblemente de la pérdida de corteza cerebral (Iov et al. 2019; Lei et al. 2021) (Ilustración 3). El volumen reducido del hipocampo es uno de los biomarcadores más fiables de la EA, ya que se ha encontrado que la atrofia no es una medida específica de esta enfermedad (van Oostveen, de Lange, and Orzechowski 2021).

Una vez conocidas las formas de detección de las señales anatomopatológicas, quedaba por normalizar y protocolizar unos criterios fiables para determinar cuándo un paciente presentaba o no EA. Unos de los primeros criterios de diagnóstico clínico para la EA, fueron publicados por la Asociación de Trastornos Neurológicos y Comunicativos y Accidentes Cerebrovasculares y la Asociación de Enfermedad de Alzheimer y Trastornos Relacionados (NINCDS-ADRDA) en 1984 (McKhann et al. 1984). Estos eran criterios de exclusión clínica para la EA en la etapa de demencia, que evidenciaban la necesidad de un examen neuropatológico *post-mortem* para hacer un diagnóstico definitivo. **Los criterios CERAD** (*Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease*) fueron establecidos en 1991 con el objetivo de establecer unas pautas generales para la

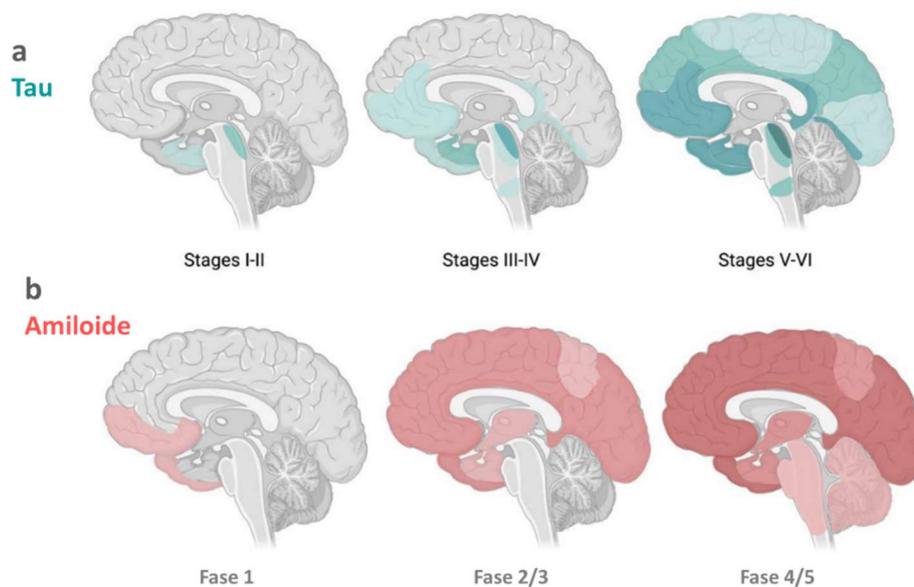
detección de la EA. Se basan en la cuantificación de PS neocorticales en preparaciones fijadas con parafina y teñidas, además de con hematoxilina-eosina, con técnicas argénticas como el Bielschowsky, tioflavina o Rojo Congo. El proceso de recuento se realiza en tres pasos, de modo que se determina un índice de PS relativo a la edad a la que falleció el paciente, que posteriormente se valora junto con el historial clínico del mismo. Así pues, se obtiene una tabla que permite diagnosticar la enfermedad como definitiva, probable o posible (Mirra, 1997).

De manera paralela, **Braak & Braak** publicaron en 1991 un estudio que demostraba que los ONF aparecían en el cerebro de pacientes con EA de forma progresiva (Braak & Braak, 1991). Ellos no tenían en cuenta el depósito de A $\beta$  o la formación de PS, porque, aunque en general su incremento avanzaba con el estadio de la enfermedad, su distribución presentaba una mayor variabilidad interindividual. Así, establecieron seis estadios en función de la cantidad de ONF presentes en tres zonas diferentes; la corteza olfatoria, el hipocampo y la corteza occipital, además de algunas zonas de la neocorteza. Este sistema fue revisado posteriormente en 2006, actualizando el procedimiento para facilitar su uso pero manteniendo la misma base (Braak et al., 2006). A continuación, se describen los grados propuestos por Braak (Ilustración 4):

- Estadio I: en estos casos se ve afectada la corteza transentorrinal, una zona situada entre la corteza entorrinal y la temporal. Es la capa celular superficial de la corteza entorrinal (Pre- $\alpha$ ) la primera zona en la que se forman los ONF. Las células con morfología estrellada se transforman en células piramidales. En este estadio I ocurren un número pequeño de estos cambios.
- Estadio II: este estadio se caracteriza por un aumento en los cambios dentro de la corteza transentorrinal, que van decreciendo a medida que se alcanza la zona entorrinal. En la zona CA1 del hipocampo se observa un aumento en el número de ONF, y aparecen algunos aislados en el área neocortical.
- Estadio III: las áreas transentorrinal y entorrinal están ampliamente afectadas, y en ellas aparece un gran número de ONF fantasma. La zona CA1 del hipocampo está parcialmente afectada. Las células piramidales del subículo comienzan a acumular ONF. Algunos aparecen aislados por la neocorteza, siendo más característicos en las zonas III y V de los lóbulos frontal, temporal y occipital.
- Estadio IV: el área Pre- $\alpha$  se ve altamente afectada, de forma que aparecen numerosos ONF fantasma en las zonas transentorrinal y entorrinal. El área CA1 del hipocampo se ve

gravemente alterada por un número elevado de estas lesiones. También comienza a verse afectado el isocórtex.

- Estadio V: se agrava el estado de la capa Pre- $\alpha$ , y comienzan a alterarse las zonas Pre- $\beta$  y Pre- $\gamma$ . Todo el hipocampo se ve afectado, y el neocórtex se ve ampliamente dañado.
- Estadio VI: en esta etapa los cambios comienzan a hacerse más pronunciados. Algunos ONF son degradados y remplazados por células de la glía. El neocórtex se ve gravemente afectado, al igual que el hipocampo; para diferenciar los estadios V y VI se observa el grado de afectación de la *fascia dentata* en este último. En las áreas sensoriales aparecen redes de hilos neurofibrilares, y solo un número reducido ONF, constituyendo esto otra diferencia entre los estadios V y VI. Por último, el núcleo subcortical también se ve muy afectado.



**Ilustración 4.-** (a) En azul, patrón de propagación de Tau por todo el cerebro desde el estadio I-II de Braak hasta el estadio III-IV (regiones límbicas) y el estadio V-VI (áreas isocorticales). (b) El patrón de propagación de la acumulación de A $\beta$  por todo el cerebro (en rojo) comienza en las áreas frontales y se propaga a otras regiones a medida que avanza la enfermedad. Tomado de (van Oostveen et al. 2021).

**Los criterios de Khachaturian** establecen el uso de las mismas tinciones que los CERAD para la determinación de PS y ONF. La diferencia es que las muestras de tejido son tomadas de tres regiones de la neocorteza como son la frontal, la temporal y la parietal. El diagnóstico se basa en el recuento de PS y ONF a un aumento de 200x; según esto, se determina si hay, o no, EA (Khachaturian 2011).

**Los criterios de Reagan**, junto con el NIA (*National Institute on Aging*), establecen una relación entre los propuestos por la CERAD y otros métodos posteriores como los de Braak. Así pues, recomiendan el uso de las técnicas de la CERAD para la fijación, procesamiento y tinción del tejido, además de la determinación del estadio de Braak correspondiente (Hyman et al. 2012; Montine et al. 2012). Estos criterios surgen debido a las críticas a la CERAD, ya que no tienen en cuenta la presencia de ONF para el diagnóstico de la EA.

En 2011, el Grupo de Trabajo Internacional (**IWG**) así como el Instituto Nacional sobre el Envejecimiento de EE.UU.-Asociación de Alzheimer (**NIA-AA**), desarrollaron unos criterios para el diagnóstico de la EA que definen mejor los fenotipos clínicos e integran distintos biomarcadores (*pre-mortem* y *post-mortem*) en el proceso diagnóstico (Dubois et al. 2014). Estos criterios están diseñados para guiar tanto al clínico como al investigador, incorporando avances en el estudio de biomarcadores en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y técnicas de neuroimagen, lo que facilita un diagnóstico más preciso y temprano de la enfermedad. En este caso, el diagnóstico de la EA se divide en: probable, posible o confirmado (Rojo 2014). Los criterios **NIA-AA** de 2018 representan un enfoque más exacto y actualizado para el diagnóstico de la EA, con un fuerte énfasis en la detección y caracterización de la enfermedad mediante biomarcadores (Jack et al. 2018). En este sentido, se ha ideado un sistema de clasificación AT(N), donde A es amiloide, T es la proteína Tau y N la existencia de neurodegeneración. Este sistema ayuda a caracterizar el estado biológico de la EA, y a diferenciarla de otras posibles condiciones neurodegenerativas. También se centra en detectar la fase asintomática de la patología.

En línea con los criterios anteriormente mencionados, y sin quitarle importancia al diagnóstico neuropatológico, en la actualidad también se estudian algunos biomarcadores, que se obtienen normalmente del LCR del paciente, que ayudan a detectar la EA en estado presintomático, lo que supone poder realizar un estudio terapéutico adecuado en cada caso (Janeiro et al. 2021). Los marcadores utilizados, actualmente, para el diagnóstico de la EA son  $A\beta_{42}$ , t-Tau y p-Tau. El primero se detecta en menor cantidad en el LCR de pacientes con EA que en el de individuos sanos, mientras que por el contrario los otros dos se encuentran sobreexpresados en el primero. Esto se debe a que el péptido  $A\beta$  se acumula en el tejido cerebral de pacientes con EA, mientras que la pérdida de neuronas corticales con la enfermedad aumenta la cantidad de t y p-Tau en el LCR (Janeiro et al. 2021). No obstante, cabe resaltar que el análisis conjunto de los tres marcadores aumenta la especificidad y sensibilidad de la prueba, si bien una alteración en los resultados se puede encontrar

también en pacientes con DCL. Podríamos decir que hoy en día no existe un criterio unánime a la hora de decidir los valores de referencia.

Cabe destacar en este punto, que el estudio de estos biomarcadores en plasma sanguíneo es un procedimiento menos invasivo que la obtención de LCR mediante punción lumbar, lo que favorece la toma de muestra. No obstante, la obtención de marcadores de EA en sangre es más compleja que en el LCR, principalmente por el estado de dilución del medio, y porque que solo una pequeña cantidad de esas proteínas pasan del tejido cerebral al torrente sanguíneo. Además, las pocas proteínas liberadas a la sangre, son degradadas por proteasas, y metabolizadas y eliminadas por el propio cuerpo (Janeiro et al. 2021).

#### **1.4.- Teorías sobre el origen de la Enfermedad de Alzheimer**

Las señales características de la EA (ONF y PS) son, para la mayoría de los investigadores, más que unas meras marcas anatomopatológicas, buscando en ellas las causas de la patología. Se sabe que la proteína Tau aberrante se acumula intracelularmente en forma de filamentos helicoidales que dan lugar a los ONF y, finalmente, a la muerte neuronal. Por el contrario, la agregación y fibrilación de los péptidos A $\beta$  que se liberan desde las neuronas y que se acumulan extracelularmente al espacio extracelular es la causante de un ambiente extracelular alterado que, a su vez y según estudios recientes, media la neurofibrilogénesis de la proteína Tau. La disfunción vascular también desempeña un papel crucial en el progreso de la EA, sugiriéndose que las PS y los ONF podrían no ser la causa de la neurodegeneración, sino más bien una consecuencia de ésta, es lo que se conoce como hipótesis vascular. A continuación, se describirán en detalle cada una de las vías moleculares que conducirían a la muerte neuronal por excitotoxicidad y llevarían a los cambios de deterioro cognitivo que caracterizan a la EA.

##### **1.4.1.- Papel del péptido amiloide en la progresión de la Enfermedad de Alzheimer**

La hipótesis de la “cascada del amiloide” ha dominado durante muchos años el campo de la investigación de la EA. Se basa, en gran medida, en datos bastante persuasivos sobre mutaciones de la proteína de PPA de la EA autosómica dominante y datos de modelos genéticos de ratón que parecen corroborarlos (Cheignon et al. 2018; Ferreira et al. 2021). La identificación de una mutación patogénica en el gen de la PPA llevó a John Hardy y David Allsop a plantear la hipótesis de que su incorrecta metabolización provocaría la acumulación de A $\beta$ , siendo este el desencadenante inicial de la patología (Hardy & Higgins, 1992; Hardy & Allsop, 1991). A esto le seguirían el resto de los sucesos

característicos de la EA: hiperfosforilación de Tau, formación de ONF y muerte neuronal (Ilustración 5). Esta hipótesis propone una relación entre ambas proteínas, con A $\beta$  como disparador y Tau como bala. Es una teoría convincente y simple, que, aunque no es válida en todos los casos, probablemente sea cierta para algunas formas genéticas de EA (Arnsten et al. 2021). De este modo, las mutaciones que aumentan la producción y acumulación de A $\beta$  son responsables de desencadenar la enfermedad de Alzheimer, mientras que las alteraciones en la proteína Tau conducen a otras taupatías, pero no provocan EA.

Como decimos, la hipótesis de la cascada amiloide se vio reforzada por el hecho de que la EA puede ocurrir debido a mutaciones autosómicas dominantes en los genes de presenilina (*PSEN1* y *PSEN2*) que codifican las proteínas PSEN1 y PSEN2, las cuales pueden incrementar la generación de A $\beta$  y mediar en la generación de agregados y depósitos de A $\beta$  insolubles en última instancia. Las mutaciones en los genes *PSEN* parecen ser la causa principal de la fEA. Actualmente se han mapeado más de 150 mutaciones causales y la mayoría parecen aumentar la generación de los péptidos amiloides más insolubles (Uddin et al. 2020).

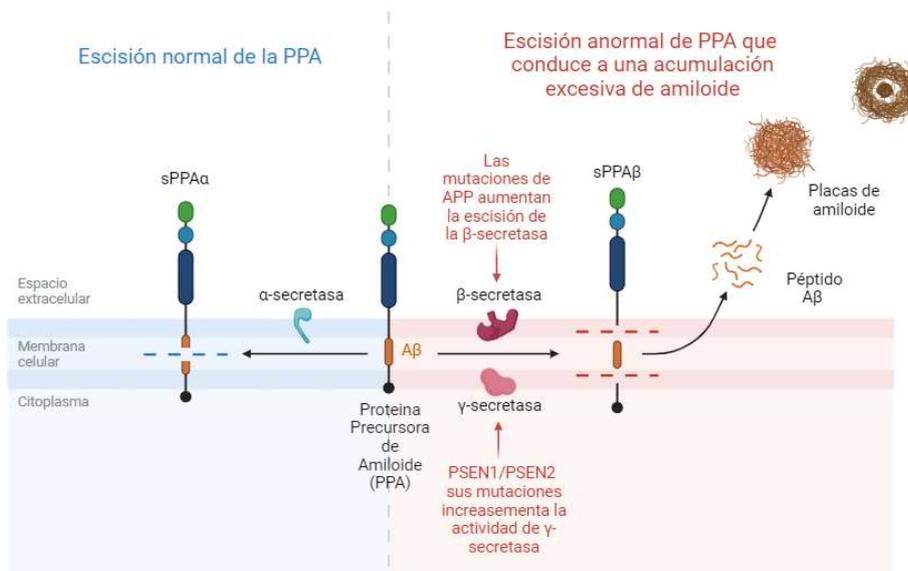
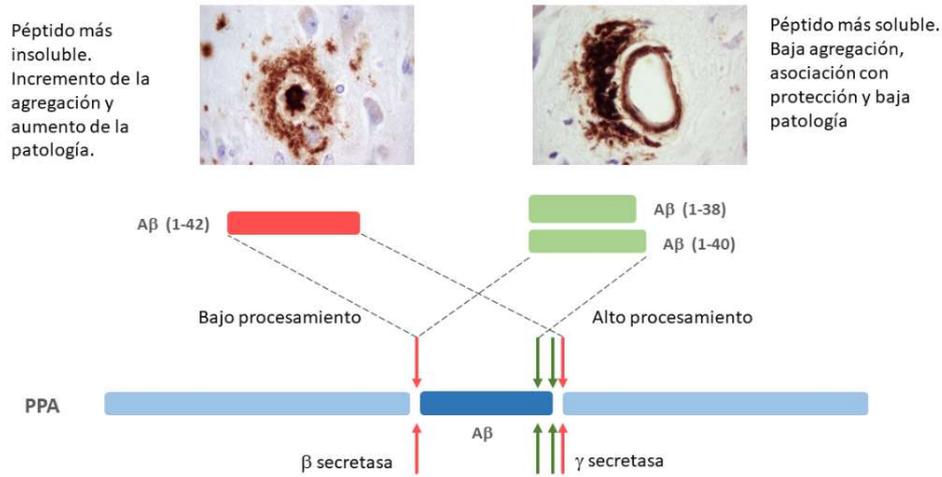


Ilustración 5.- Vías de procesamiento del amiloide. Creación propia con Biorender.com.

El péptido A $\beta$  es el actor principal en la hipótesis de la “cascada del amiloide”, compuesto por entre 39 y 43 aminoácidos, fue descubierto en 1987 (Gravina et al. 1995). Este péptido es un producto derivado de la PPA, una glicoproteína transmembrana de tipo I formada por 695–770 aminoácidos. A pesar de que no se conocen muchos detalles de su fisiología, su función normal parece estar asociada con procesos implicados en el crecimiento de las prolongaciones neuronales y la regulación

sináptica. Su procesamiento involucra a dos proteasas que entran en competencia. En la vía más común, la proteasa  $\alpha$ -secretasa provoca la escisión de PPA, que conduce a la formación de PPA alfa soluble (sPPA $\alpha$ ) y un fragmento C-terminal 83 unido a la membrana celular (CTF83). Esta vía se conoce como no amiloidogénica, ya que los fragmentos producidos no forman depósitos de amiloide insoluble (Ilustración 5). Por otro lado, en la otra vía, la enzima  $\beta$ -secretasa (una aspartil proteasa identificada como BACE 1 y 2), con una alta especificidad de secuencia, puede escindir PPA en el extremo N-terminal del dominio A $\beta$ , en los residuos Glu<sup>682</sup> o Asp<sup>672</sup> generando un PPA  $\beta$  soluble (sPPS $\beta$ ) y un fragmento C-terminal 99 unido a la membrana celular (CTF99). Este fragmento, después de ser procesado por la  $\gamma$ -secretasa, libera el péptido A $\beta$ . La  $\gamma$ -secretasa es un complejo enzimático de cuatro proteínas que incluyen al menos PSEN 1, PSEN 2 y nicastrina que hidroliza la PPA en el medio de su dominio transmembrana (Ilustración 5). A través de esta vía se producen formas más largas de A $\beta$  (A $\beta$ <sub>1-42</sub> y A $\beta$ <sub>1-43</sub>,) que son insolubles y se depositan en forma de amiloide fibrilar, que es el componente principal de las PS.

El A $\beta$  se genera de forma normal en los individuos, pero, en algunos casos, este péptido comienza un proceso de agregación que es el punto de partida de la progresión de la EA. Existen varias isoformas de A $\beta$  con una longitud variable en sus residuos aminoacídicos, incluidos A $\beta$ <sub>1-40</sub> (el más abundante) y A $\beta$ <sub>1-42</sub> (la isoforma menos soluble). La agregación de A $\beta$  desencadena la generación de protofibrillas, fibrillas y oligómeros, que eventualmente pueden conducir a la formación de PS. Se ha descrito la existencia de diferentes tipos de placas en relación con el tipo de A $\beta$  dominante y la agregación de éste en las mismas. Así se reconocen PS difusas y PS maduras o compactas (Ilustración 6). De todas maneras, el depósito de A $\beta$  también se puede producir alrededor de los vasos sanguíneos en los cerebros de pacientes con EA, dando lugar a un tipo de patología conocida como angiopatía cerebral amiloidea (ACA) (Schiavolin et al. 2024). La ACA puede ser resultado de un depósito focal o generalizado de A $\beta$  en los vasos sanguíneos cerebrales leptomeníngeos e intracorticales, causando lesiones vasculares que pueden contribuir aún más a la demencia, al impedir el transporte de nutrientes a través de la barrera hematoencefálica (BHE) y la eliminación de solutos del cerebro (Schiavolin et al. 2024).

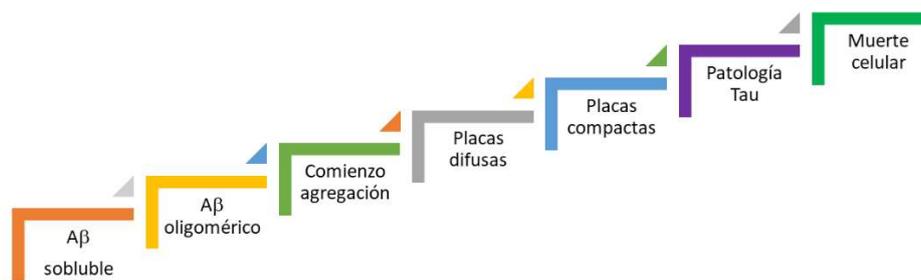


*Ilustración 6.- Tipos más frecuentes de Aβ y depósitos que forman. Creación propia con PowerPoint.*

La forma insoluble del péptido Aβ es tóxica para las neuronas y al mismo tiempo estimula efectos tróficos en las células gliales. En las neuronas, se une a receptores específicos, lo que induce la formación de radicales libres. Estos radicales libres provocan daños en la membrana neuronal y en el ADN mitocondrial, lo que hace que las neuronas sean más vulnerables (Cheignon et al. 2018; Petrushanko, Mitkevich, and Makarov 2023). En las células microgliales, el péptido Aβ provoca la liberación de radicales libres, citocinas inflamatorias (como el IFN-γ y el TNFα) y diversas interleucinas, lo que promueve una amplificación del daño celular local debido a la reacción inflamatoria (Weisman, Hakimian, and Ho 2006). Además, el péptido Aβ contribuye a la neuropatología de la EA al activar la cascada de complemento y unirse específicamente a proteínas de fase aguda, lo que reduce la producción de la PPA neuroprotectora y aumenta los niveles de PPA asociada a células. Esto proporciona un sustrato adicional para la generación de Aβ e induce una respuesta de más células gliales. (Butterfield 2002).

Clásicamente, se ha considerado que las PS son responsables de la neurodegeneración en la EA. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que estos daños pueden ocurrir también en su ausencia. En base a ello, algunos autores han buscado otras formas por las que el Aβ pueda ejercer su toxicidad, sugiriendo a la agrupación de éste en forma de oligómeros (oAβ) como la más dañina a nivel celular (Valensin, Gabbiani, and Messori 2012). Entre los oAβ se incluyen dímeros, trímeros, tetrameros, dodecámeros y también otros oligómeros de entre 2 y 20 nm de diámetro (Ilustración 7). Todas estas formas se pueden hallar tanto en el interior celular como en el espacio extracelular y, además, no actúan siempre del mismo modo, sino que pueden hacerlo de distinta forma

dependiendo de su tipo o localización (Solis, Hascup, and Hascup 2020). Así mismo, la solubilidad de los oA $\beta$  los hace biológicamente activos y muy peligrosos, ya que son capaces de unirse específicamente a los procesos dendríticos y sinapsis de la neurona y bloquear el potencial la membrana (Valensin et al. 2012). Sin embargo, los oA $\beta$  no siempre resultan tóxicos. Algunos estudios proponen que ciertos monómeros u oligómeros podrían desempeñar funciones como la regulación de la plasticidad neuronal o la promoción de procesos como el desarrollo, la proliferación o la diferenciación de determinadas células (Solis et al. 2020).



*Ilustración 7.- Hipótesis de la progresión de la patología del péptido A $\beta$ . Esquema realizado con PowerPoint.*

Se ha descubierto que la acumulación de A $\beta$  está asociada con el alelo *APOE  $\epsilon$ 4*, considerado el factor de riesgo genético más potente para la EA de aparición tardía, presente en el 40 % de los pacientes. Este gen codifica para la apolipoproteína E (Apo E), implicada en el metabolismo lipídico. La función de la Apo E es servir como ligando para la familia de proteínas del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL), que median el transporte del colesterol a las neuronas. Esta función es esencial para el crecimiento axonal, la formación y la remodelación sináptica. En realidad, los mecanismos que subyacen a las influencias específicas de las isoformas de Apo E sobre la agregación y acumulación de A $\beta$  en el cerebro no se comprenden completamente pero, probablemente, se deba a sus diferentes capacidades para eliminar A $\beta$  (Uchida et al. 2022). Algunos resultados son consistentes con la hipótesis de que la Apo E no lipidada puede estimular la agregación y deposición de A $\beta$  en el cerebro (Xu, Finkelstein, and Adlard 2014). A diferencia de otras isoformas, *APOE  $\epsilon$ 4* puede aumentar el A $\beta$  al disminuir su eliminación y mejorar la hiperfosforilación de Tau. De hecho se ha observado que APO E4, aparece junto a las PS y ONF propios de la EA (Liu et al., 2019).

Sea el A $\beta$  causa o no de la patología, la investigación se ha centrado en los últimos años en la eliminación del péptido, bien sea directamente o bien indirectamente potenciando su aclaramiento. Las diferentes formas en las que el cerebro podría deshacerse fisiológicamente de él involucran tanto

mecanismos intracelulares como extracelulares. En el ámbito celular, se ha visto que las neuronas pueden eliminar el PPA y el A $\beta$  mediante autofagia. Se ha propuesto que el fallo del transporte por disfunción del complejo dineína-dinactina causado por la fosforilación de Tau, resultaría en una acumulación de autofagosomas y posteriormente la muerte neuronal (Uddin et al. 2020). A nivel extracelular, la microglía estaría implicada en fagocitar y eliminar los péptidos insolubles de A $\beta$ ; se ha visto localizada en los alrededores de las PS maduras. Existe evidencia de que la activación de la microglía en el SNC es heterogénea, clasificándose en dos tipos: fenotipo M1 y fenotipo M2. Dependiendo de los fenotipos activados, la microglía puede tener efectos citotóxicos o neuroprotectores. Además, los cambios de los fenotipos de la microglía dependen de las etapas y la gravedad de la EA. La microglía M2 es la primera en aparecer y presenta características reparadoras y antiinflamatorias, M1 predomina en el sitio de la lesión en la etapa final de la enfermedad, cuando el proceso de reparación de la microglía M2 se ve afectado (Tang and Le 2016).

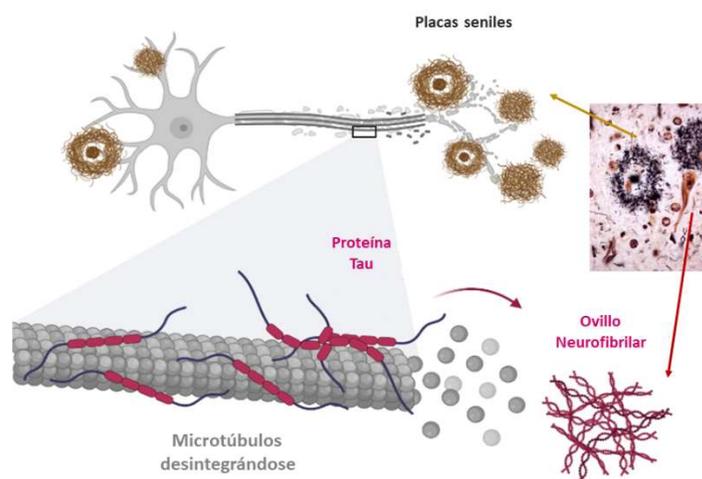
Los péptidos A $\beta$  que se encuentran en diferentes estados de agregación (monómeros, oligómeros y fibrillas) pueden atravesar la BHE a diferentes velocidades y afectar el estado de las células endoteliales de diferentes maneras. La tasa de depuración para la liberación de oligómeros desde el cerebro al torrente sanguíneo es mayor que para las fibrillas y los monómeros. Los oligómeros de A $\beta$  tienen el mayor efecto tóxico sobre las células de la BHE y se transfieren más rápidamente por transcitosis desde el lado cerebral de la BHE al lado sanguíneo. Durante la EA, el equilibrio entre la entrada de A $\beta$  al cerebro desde la periferia y su salida se altera. El A $\beta$  cambia el estado redox de las células de la BHE, lo que a su vez cambia el funcionamiento de las mitocondrias y altera la función de barrera de las células endoteliales al afectar a las proteínas de unión estrecha y a los transportadores transportadores membrana de A $\beta$ , como RAGE (del inglés *receptor for advanced glycation endproducts*) y LRP1 (del inglés *low-density lipoprotein receptor*) (Petrushanko et al. 2023). Por lo anteriormente dicho, la ruptura o disfunción de la BHE debido a la EA producirá la acumulación del A $\beta$  en el cerebro que contribuirá a la progresión de la patología.

#### 1.4.2- Papel de la proteína Tau en la Enfermedad de Alzheimer

Algunas evidencias ponen en duda el papel central del A $\beta$  en la patogenia de la EA. El análisis de un gran número de cerebros humanos a lo largo de la vida ha puesto de manifiesto que la patología Tau comienza aproximadamente una década antes de la agregación del péptido A $\beta$  (Braak and Braak 1997; Braak and Braak 1991). Así, se ha observado que la extensión de los ONF se correlaciona mejor con la severidad de la enfermedad que la presencia de PS, que aparecen incluso en el cerebro de

personas sanas (Braak et al., 2006). El descubrimiento de que mutaciones de los genes *PSEN1/ApoE3* en pacientes que no desarrollan demencia a pesar de la formación extensa de  $\alpha\text{A}\beta$ , y que presentan pocos ONF, reforzó la noción cada vez mayor de que la Tau anormal puede ser un factor etiológico clave. Además, la patología de Tau, pero no la  $\text{A}\beta$ , se correlaciona mejor con la pérdida progresiva de sustancia gris y el deterioro cognitivo. Es importante destacar que la patología Tau exhibe un patrón y una secuencia altamente selectiva en la progresión de la enfermedad (Arnsten et al., 2021; Braak & Braak, 1997).

Al hablar de “Tau” se hace referencia a una familia altamente conservada de proteínas asociadas a microtúbulos (MAP, del inglés *microtubule-associated proteins*), que aparece en el SNC de distintos mamíferos. Tau se expresa principalmente en los axones de las neuronas, aunque también se ha hallado en menores cantidades en oligodendrocitos y astrocitos. Las principales funciones de esta proteína consisten en promover la polimerización de la tubulina para formar microtúbulos y estabilizar éstos una vez se han constituido (Ilustración 8). Cuando esta proteína se separa de los microtúbulos puede dar lugar a una disfunción sináptica, que causa distintos efectos según la región a la que afecta. Así, por ejemplo, el deterioro de la memoria en la EA se asocia con el deterioro de las sinapsis en el hipocampo (Ayers, Giasson, and Borchelt 2018).



*Ilustración 8.- Tau hiperfosforilada y su implicación en las placas seniles y ovillos neurofibrilares. Creación propia con Biorender.com.*

En el cerebro humano adulto se expresan seis isoformas distintas de Tau de entre 352 y 441 aminoácidos, las cuales se originan por *splicing* alternativo de un único gen, *MAPT*, que se encuentra

en el cromosoma 17. Se producen variaciones en dos zonas: en la región N-terminal pueden aparecer bloques de 29 o 58 aminoácidos (isoformas 1N y 2N), o ninguno (isoforma 0N); y en la región de unión a microtúbulos pueden aparecer tres o cuatro repeticiones en tándem (isoformas 3R y 4R). Así, combinando estas variaciones, se obtienen las seis isoformas presentes en humanos. La expresión de las distintas isoformas de Tau está regulada a lo largo del desarrollo. Por ejemplo, en el feto no aparecen las isoformas 4R pero sí que va apareciendo la isoforma 3R conforme avanza la EA (Goedert et al. 1989; Moloney et al. 2023; Moloney, Lowe, and Murray 2021).

En determinadas ENs y por causas que aún se desconocen, la proteína Tau se pliega de forma incorrecta y forma acúmulos anormales en el SNC. Estas patologías, que ya hemos comentado, se denominan taupatías y entre ellas se encuentra la EA (Gibbons, Lee, and Trojanowski 2019). Los niveles de expresión de Tau no parecen verse modificados en pacientes de EA, lo que ocurre es que la proteína Tau, que normalmente contribuye a estabilizar los microtúbulos, experimenta una hiperfosforilación irreversible, debido a la acción de las quinasas I y II, lo que facilita su agregación en fibrillas. Esta proteína, que en su forma normal es soluble, se va acumulando progresivamente en el citoplasma para formar filamentos pareados helicoidales (FPH) en el interior de las células, depositándose tanto en el soma de las neuronas como en sus prolongaciones (Braak & Braak, 1991). Dentro del citoplasma se forman los ONF que aparecen en las células en degeneración y, cuando éstas mueren, los filamentos quedan en el neuropilo conociéndose como “ovillos fantasmas” (Braak et al. 2006; Moloney et al. 2021) (Ilustración 9). Todo ello conlleva una reducción del transporte axonal y, posteriormente, la neurodegeneración y muerte de las neuronas, lo cual está correlacionado con el declive cognitivo y con la pérdida de sinapsis y del transporte de la señal eléctrica (Cristóvão, Santos, and Gomes 2016). Cuando las fibrillas están depositadas en los axones pueden llegar a formar parte importante de las PS.

La proteína Tau también está implicada, a través del transporte de PPA a la membrana celular, en el mantenimiento de la función neuronal y sináptica. Debido a este papel, la modificación de su función o estructura tiene gran importancia en la patología de EA (Derry et al. 2020). Estudios en cerebros humanos con EA indican que la patología de Tau podría comenzar una década antes de la aparición de las PS. Este proceso iniciaría en la región transentorrinal, extendiéndose posteriormente a las capas superiores de la corteza entorrinal, lo que provocaría una rápida degeneración neuronal (Braak & Braak, 1995). Con la progresión, las alteraciones se extenderían a la corteza de asociación del hipocampo y a la corteza frontal, parietal y occipital. Se ha propuesto que la proteína Tau

hiperfosforilada podría acelerar la formación de A $\beta$  y, junto con otros factores, determinar la velocidad y extensión de la cascada neurodegenerativa. Del mismo modo, A $\beta$  podría acelerar la fosforilación anormal de Tau, dando lugar a un círculo vicioso que probablemente sea fundamental para el desarrollo de la EA (Arnsten et al. 2021; Muralidar et al. 2020).



*Ilustración 9.- Formación de los ovillos neurofibrilares (ONF). Los ONF existen en un espectro que va desde las formas tempranas hasta las avanzadas de tres niveles de madurez distintos, pero superpuestos. Modificado de Moloney et al. 2021.*

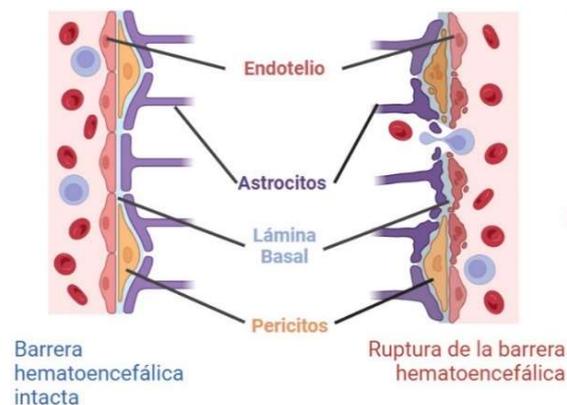
En la EA, el patrón predecible de propagación de Tau en el que se basa la clasificación de Braak y su correlación con la clínica de la enfermedad (Braak & Braak, 1991; Braak et al., 2006) han alimentado una hipótesis que propone una expansión de Tau cerebral de forma similar a como ocurre en el caso de los priones, de manera que la propagación de la forma patológica sería la que provocaría la progresión de la EA (Ayers et al. 2018). Otro punto que apoya esta teoría es el hecho de que la proteína Tau presenta distintas morfologías en cada taupatía. Así, se ha sugerido la posibilidad de que diferentes isoformas de Tau sean responsables de cada taupatía, de manera similar a como distintas cepas de priones causan diferentes enfermedades priónicas (Gibbons et al. 2019).

#### 1.4.3- Teoría vascular de la EA

En contraposición con el modelo en el que la neurona es el origen de la EA, aparece la teoría vascular (De la Torre 2002). Esta teoría se apoya en varias evidencias, entre las que destacan las similitudes a nivel de factores de riesgo y síntomas que muestra la EA con otras demencias vasculares, la demostración de que el uso de fármacos que mejoran la insuficiencia cerebrovascular mejora

también la sintomatología de la EA, así como que la hipoperfusión vascular cerebral puede desencadenar cambios metabólicos y degenerativos en el tejido cerebral (De La Torre 1999).

Esta teoría supone la existencia de una disfunción vascular previa, que jugaría un importante papel en el desarrollo de la EA. Así, múltiples vías derivadas del daño de la “unidad neurovascular” (UNV) podrían ser el estímulo inicial que disparen el inicio de esta patología. La UNV formada por la triada endotelio/glía/neurona, controla la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) y el flujo sanguíneo cerebral, y mantiene la composición química del "medio" neuronal, que es necesaria para el funcionamiento adecuado de los circuitos neuronales (Ilustración 10). Publicaciones recientes indican que la disfunción de la BHE se asocia con la acumulación de varias moléculas vasculotóxicas y neurotóxicas dentro del parénquima cerebral, y con una reducción del flujo sanguíneo cerebral e hipoxia (Montagne, Zhao, and Zlokovic 2017; Zhao et al. 2015; Zlokovic 2011). Por ejemplo, la ruptura de la BHE causaría la acumulación de proteínas plasmáticas como albumina e inmunoglobulinas que causarían edema cerebral, o como la plasmina responsable de la degradación de la laminina neuronal y del consecuente daño del nicho neuronal. Otras moléculas depositadas alrededor de los vasos dañados podrían ser algunos productos derivados de la hemoglobina, incluido el hierro, que aumentarían el nivel de estrés oxidativo del parénquima nervioso (Zlokovic 2011).



*Ilustración 10.- Composición de la barrera hematoencefálica. Ruptura y discontinuidad durante la Enfermedad de Alzheimer. Creación propia con Biorender.com.*

Además de una BHE conservada, es importante el mantenimiento de un flujo sanguíneo cerebral (FSC) adecuado. El FSC está regulado por la actividad neuronal y el metabolismo local, lo que se conoce como “acoplamiento neurovascular”. Por ello, ante una mayor actividad y metabolismo neuronal se activa la hiperemia cerebral a través de un aumento del flujo sanguíneo en los capilares,

donde los pericitos tendrían un importante papel. La disminución del FSC detectada en la EA, tendría un efecto muy serio en la nutrición, oxigenación y mantenimiento de las neuronas y glías (Montagne et al. 2017; Rius-Pérez et al. 2018; Solis et al. 2020). Se ha estudiado ampliamente el efecto de la reducción del FSC en relación con la EA a nivel molecular y celular. En este sentido, parece que una reducción y/o una desregulación del FSC aparece en personas de edad avanzada con alto riesgo de EA antes, incluso, que el deterioro cognitivo, la atrofia cerebral y la acumulación de A $\beta$  (Zlokovic 2011).

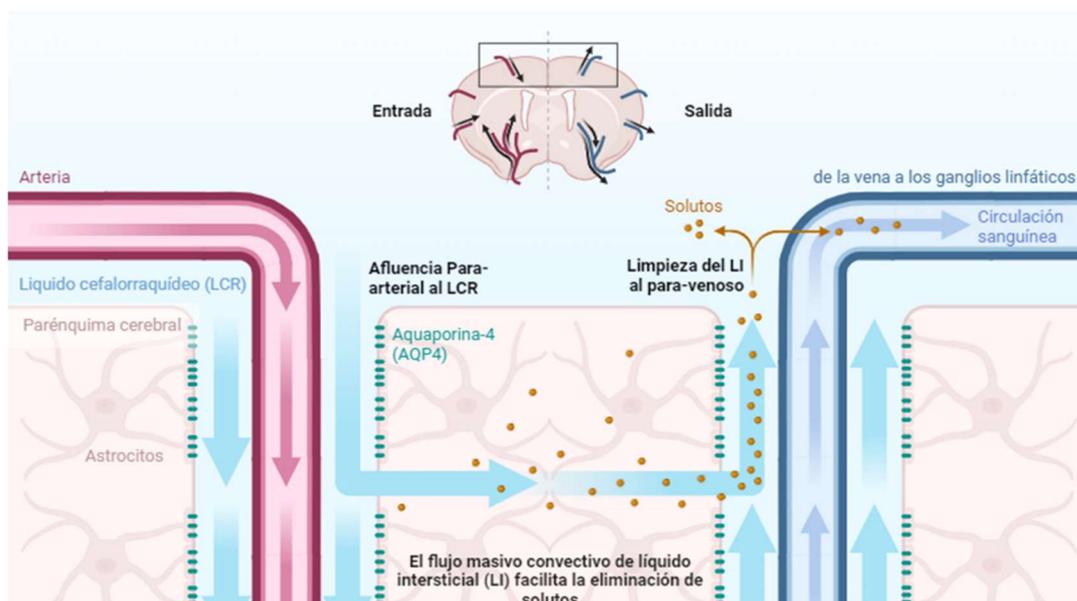
La permeabilidad de la BHE aumenta con la edad, lo que puede contribuir al aumento de los niveles de hierro en el cerebro envejecido. Se ha informado que el 10% de este ion ingresa al cerebro a través de la BHE desde la sangre y que sus niveles son diferentes en las diferentes regiones. El contenido de hierro es más abundante en el sistema extrapiramidal, especialmente en la región de los ganglios basales, mientras que las concentraciones más altas se encuentran en la sustancia negra (SN), el núcleo rojo y la circunvolución dentada cerebelosa. Por el contrario, la cantidad de hierro es relativamente baja en la corteza cerebral (Zhang et al. 2019). La acumulación de hierro en una región específica del cerebro, ya rica en este metal, puede alterar su metabolismo y desencadenar diversos trastornos relacionados con la neurodegeneración. El hierro se libera en el líquido intersticial (LI) cerebral a través de la BHE y es absorbido por las neuronas y diferentes tipos de células gliales, distribuyéndose de manera desigual dentro de estas células (Verheggen et al. 2020, 2021). Sin embargo, todavía no se comprenden completamente los mecanismos reguladores detallados de la interacción entre la absorción y liberación de éste en el cerebro desde la BHE *in vivo*.

Aunque es difícil determinar cuál es la causa y cuál es el efecto, parece claro que la enfermedad vascular tiene relación directa con la neurodegeneración y la progresión de la EA. El nexo entre ambas teorías, neuronal y vascular, podría radicar en que la isquemia-hipoxia influye en el procesamiento amiloidogénico de la PPA a través de mecanismos que aumentan la actividad de dos enzimas clave, la  $\beta$ -secretasa y la  $\gamma$ -secretasa, favoreciendo el depósito de A $\beta$ . Esto se agravaría con la ruptura de la BHE, ya que la eliminación de A $\beta$  a través de ésta se vería comprometida. Además, la hipoxia también promovería la fosforilación de Tau a través de la vía de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) (Zlokovic 2011).

#### 1.4.4.- Teoría de la clarificación de productos tóxicos en la Enfermedad de Alzheimer

El cerebro, debido a que carece de circulación linfática, tiene que eliminar las proteínas extracelulares mediante un mecanismo alternativo. El LCR es la ruta principal para la salida de moléculas desde el

cerebro a la circulación desde el espacio subaracnoideo, pero, en los últimos años, se ha descubierto una **vía glial-linfática o glinfática** en el cerebro de los roedores, que también participaría en la eliminación de líquidos (Iliff & Nedergaard, 2008). Esta vía, que favorece el flujo del LCR hacia el cerebro a lo largo de los espacios perivasculares arteriales y desde allí hacia el intersticio cerebral, consta de tres elementos principales: i) una ruta de influjo para-arterial del LCR, ii) una ruta de eliminación o aclaramiento para-venosa de líquido intersticial, y iii) una vía transparenquimatosa que depende del transporte astrocítico de agua a través del canal de acuaporina-4, también denominado vía de flujo masivo convectivo (Martínez-Tapia et al. 2018). A través de estas rutas, los flujos son dirigidos hacia los espacios venosos perivascular y perineuronal y, en última instancia, los solutos del neuropilo son eliminados hacia los vasos de drenaje linfático cervical y meníngeo (Rasmussen, Mestre, and Nedergaard 2018) (Ilustración 11). El movimiento intersticial de solutos se produce mediante los efectos combinados de difusión y advección. Este último se refiere al movimiento en masa de fluido impulsado por cualquier combinación de gradientes de presión: hidrostática, por gravedad o de origen cardiovascular, osmótica, oncótica y de temperatura. La advección es más rápida a lo largo de ciertas vías anatómicas privilegiadas, incluidos los espacios perivasculares intraparenquimatosos y los tractos de sustancia blanca (Bohr et al. 2022).



*Ilustración 11.- Esquema hipotético de la limpieza de fluidos cerebrales y de solutos intersticiales por el sistema glinfático en roedores. Creación propia con Biorender.com.*

El transporte intraparenquimático es un proceso que requiere energía, para lo cual entran en juego múltiples mecanismos, entre los que se pueden resaltar dos principales. Por un lado, la constante

producción de LCR que crea presión para la salida. Por otro lado, y más recientemente descrito, el pulso generado por las células del músculo liso de la arteria pial y las arterias penetrantes, que se sumergen en el cerebro desde la superficie cortical, y que impulsan la entrada de LCR específicamente en el espacio perivascular arterial y no en el venoso (Martínez-Tapia et al. 2018).

La disfunción vascular relacionada con la edad se asocia también con un deterioro de las funciones de eliminación y barrera de la mencionada vía glinfática (Uchida, 2022). Los productos de desecho en el cerebro son eliminados por el sistema glinfático a través de los espacios perivascuales, la BHE y la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo (BSLCR). Se ha comprobado que, al igual que ocurre con la A $\beta$ , la eliminación de la proteína Tau depende del sistema glinfático. Además, se ha demostrado que el alelo E4 de la Apo E, interacciona con la acuaporina-4 en los pies astrocitarios contribuyendo, no solo a la absorción de A $\beta$ , sino también a la de partículas grasas, la principal función del sistema linfático sistémico (Iliff et al., 2012; Toriello et al., 2021).

En los roedores, la vía glinfática está principalmente activa durante el sueño, cuando la eliminación de metabolitos dañinos como el A $\beta$  aumenta dos veces en relación con el estado de vigilia (Rasmussen et al. 2018). La disfunción linfática se ha demostrado en modelos animales de EA, pero también en humanos donde una reducción del aclaramiento del LCR se asoció con un aumento de los niveles de A $\beta$  en la sustancia gris en el cerebro humano (Iliff et al. 2012; Uchida 2022).

En cuanto a la prevención de la demencia, la eliminación de desechos es crucial para mantener la homeostasis cerebral y suprimir la neuroinflamación. La protección de la integridad de la BHE y la promoción de la eliminación de desechos a través de la vía glinfática tienen el potencial de abrir una ventana de oportunidades terapéuticas para las demencias en un futuro cercano. Si se pudiera monitorear la eficacia en la depuración de desechos en el cerebro mediante biomarcadores, se podría mejorar el deterioro cognitivo y prevenir la aparición de la EA (Uchida, 2022).

### **1.5.- Importancia del ion hierro en la progresión de Enfermedad de Alzheimer**

El desequilibrio del hierro en el cerebro se asocia con un amplio espectro de trastornos neurológicos, incluidos los accidentes cerebrovasculares, los trastornos mentales y el cáncer, lo que refleja su participación integral en la fisiología humana (Lee and Kovacs 2024). Los exámenes *post-mortem* y las observaciones de resonancia magnética (RMN) de los pacientes han revelado una acumulación anormal de hierro en el cerebro en un grupo de ENs, destacando entre ellas la EA, pero también la EP, la atrofia multisistémica (AMS) y la parálisis supranuclear progresiva (PSP). La participación del hierro en la patogénesis de la enfermedad varía en gran medida según las regiones anatómicas

asociadas y la gravedad de su deposición. Un mecanismo homeostático bien regulado proporciona la concentración óptima de hierro para que las células lleven a cabo algunas funciones esenciales, incluyendo el mantenimiento del estado de equilibrio de las concentraciones de hierro dentro de las células y su amortiguación para detener la acumulación tóxica dentro de los compartimentos celulares. Cuando el nivel de hierro aumenta por encima de su capacidad de secuestro, la concentración de hierro puede aumentar, lo que puede causar varios daños en los orgánulos y la muerte celular en el cerebro (Chang 2019).

### 1.5.1- El hierro como molécula imprescindible en el sistema nervioso

En el cerebro, el hierro es el metal de transición más abundante y está involucrado en el desarrollo embriológico cerebral, en la comunicación neuronal y en la mielinización, así como en la actividad de numerosas enzimas intracelulares hierro-dependientes. Actúa como cofactor de las enzimas implicadas en la síntesis y el metabolismo de los neurotransmisores y es un componente de los citocromos esenciales para la producción de energía. Los metales de transición, como el hierro, zinc, cobre y aluminio, podrían estar implicados en el desarrollo de la EA a través de la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), y todos ellos se han encontrado localizados en las PS y los ONF (Derry et al. 2020). Además, la desregulación en los metales de transición, el estrés oxidativo y la cascada amiloide podrían estar interrelacionadas en la etiología de EA.

El hierro, como hemos dicho, es un metal de transición con tres especies,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  y  $Fe^{4+}$ . Las reacciones químicas en las que está involucrado dependen de las propiedades químicas de éste, ya que es capaz de cambiar de valencia para catalizar reacciones de oxidación-reducción (capacidad redox). Por el contrario, esta propiedad causa una generación paradójica de alta reactividad que da como resultado radicales tóxicos hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) a través de la Reacción de Haber-Weiss o de la Reacción de Fenton (Hare et al. 2013; Meguro et al. 2007).

- $Fe^{3+} + \bullet O_2^- \rightarrow Fe^{2+} + O_2$  Primer paso de la reacción de Haber-Weiss. Debido a la reactividad del superóxido, el catión férrico queda reducido y se produce una molécula de  $O_2$ .
- $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \bullet OH$  Proceso de oxidación avanzada en el cual se producen radicales  $OH^{\cdot}$ .

Debido a la alta reactividad de los radicales  $OH^{\cdot}$ , el hierro desencadena reacciones de estrés oxidativo modificando las macromoléculas cercanas al sitio de su formación, como los lípidos celulares, las proteínas, y la estructura y función del ADN (Meguro et al. 2007).

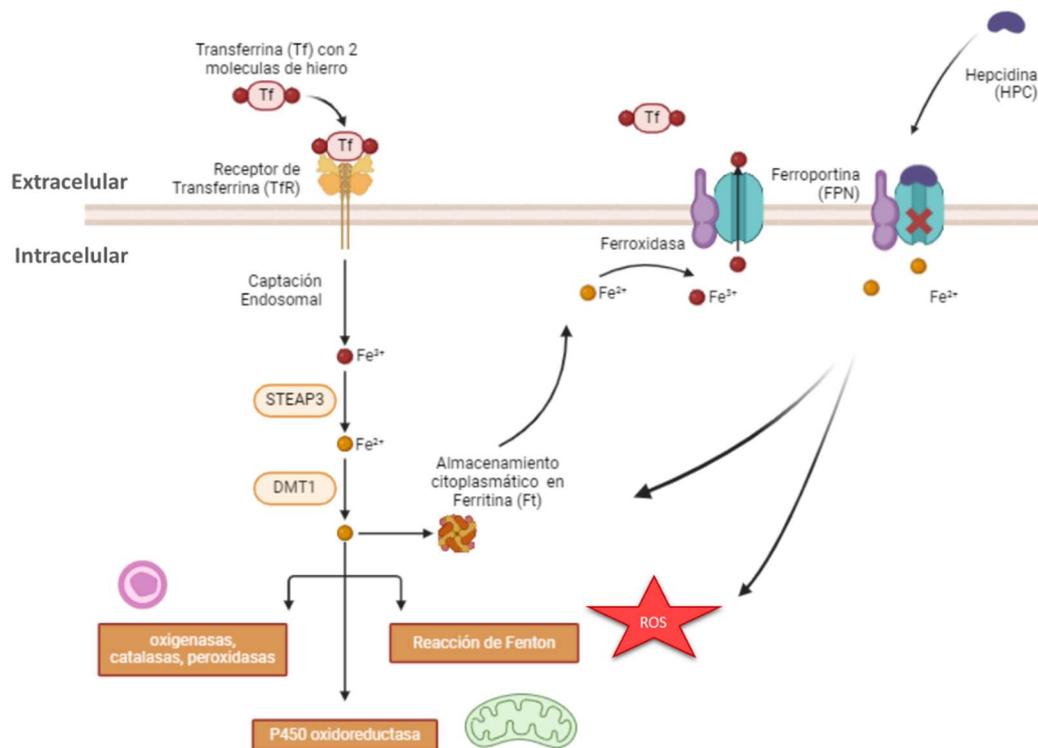
El hierro extracelular se encuentra principalmente unido a proteínas y solo menos del 1 % es accesible para usos fisiológicos (metabolismo), toxicológicos (redox) o farmacológicos (quelación). El hierro se encuentra en los tejidos y el plasma, donde en condiciones fisiológicas se une a la proteína transferrina para su transporte (Tf). La forma no ligada a proteína más dañina de hierro es el hierro plasmático lábil (PLH), que tiene actividad redox, puede penetrar en los órganos e inducir una sobrecarga de hierro (Gucký and Hamuľáková 2024; Meguro et al. 2007).

Dentro de las células, el hierro es almacenado junto con la ferritina (Ft) y la hemosiderina (Hs). Sin embargo, también existe una forma lábil del hierro (FLH) que se caracteriza por ser un conjunto celular quelable, que incluye varias formas iónicas de hierro asociadas a ligandos. Estos ligandos pueden incluir polipéptidos, aniones orgánicos y componentes de la superficie de la membrana (Gucký and Hamuľáková 2024).

En resumen, la FLH existe tanto en forma celular como extracelular y generalmente incluye formas de hierro que pueden participar en los ciclos redox, por lo que pueden tener un papel en la generación de estrés oxidativo. Se ha demostrado un impacto significativo del aumento de las cantidades de FLH en la producción de ROS, la peroxidación lipídica y la muerte celular (Liu et al., 2018).

### 1.5.2.-Metabolismo y transporte del hierro en el sistema nervioso central

El mayor transportador de hierro en la sangre del organismo es la Tf. La Tf es una glicoproteína que posee dos grupos de unión de alta afinidad con el  $\text{Fe}^{3+}$ . Sin embargo, la BHE impide el libre paso de la Tf unida a hierro al SNC. Así pues, la entrada del hierro al SNC se produce a través de endocitosis mediada por un receptor de transferrina (TfR1), expresado en la membrana luminal de la célula endotelial. El Fe-Tf forma un complejo con el TfR1 cuando es endocitado. Al entrar en el sistema endocítico a través de vías dependientes de clatrina hacia el endosoma temprano, el bajo pH induce la disociación del hierro de Tf en forma de  $\text{Fe}^{3+}$ . La ferrireductasa Steap3 reduce el  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , que es transportado al citoplasma desde el endosoma por el transportador de metales divalentes-1 (DMT1). El complejo Tf/TfR1 regresa a la membrana plasmática, donde el pH neutro induce su disociación (Hare et al. 2013). Sin embargo, parece que, aunque mayoritaria, esta vía no constituiría el único mecanismo de entrada, sino que habría otras alternativas (Ilustración 12).



**Ilustración 12.-** Esquema de las vías principales de entrada y salida del hierro en las células. El receptor de Tf se une al Tf y hierro férrico y entra en el sistema endosomal. Sale de éste cuando baja el pH, en forma de hierro ferroso. Este hierro es utilizado en varios procesos fisiológicos, pero puede ser almacenado gracias a la ferritina. Cuando la cantidad es elevada puede salir de la célula mediante su transformación en hierro férrico por una ferroxidasa y salida por la ferroportina. La salida de hierro a través de la ferroportina puede ser bloqueada por la hepcidina. Creación propia en Bioreder.com.

Un segundo mecanismo implica la transcitosis del complejo Tf/TfR1 a través de la célula endotelial y la liberación de Tf hacia el parénquima en la membrana abluminal. Un tercer mecanismo depende de Ft, que está presente en el suero sanguíneo y en el LCR. La Ft sérica se compone principalmente de subunidades L con una o dos subunidades H. Estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado el transporte de Ft a través de la BHE, utilizando diferentes receptores; el receptor Scara5 reconoce a L-Ft, mientras que H-Ft se une a TfR1 (Hare et al. 2013; Wang et al. 2019).

En la cara abluminal del endotelio de la BHE, como hemos mencionado, se encuentran la membrana basal, los astrocitos y los pericitos (Ilustración 10). El hierro liberado por las células endoteliales es absorbido, probablemente, por los astrocitos cercanos a través de DMT1 y distribuido al parénquima cerebral a través de la ferroportina (FPN). La FPN se expresa en la BHE, los endotelios y el plexo coroideo, y especialmente en la superficie abluminal del endotelio. Este exportador de hierro es el responsable del flujo de hierro desde el epitelio intestinal hacia la sangre en presencia de la ferroxidasa, hepcidina (HP) y la ceruloplasmina (CP). La CP también se expresa principalmente en los pies finales de los astrocitos que rodean los capilares del cerebro (Chang 2019; Wang et al. 2019). El

hierro puede ser transportado hasta el intersticio (que se dispone entre el endotelio y los astrocitos o pericitos) desde los endosomas y los complejos Tf-RTf-Fe del endotelio, donde sería recaptado por Tf u otros ligandos de este espacio intersticial (Hare et al., 2013).

El DMT1 descrito anteriormente como el principal transportador intracelular de hierro, contribuye también a la captación de hierro no hemo en la mayoría de los tipos de células sistémicas. Cada isoforma DMT exhibe diferentes patrones de expresión dependiente del tipo celular y una distribución subcelular distinta, lo que permite a las células absorber eficientemente hierros unidos y no unidos a Tf (Hare et al., 2013; McAllum et al., 2020; Yanatori & Kishi, 2019).

Se sabe que las neuronas expresan TfR1 y DMT1, por lo que el hierro se internalizaría por ambos mecanismos; un mecanismo de endocitosis mediada por receptor TfR1 y otra pequeña cantidad de hierro no unido a Tf (NTBI). Los astrocitos y oligodendrocitos carecen de TfR1, por lo que la entrada de hierro parece ser por NTBI (Hare et al., 2013).

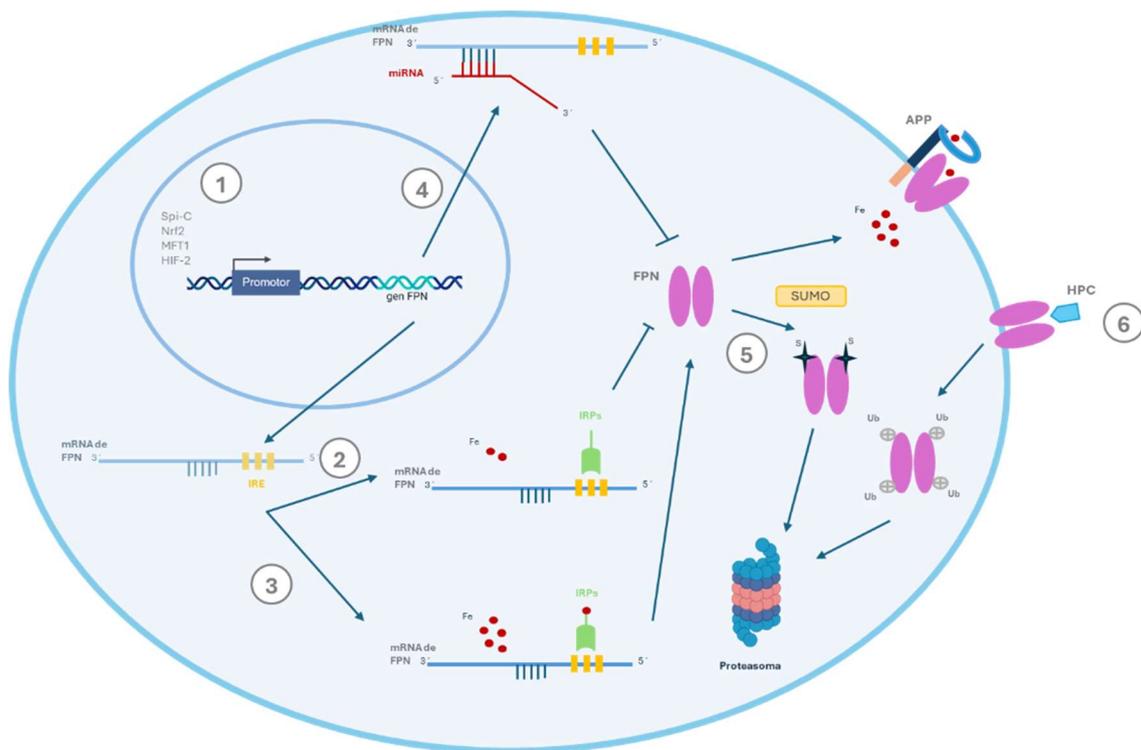
En el cerebro normal, el hierro puede reciclarse continuamente entre los astrocitos y las neuronas, con la Tf actuando como lanzadera. La CP unida a glicosilfosfatidilinositol (GPI) en los astrocitos funciona como una ferroxidasa, mediando la oxidación del hierro  $Fe^{2+}$  a hierro  $Fe^{3+}$  que es transportado desde el citosol hacia afuera por la FPN y para su posterior transferencia a Tf (Ilustración 12). Los astrocitos sin CP unida a GPI no pueden transportar hierro a Tf, por lo que las neuronas han de hacerse con hierro mediante mecanismos alternativos, como los NTBI (Miyajima 2015). Después de que el hierro se utilice para el metabolismo neuronal y glial y se almacene en ferritina (Ft), el exceso de hierro se libera a través de la FPN. El exceso de hierro puede exportarse de regreso al LI o liberarse al LCR en los ventrículos cerebrales (Chang 2019).

Una vez que el hierro se libera en el LI del cerebro, se distribuye y transporta entre diferentes tipos de células en diferentes regiones del cerebro. Una vez dentro de las células, el hierro sigue varias vías (Ilustración 12). Como hemos visto, en el citoplasma se incorpora en FLH que es un depósito de hierro metabólicamente disponible (LeVine 2024). El hierro FLH puede: (i) entregarse a las mitocondrias y utilizarse para la síntesis de hierro-azufre (Fe-S) y hemo, lo que apoya de manera crítica la respiración oxidativa celular, (ii) almacenarse dentro de una especie de nanojaulas de Ft, de las que el hierro puede liberarse por un proceso llamado ferritinofagia, y (iii) regresar al líquido extracelular a través del exportador de hierro FPN, un proceso que se combina con la oxidación del hierro por ferroxidasas para reponer la reserva de hierro unido a Tf y puede ser bloqueado por la hormona hepcidina (HPC)(LeVine 2024). El aumento de los niveles de la FLH en la célula, al ser activa, puede conducir a

la generación de ROS, peroxidación lipídica y, en última instancia muerte por ferroptosis (Jakaria et al. 2021).

### 1.5.3- Regulación del hierro

La homeostasis del hierro en el cuerpo se regula en dos niveles diferentes, a nivel sistémico y a nivel celular. Por un lado, el equilibrio del nivel de hierro en el organismo se logra principalmente a través de la absorción controlada del mismo proveniente de la dieta por parte de los enterocitos intestinales. Por otro lado, y a nivel celular, la regulación del hierro varía según el tipo de célula, debido a la expresión de ciertas proteínas reguladoras y transportadoras de hierro (Ilustración 13). En términos generales, las proteínas asociadas al metabolismo del hierro son reguladas por el estatus del hierro. En caso de bajas cantidades del ion, existen dos proteínas reguladoras (IRP, del inglés *iron regulatory protein*) que se unen con un elemento de respuesta al hierro (IRE, del inglés *iron responsive element*). Las IRPs, que incluyen a IRP1 e IRP2, regulan los niveles de los transportadores de hierro, como TfR1, DMT1 y FPN1, así como de la Ft (Meyron-Holtz et al. 2004; Mleczko-Sanecka and Silvestri 2021).



**Ilustración 13.-** Regulación multinivel de la expresión de ferroportina (FPN). (1) Control transcripcional: los factores de transcripción *Spi-c*, *Nrf2*, *MTF1* y *HIF-2α* activan la transcripción de *FPN*, mientras que factores aún desconocidos que responden a señales inflamatorias inhiben su transcripción. (2 y 3) Control postranscripcional: en condiciones de deficiencia de hierro, las proteínas reguladoras de hierro activas (IRP) se unen al elemento de respuesta al hierro (IRE) en el extremo 5' del ARNm de la *FPN*, bloqueando así su

*traducción. Cuando el hierro citoplasmático disponible es alto, los IRP unidos a hierro, potencian la traducción de la FPN. (4) El extremo 3' del ARNm de FPN es el objetivo de miARNs que impiden la expresión de FPN. (5) Nivel postraduccional, en el citoplasma, la FPN puede dirigirse al autofagosoma o, tras la sumoilación, al proteosoma. (6) En la superficie celular, donde la FPN libera hierro al espacio extracelular o al torrente sanguíneo, la HPC bloquea el transporte de hierro a través del poro y da como resultado la internalización, ubiquitinación y degradación proteasomal de la FPN. Modificado de Gammella et al. 2021.*

En general, cuando la concentración celular de hierro es baja, el centro activo de los IRP se une a la estructura de tallo-bucle del IRE ubicado en la región no traducida 3' de los ARNm de TfR1 y DMT1. Esta unión estabiliza los ARNm de TfR1 y DMT1 y aumenta su expresión celular, aumentando así la captación de hierro. Cuando la concentración de hierro es alta, el centro activo de los IRP está ocupado por cuatro Fe-S, lo que bloquea la unión de los IRP al IRE de TfR1 o DMT1, dando como resultado niveles bajos de traducción de TfR1 y DMT1 y, por lo tanto, reduciendo la captación de hierro (Gammella et al. 2021).

La regulación de la expresión de otro de los transportadores de hierro, la FPN, es complicada y está sujeta a un multicontrol transcripcional, postranscripcional y traduccional (Ilustración 13). Por un lado, los factores de transcripción Spic, Nrf2, MTF1 y HIF-2 $\alpha$  activan la transcripción de FPN, mientras que factores aún desconocidos que responden a señales inflamatorias la inhiben. De forma postranscripcional se ha descrito que el extremo 3' del ARNm de FPN es el objetivo de miARNs que previenen la expresión de FPN. Por otro lado, las IRP regulan la expresión de FPN a nivel postranscripcional a través del sistema IRP/IRE. En condiciones de deficiencia de hierro celular, las IRP activas se unen al IRE en el extremo 5' del ARNm de la FPN, bloqueando así su traducción. Cuando el hierro citoplasmático disponible es alto, los IRP unidos a hierro, potenciarían la traducción de la FPN (Gammella et al. 2021). Por último, a nivel postraduccional, la proteína FPN también está regulada por la HPC, ya que ésta puede reconocer y unirse a FPN en la membrana, lo que induce su internalización y degradación (Ginzburg 2019). El sistema IRP/IRE también regula la estabilidad de la Ft. La unión de los IRP al IRE del ARNm de Ft ubicado en su 5'-UTR suprime su traducción y provoca una menor expresión de la proteína. La pérdida funcional de los IRP induciría la deposición de hierro. Los modelos genéticos de ratones deficientes en hierro (IRP2 -/-) presentan actividad mitocondrial reducida, hipomielinización y neurodegeneración (Meyron-Holtz et al. 2004).

#### 1.5.4.-Distribución del hierro en el cerebro

La deficiencia de hierro periférico es una de las mayores alteraciones nutricionales del mundo desarrollado y produce, directa o indirectamente, varias patologías. Sin embargo, el hierro cerebral

es más resistente a los cambios dietéticos. El hierro no está presente al nacer y existen periodos críticos en su acumulo en el cerebro, entre los que destaca la época antes del destete. Se cree que el cerebro está en constante intercambio de hierro con la periferia, pero que posee un mecanismo homeostático que mantiene los niveles del hierro más o menos constantes dentro de un rango (Singh et al. 2014).

Diferentes análisis cuantitativos del hierro en varias regiones cerebrales han descrito una distribución heterogénea y compartimentada que depende de la ubicación anatómica (Ramos et al. 2014). En adultos sanos, la concentración máxima de hierro se encuentra en el sistema extrapiramidal, especialmente en el globo pálido (GP) a nivel de los ganglios basales, y también en la *pars reticulata* de la sustancia negra (prSN), el núcleo rojo y la circunvolución dentada cerebelosa, mientras que es relativamente baja en la corteza cerebral. Los niveles de hierro más bajos se encuentran en la sustancia blanca y el bulbo raquídeo (Aquino et al. 2009; Chang 2019; Ramos et al. 2014).

El depósito progresivo de hierro en diferentes estructuras del cerebro acompaña a los procesos normales de envejecimiento (Hare et al. 2013; McAllum et al. 2020), pero alcanza un alto grado en el cerebro de pacientes con ENs, como la EP o la EA (Chang 2019). En general, existe una tendencia al aumento significativo de los niveles de hierro en el cerebro en relación con la edad. En este sentido, los ganglios basales presentan una correlación directa, mientras que en otras regiones como el hipocampo este hecho no está claro (Ramos et al. 2014).

#### 1.5.5.-Regulación del hierro en la Enfermedad de Alzheimer

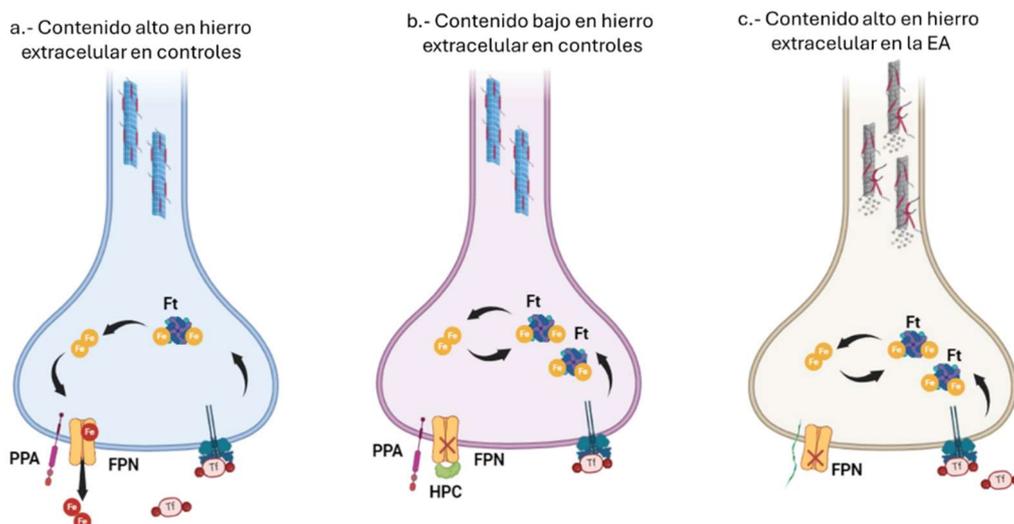
En la EA, la retención de iones de hierro se incrementa de tal forma que los niveles de este ion pueden servir como predictores de los déficits cognitivos y deficiencias motoras que acompañan a la patología (Ayton et al. 2020). El examen *post-mortem* de cerebros con EA ha revelado que la acumulación de hierro ocurre en las áreas que están más afectadas por los marcadores histopatológicos propios de la enfermedad, proponiéndose que éste estaría implicado en la agregación de las proteínas Tau y A $\beta$ , contribuyendo a la disfunción y muerte neuronal (Lei et al. 2021). Sin embargo, otros autores no han visto tal asociación (Van Duijn et al. 2017). Todavía se está lejos de conocer cuál es la relación entre la acumulación de hierro, la neurodegeneración y otros cambios patológicos (p. ej., agregados de A $\beta$  y Tau).

Además de la inflamación, existen otros mecanismos en la EA que pueden contribuir a una mayor acumulación de hierro, por ejemplo, la pérdida de interconexiones neuronales. En la esclerosis múltiple, la desmielinización puede explicar los niveles elevados de hierro en las estructuras de la

sustancia gris profunda al aumentar la demanda de energía debido a un mayor gasto necesario para bombear iones a través del axolema de los axones desmielinizados, lo que se ha denominado hipoxia virtual. Esto sugiere que algunos mecanismos de acumulación de hierro en la esclerosis múltiple podrían coincidir con los de la EA (LeVine 2024).

En este contexto, nace en los últimos años la “hipótesis de la ferroptosis” de la EA, que podría ser independiente de la “hipótesis A $\beta$ ” y de la “hipótesis de la proteína Tau”. Las características morfológicas típicas de la ferroptosis se han identificado en neuronas, junto con ciertos biomarcadores clásicos de este tipo de muerte anteriormente descubiertos en otros órganos y que apoyan que la muerte neuronal en esta patología está ligada a la deshomeostasis del hierro en la EA. Este descubrimiento se erige como un objetivo terapéutico prometedor para el tratamiento de ENS (Wang et al. 2022).

Estudios recientes de transcriptómica y proteómica confirman que las vías regulatorias relacionadas con el hierro están alteradas en el tejido cerebral afectado por EA (Lei et al., 2021). Cuando se sobrepasan los niveles de acumulación de hierro intracitoplasmático, éste puede salir de la célula a través de la FPN aligerando la carga de hierro en neuronas, microglía y astrocitos, lo que previene el daño de ROS catalizados por el hierro que podría llevar a la muerte celular (Ilustración 14).



**Ilustración 14.-** Esquema de la hipotética regulación de la salida de hierro neuronal en función de las concentraciones de este ion en el medio extracelular. (a) Concentración alta de hierro extracelular en controles sanos. La proteína amiloide (PPA) actuaría como ferroxidasa estabilizando la acción transportadora de la ferroportina (FPN). (b) Concentración baja de hierro en el medio extracelular en controles sanos. La hepcidina (HPC) bloquea la salida de hierro de la célula a través de su unión a FPN. (c) Concentración alta de hierro en el medio extracelular de pacientes con EA. La PPA no estaría presente, o estaría modificada, con lo que se vería afectado el transporte de hierro a través de la FPN en membrana, esto llevaría a un aumento del hierro almacenado dentro de la neurona. Creación propia con Biorender.com.

En el sistema nervioso, la FPN transportaría  $\text{Fe}^{2+}$  desde el citosol hacia fuera de la célula, en un proceso en el que una ferroxidasa, bien la PPA o la CP, mediaría la conversión del hierro  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$ . Según algunos autores, la expresión de FPN en el cerebro de la EA parece reducirse por razones inciertas lo que redundaría en un aumento dañino de hierro en las células (Raha et al. 2013). Teniendo en cuenta que la PPA parece estabilizar la expresión de FPN en la superficie celular, y ya que se han observado variantes sustanciales de PPA en pacientes con EA, no es descabellado pensar que la disminución de la expresión o de la función de FPN podría estar asociada con mutaciones de PPA (Duce et al. 2010). Las pruebas genéticas apoyan que la PPA es una metaloproteína con un papel integrador y facilitador en el metabolismo de los metales (Rogers et al. 2016). El daño en la PPA por la vía amiloidogénica característico de la EA, implicaría la desestabilización de FPN en la membrana. Se ha descrito, incluso, una posible función ferroxidasa de la PPA (Bandyopadhyay and Rogers 2014) (Ilustración 14). En esta línea, la hipótesis de Duce y colaboradores sostiene que el incremento del hierro en la patología exige una mayor producción de PPA para estabilizar la función de la FPN en membrana, pero su función estabilizadora se inhibe por el  $\text{Zn}^{2+}$  extracelular elevado, por lo que se disociaría en  $\text{A}\beta$ , entrando en juego la acumulación de este nuevo ion en la etiología de esta patología (Duce et al. 2010).

Como se ha comentado, parte importante de la regulación de la expresión de FPN a nivel sistémico ocurre a través de la hormona reguladora del hierro, la HPC. Esta hormona peptídica, secretada principalmente al torrente sanguíneo por los hepatocitos, es el principal regulador de la homeostasis sistémica del hierro a través de su interacción con FPN, debido a que provoca su internalización y bloquea su salida en respuesta a un aumento de los niveles de este ion (Raha-Chowdhury et al. 2015). La HPC controla la absorción del hierro de la dieta, su reciclaje por los macrófagos y la liberación de este de los depósitos hepáticos a través de la regulación de los niveles de transportadores de hierro, lo que genera una disminución de los niveles plasmáticos de este ion. Al unirse a la HPC, la FPN se internaliza y posteriormente se somete a degradación lisosomal (Nemeth et al. 2004; Nemeth and Ganz 2021), lo que resulta en una reducción de la concentración plasmática de hierro y un aumento de la Ft intracelular. La expresión de HPC está regulada a nivel sistémico por los niveles de hierro plasmático, la inflamación y la eritropoyesis. Por el contrario, la expresión de HPC disminuye en respuesta a la hipoxia y la anemia (Hadziahmetovic et al. 2011).

Aunque no son muchos los estudios a este respecto, la presencia de la HPC a nivel del SNC y su implicación en la homeostasis del hierro ha sido descrita de hace pocos años (Urrutia et al. 2017;

Zechel and Huber-Wittmer 2006). Así, se ha detectado ARNm de HPC en varias regiones cerebrales, entre ellas la corteza, el hipocampo, la amígdala, el tálamo, el hipotálamo, el bulbo olfatorio, el mesencéfalo, el cerebelo, la protuberancia y la médula espinal (Nemeth and Ganz 2023) A pesar de que se están llevando a cabo varios ensayos tanto en animales de experimentación, cultivos, como en humanos su papel en relación con el depósito de hierro todavía no está claro (Du et al. 2015; Urrutia et al. 2013). Por otro lado, también se ha definido su regulación al alza en la EA pero no se sabe su relación exacta con la progresión de la patología (Chaudhary et al. 2021).

El incremento de la entrada de hierro a través de la BHE, junto con la reducción de la exocitosis debido a la internalización endosómica de FPN y HPC, incrementaría la carga de hierro en las células nerviosas (Ilustración 14) (Bandyopadhyay and Rogers 2014). Existen por tanto un número suficiente de evidencias para pensar en un papel plausible de la HPC en los mecanismos patogénicos de la EA. La literatura existente se ha centrado principalmente en el estudio de FPN y HPC en células y modelos animales, por lo que sería realmente interesante el estudio de su papel en la EA en humanos. Como ocurre a nivel sistémico, la inflamación podría influir en la expresión de HPC a nivel del SN.

#### 1.5.6.- Técnicas para cuantificar el hierro en el sistema nervioso central

En las últimas décadas, se han utilizado muchas técnicas para evaluar las cantidades de hierro en el cerebro en la EA, cada una de ellas con sus particularidades (LeVine 2024). Las pruebas *post-mortem* tienen la ventaja de permitir mediciones directas del hierro en el cerebro, lo que actualmente no es posible en personas vivas. Las mejoras en las mediciones de imágenes por RMN, por su parte, permiten estimaciones cada vez más precisas de la carga de hierro en el cerebro (De Barros et al. 2019; van Oostveen et al. 2021). Los estudios cuantitativos *post-mortem* con tinción histológica (tinción de Perl y Turnbull) son imprecisos, pero ofrecen mapeo y la posibilidad de evaluar visualmente secciones teñidas con resolución celular. Además, las diferentes tinciones para el hierro permiten a los investigadores marcar selectivamente hierro no hemo:  $Fe^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$  o ambos (Meguro et al. 2003, 2007). Por el contrario, la mayoría de las técnicas físicas cuantifican las diferentes formas de hierro sin distinción.

Recientemente, sin embargo, un gran número de estudios intentan, sin haberlo conseguido aún, medidas del hierro cada vez mejores en vivo, con lo que la RMN cuantitativa podría constituirse en una técnica sensible para detectar cambios cerebrales tempranos *in vivo* en la sobreacumulación de hierro en regiones subcorticales del cerebro en personas con EA sintomática y asintomática (Bulk et al. 2020; Lin et al. 2023; van Oostveen et al. 2021; Spotorno et al. 2020). Además, también se ha

demostrado que la aplicación del mapeo cuantitativo de susceptibilidad (QSM) para la detección de hierro *in vivo* tiene algún valor clínico (Uchida, Kan, Sakurai, Oishi, et al. 2022). Aunque la susceptibilidad medida por QSM no es específica, se considera una medida general del hierro cortical en el estudio de las ENs (Gong et al., 2019; Nikparast et al., 2022; Uchida et al., 2022). Esta técnica tiene la ventaja de que podría proporcionar información que demuestre una relación entre el hierro y la agregación de proteínas características de la EA (Tau y A $\beta$ ). De hecho, se ha observado una asociación entre el depósito de hierro en la corteza cerebral y la Tau-PET (tomografía de emisión de positrones) que ayuda a avanzar en la comprensión del papel de la desregulación del hierro en la neurodegeneración de la EA (Spotorno et al. 2020). Otros autores encontraron una relación entre la acumulación de hierro relacionada con la edad y las imágenes de PET con Tau, pero los datos de la corteza cerebral fueron inconsistentes (Cogswell et al. 2021; Cogswell and Fan 2023). Los datos sobre la relación QSM entre hierro y amiloide en áreas corticales muestran más variabilidad en la literatura previa. Algunos estudios observaron correlaciones positivas entre la susceptibilidad y la PET con amiloide en la corteza frontotemporal (Ayton et al. 2017; Spotorno et al. 2020), mientras que otros no encontraron relaciones significativas (Cogswell et al. 2021; Cogswell and Fan 2023). Aunque se ha demostrado que el hierro se encuentra cerca de las PS en la EA, facilitando potencialmente la deposición de amiloide, la correlación entre ambos, hierro y amiloide, no es concluyente. Esto podría deberse a que los niveles de hierro en la corteza permanecen dentro de los límites de detección del QSM. Un análisis crítico de la técnica QSM sospecha que las propias fibrillas de amiloide pueden reducir el contraste, especialmente en el cerebro humano, generando efectos que contrarrestan la generación de mapas QSM (Uchida, Kan, Sakurai, Oishi, et al. 2022).

Es necesario continuar en la búsqueda de técnicas físicas, químicas o ambas, que permitan la cuantificación exacta y la localización del hierro, pero también la colocalización con otras proteínas relacionadas con la patología, como son las proteínas por deposición y aquellas implicadas en el transporte y acumulación de este ion.

## 2.-HIPÓTESIS DE PARTIDA Y OBJETIVOS

En base a lo anteriormente expuesto, queda claro que la EA es una neuropatología multifactorial caracterizada anatomopatológicamente por la presencia de depósitos de amiloide y ONF. Se ha sugerido que el desbalance de los iones metálicos en el cerebro puede amplificar e incluso generar el plegamiento de las proteínas fibrilares A $\beta$  y Tau, la principal causa del comienzo de la enfermedad. Entre los iones que se encuentran en el encéfalo, el hierro se acumula progresivamente con la edad y se ha descrito que aumenta considerablemente en la EA. En la actualidad, la cantidad de hierro se presenta como un biomarcador posible de la patología y se están buscando técnicas que lo cuantifiquen fielmente en el cerebro *post-mortem* pero, principalmente, *in vivo*. Por tanto, uno de los puntos críticos en este tema es la identificación de una técnica fiable para cuantificar el acumulo de hierro en la EA, ya que ninguna es completa y la mayor parte no son exactas. En base a ello, un primer objetivo general de esta Tesis ha sido la búsqueda de un método de cuantificación de la cantidad de hierro cerebral *post-mortem* en dos zonas preseleccionadas del encéfalo: el hipocampo, una de las primeras áreas donde comienzan los cambios anatomopatológicos de la EA y los ganglios basales, donde han sido descritos los mayores acúmulos de hierro a nivel cerebral.

Por otra parte, y teniendo en cuenta la hipótesis de que la regulación de los niveles de hierro intracelular son críticos en la neurodegeneración que acompaña a la EA, otro objetivo de este trabajo de investigación ha sido ahondar en la relación del hierro con la patología y el papel de las proteínas implicadas en su transporte, FPN y HPC, con el fin de averiguar su relación con la progresión de la EA. El tema es novedoso, existen pocos estudios sobre este tándem de regulación de la salida de hierro de las células nerviosas y gran parte de ellos son en modelos experimentales de EA. Por ello la hipótesis de partida fue que estas proteínas tienen un papel importante en la acumulación de hierro en la EA y que el desarrollo o progresión de la enfermedad está relacionado con ambas moléculas.

Para llevar a cabo estos objetivos generales nos hemos fijado los siguientes objetivos específicos:

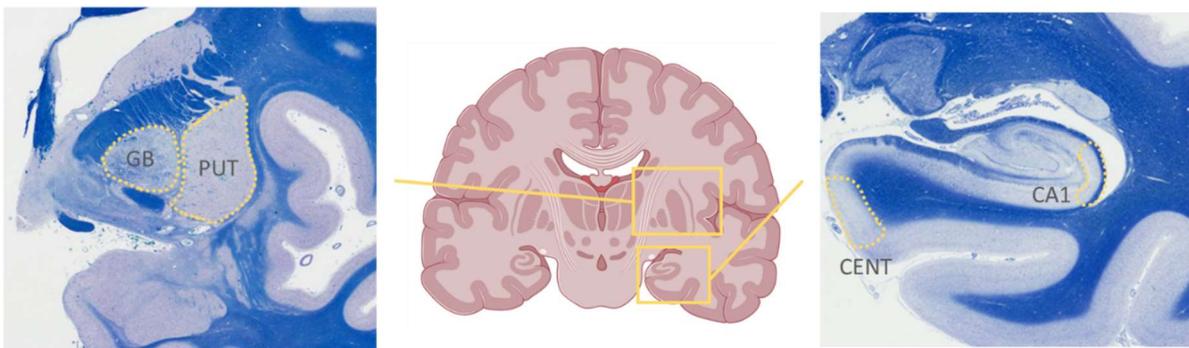
1. Localizar histológicamente y cuantificar el hierro en dos áreas cerebrales diferentes de muestras de pacientes de EA según avanza la patología mediante técnicas histoquímicas y analíticas desarrolladas a tal fin.
2. Localizar y cuantificar dos proteínas relacionadas con el metabolismo del hierro, tanto en controles como pacientes de EA, como son la FPN y HPC en las áreas anteriormente mencionadas.
  - a. Localización citoarquitectónica de ambas proteínas.

- b. Analizar la relación entre ambas proteínas.
- 3. Analizar en las áreas escogidas, la relación entre la cantidad de hierro cerebral, las proteínas relacionadas con el transporte de éste y los estadios de EA y la edad de los sujetos.
  - a. Localizar y cuantificar los marcadores anatomopatológicos clásicos, A $\beta$  y Tau, en controles y pacientes de EA.
  - b. Analizar la relación entre la cantidad de hierro, proteínas transportadoras, marcadores anatomopatológicos y su relación con los estadios de la enfermedad.

### 3.-MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1.-Obtención de muestras

Las secciones de tejido cerebral humano utilizadas en este trabajo proceden del Banco de Tejidos Neurológicos del Principado de Asturias, el cual nos proporcionó muestras de pacientes con EA y de individuos sanos de diversas edades. Se eligieron dos zonas para los diferentes estudios, la corteza parietal y los ganglios basales. En la corteza se seleccionó el hipocampo (área CA1) y la corteza entorrinal (CENT) como áreas de interés, ya que son las primeras zonas en mostrar cambios degenerativos en la EA, en base a las recomendaciones de Braak (Braak & Braak, 1991) y los criterios diagnósticos CERAD (Mirra et al., 1991). Por otra parte, se eligieron los núcleos putamen (PUT) y globo pálido (GP) de los ganglios basales, por ser zonas muestreadas habitualmente en los biobancos y mostrar mayor cantidad basal de hierro que otros territorios cerebrales (las zonas de interés pueden verse en la Ilustración 15).



*Ilustración 15.- Las muestras utilizadas para el estudio aparecen recuadradas en amarillo. CA1: Cornu Ammonis 1; CENT: corteza entorrinal; GB: globo pálido; PUT: putamen. Imágenes tomada del Atlas Humano de Allen Institute for Brain Science (Allen 2019).*

El presente estudio se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el "Comité Ético de Investigación Clínica Regional del Principado de Asturias" (CEICr). Estos estudios recibieron el consentimiento sobre las siguientes bases: (i) las muestras se recogieron retrospectivamente de los archivos de patología de las necropsias realizadas con fines de diagnóstico y que habían firmado un consentimiento, (ii) las identidades de los pacientes se anonimizaron completamente y se diferenciaron de los identificadores únicos, y (iii) no hubo ningún tipo de riesgo para los participantes.

La Tabla II contiene los detalles de los diferentes donantes. A los pacientes se les diagnosticó clínicamente EA, la cual fue confirmada *post-mortem*. Los diferentes casos se clasificaron en función

de su estadio neuropatológico de EA, según los criterios de Braak (Braak & Braak, 1991). El tejido se obtuvo de las necropsias realizadas entre 6 y 12 h después de la muerte. Cuando hubo sospecha de infartos cerebrales, tanto macroscópicos como microscópicos, se diseccionaron las áreas para su confirmación histológica mediante la reacción de Perls y luego esos casos se rechazaron.

Tabla II.- Datos relevantes de los casos utilizados en el estudio.

Número	Código	Sexo	Edad	Diagnóstico
1	17-015-1	M	77	Enfermedad de Alzheimer. Estadio V-VI de Braak y angiopatía amiloide asociada.
2	17-015-2(#7)	M	91	Enfermedad de Alzheimer. Estadio V-VI de Braak.
3	17-015-3	H	61	Enfermedad de Alzheimer variante asociada a gen de la Presenilina 1.
4	17-015-4 (#5)	M	84	Enfermedad de Alzheimer. Estadio I-II de Braak.
5	17-015-5	H	68	Enfermedad de Alzheimer. Estadio VI de Braak y angiopatía amiloide asociada.
6	17-015-6(#8)	H	62	Enfermedad de Alzheimer. Estadio VI de Braak.
7	17-015-7	H	72	Enfermedad de Alzheimer. Estadio III de Braak.
8	17-015-8(#6)	H	77	Enfermedad de Alzheimer. Estadio IV de Braak. Cambios hipocampales secundarios a antigua hipoxia.
9	17-015-9	H	41	Cerebro normal para la edad del paciente.
10	17-015-10	H	19	Cerebro normal para la edad del paciente.
11	17-015-11(#3)	H	82	Cerebro normal para la edad del paciente.
12	17-015-12(#2)	M	71	Cerebro normal para la edad del paciente.
13	17-015-13(#4)	M	100	Cerebro normal para la edad del paciente.
14	17-015-14(#1)	M	57	Cerebro normal para la edad del paciente.
15	17-118-1	M	76	Enfermedad de Alzheimer. Estadio VI de Braak.
16	17-118-2	H	40	Cerebro normal para la edad del paciente.
17	17-118-3	M	41	Cerebro normal para la edad del paciente.
18	18-017-1	M	71	Enfermedad de Alzheimer. Estadio I de Braak.
19	18-017-2	M	65	Cerebro normal para la edad del paciente.

M: mujer; H: hombre; #: caso utilizado para técnicas analíticas

Las muestras pertenecían tanto a hombres como a mujeres de edades comprendidas entre 19-100 años, entre las que había cerebros normales y cerebros que presentaban la neurodegeneración objeto del presente estudio. Se estudiaron un total de 19 casos, 9 casos control y 10 casos con EA (Tabla II) que fueron divididos en tres grupos de edad para el posterior análisis de los resultados, siendo estos: 20-40 años (n=4), 50-70 años (n=11) y 80-100 años (n=4). Para el análisis de datos, los casos EA se dividieron en dos grupos en función del estadio de Braak asignado, siendo estos: casos con EA moderado (estadio I-III; n=3) y casos con EA severo (estadio IV-VI; n=8).

### 3.2.-Procesamiento de muestras

Las muestras de tejido cerebral humano fueron fijadas por inmersión en formalina al 10% en tampón fosfato 0,1 M (pH=7,4). Tras la fijación, el tejido fue deshidratado en alcoholes en concentración creciente, pasados por dos baños de acetato de butilo, y embebidos posteriormente en parafina tras un paso previo por acetato de butilo. Todas las muestras han sido tratadas por igual, con el mismo protocolo y los mismos tiempos para asegurar la comparación entre ellos. Las secciones se obtuvieron con un microtomo de tipo Minot (Leica) a un grosor de 5-7  $\mu\text{m}$ . Los cortes fueron estirados y adheridos sobre portas gelatinizados, dejándose secar durante 24 horas en una estufa a 36°C.

Por otro lado, se utilizaron cortes de intestino e hígado de los controles (#1, #4) como controles positivos ya que la distribución de FPN está bien estudiada en la membrana basolateral intestinal (Figura S1). Estas secciones fueron tratados de la misma forma.

Cabe mencionar, que se ha trabajado con dos secciones consecutivas de los tejidos para realizar dos protocolos de inmunohistoquímica (IHQ): (i) IHQ cromogénica convencional con tinción con diaminobencidina (DAB) para su evaluación microscópica, y (ii) protocolo IHQ con AuNCs para la imagen del hierro y de la FPN empleando LA-ICP-MS.

### 3.3.- Histoquímica

Las secciones sometidas al estudio citoarquitectónico se tiñeron utilizando un procedimiento de tinción tipo Nissl (Navarro et al., 2013). También se realizaron técnicas rutinarias para el diagnóstico y estudio de la EA. Así, para visualizar los marcadores cerebrales típicos de la neuropatología se utilizó la técnica de la plata de Reusche (Reusche 1991) así como una modificación del método del rojo Congo desarrollado en nuestro laboratorio (Navarro et al., 1999, 2013).

Para la localización y cuantificación del hierro no hemo se usó la técnica histoquímica de Perls (Kiernan 2008; Meguro et al. 2003, 2007). Esta técnica consiste en la liberación del hierro unido a la ferritina y a la hemosiderina a través del ferrocianuro ácido. El hierro precipita formando depósitos azules. Para observar los núcleos se utiliza una contratinción con safranina 0,5 % en agua (Kiernan 2008).

### 3.4.- Inmunohistoquímica

Para la localización de las proteínas objeto de estudio, FPN y HPC, Tau y A $\beta$ , se empleó una técnica de IHQ convencional en secciones consecutivas para cada uno de los casos. Previamente, las

secciones fueron desparafinadas en xilol y rehidratadas en alcoholes sucesivos en concentración decreciente hasta el agua. Posteriormente, las secciones fueron tratadas con Triton X (0,1%, 5 min), lavadas con agua destilada. A continuación, se procedió al bloqueo de la peroxidasa endógena mediante un tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%, 5 min). Tras ser nuevamente lavadas con agua destilada, las secciones se trataron con PBS (tampón fosfato salino, del inglés *phosphate buffer saline*) (2 min), y con una solución de bloqueo con BSA 1% (albúmina de suero bovino, del inglés *bovine serum albumine*) (30 min). Las muestras se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda a las concentraciones que pueden verse en la Tabla III. Al día siguiente, las secciones se lavaron con PBS, se incubaron con un anticuerpo secundario biotinilado en dilución 1:50 (Universal Quick, PK-8800 Vector Laboratorios) durante 30 min a temperatura ambiente, se lavaron de nuevo con PBS, y fueron tratadas con un complejo avidina-peroxidasa (E2886, Sigma) durante 30 min. Por último, se realizó un revelado con el cromógeno DAB (D5637 Sigma). Las muestras fueron contrastadas siguiendo un protocolo de nuestro grupo de investigación (Navarro et al., 1999), y se realizó su montaje con el medio Mountex (Mounting Media Mountex, Taab). Los anticuerpos primarios empleados en la detección de cada proteína se muestran en la Tabla III.

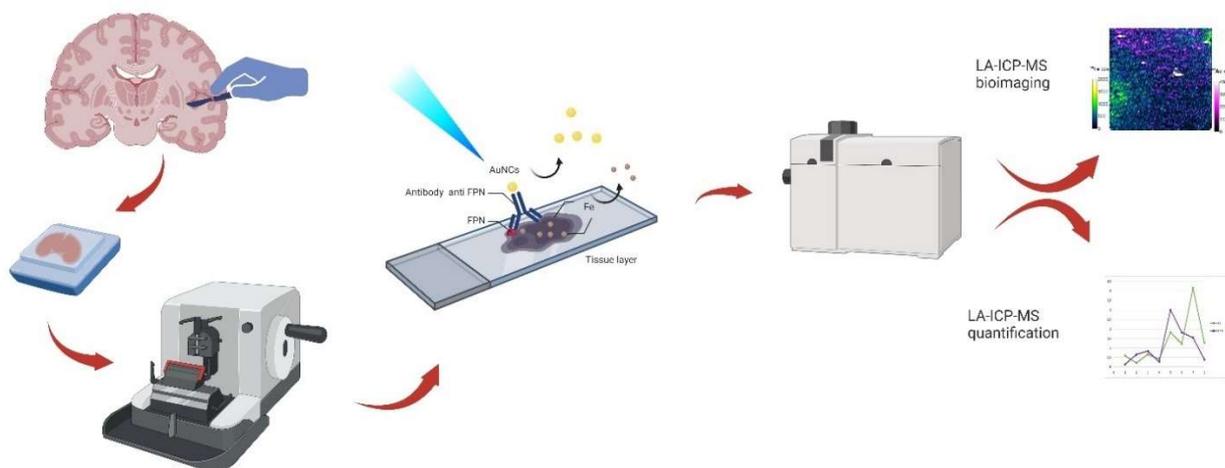
Tabla III.- Anticuerpos primarios empleados y dilución utilizada.

Proteína	Anticuerpo primario	Referencias	Dilución	Especificidad
<b>FPN</b>	Ferroportin-1 (LifeSpan Biosciences, Inc.)	LS-B1836	1:500	Principal exportador de hierro de las células. Se encuentra en macrófagos, enterocitos duodenales, trofoblastos, eritrocitos y hepatocitos..
<b>HPC</b>	HEPC (OriGen Technologies Inc.)	AM21007PU-N	1:200	Este anticuerpo reconoce el péptido antimicrobiano de hepcidina (HAMP) que funciona como una molécula de señalización involucrada en el mantenimiento de la homeostasis del hierro.
<b>Tau</b>	Tau-2 (Novocastra)	NCL-Tau-2	1:50	Tau fosforilada; Ovillos neurofibrilares, hilos en el neuropilo y neuritas dísticas que rodean las placas seniles.
<b>Aβ</b>	Beta Amyloid (Novocastra)	NCL-beta-amyloid	1:50	Reacciona contra la beta-amiloide humana; formas no agregadas, oligoméricas y fibrilares de AB42 sintético y AB40 no agregado.

Los controles positivos para FPN y HPC como hemos comentado, se realizaron sobre cortes de intestino e hígado humanos, respectivamente. Como control negativo se utilizaron secciones no tratadas con el anticuerpo primario; bajo estas condiciones no se observó inmunodetección específica en ninguno de los casos (Figura S1).

### 3.5.- Registro del hierro utilizando LA-ICP-MS

Para poder analizar la cantidad de hierro y las proteínas relacionadas con su metabolismo, se empleó un espectrómetro de masas con Plasma Acoplado Inductivamente y Ablación con Láser (LA-ICP-MS, del inglés *Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*). La LA-ICP-MS es una tecnología analítica potente que permite realizar análisis altamente sensibles de elementos e isótopos directamente sobre muestras sólidas. La LA-ICP-MS consiste, básicamente, en un haz de láser que se enfoca en la superficie de la muestra para generar partículas finas, en un proceso conocido como ablación con láser. Las partículas ablacionadas son transportadas, posteriormente, a la fuente de excitación secundaria del instrumento ICP-MS para la digestión e ionización de la masa muestreada. Los iones excitados se introducen en un detector de espectrómetro de masas para realizar un análisis tanto de elementos como de isótopos. La utilización de la LA-ICP-MS permite construir una imagen (*bioimaging*) de los iones de elección en la muestra, además de su cuantificación (Ilustración 16). No obstante, para esta técnica es necesaria una etapa previa de preparación en la que las proteínas de interés sean marcadas con un heteroátomo fácilmente medible por ICP-MS. En nuestro caso, los iones buscados fueron el hierro (Fe) que estaba en la muestra y el oro (Au) unido a un anticuerpo primario utilizado en la IHQ frente a una proteína de interés.



*Ilustración 16.- Esquema gráfico de la técnica LA-ICP-MS empleada. Creación propia en Biorender.com.*

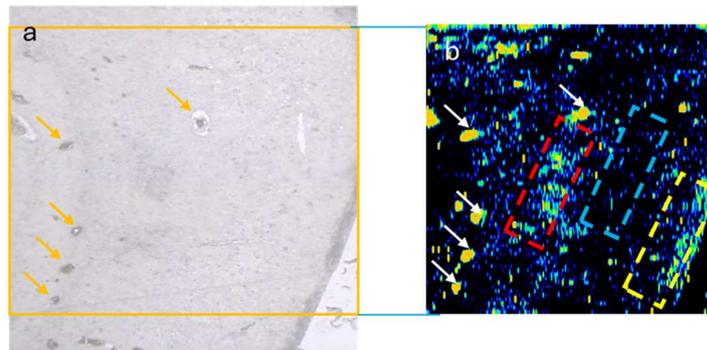
La combinación de un proceso de IHQ con la posterior detección por LA-ICP-MS permite conocer la distribución de la biomolécula de interés en estructuras micrométricas de tejidos biológicos. Los análisis LA-ICP-MS se realizaron con un sistema LA comercial (LSX-213 de Teledyne Cetac

Technologies, Omaha, NE, EE. UU.) acoplado a un campo ICP-MS sectorial de enfoque dual (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania), trabajando en modo de resolución de masa media para eliminar interferencias poliatómicas de los isótopos buscados (es particularmente importante en nuestro caso evitar la interferencia de  $^{40}\text{Ar}^{160}$  de  $^{56}\text{Fe}$ ). La celda de ablación comercial del sistema LSX-213 fue reemplazada por una cámara de ablación refrigerada Peltier, construida internamente con un volumen interno reducido que permite mantener constante la temperatura de la muestra a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El acoplamiento LA-ICP-MS fue optimizado diariamente usando el estándar de vidrio SRM NIST 612 para alta sensibilidad, intensidad de fondo y la relación de señal  $^{238}\text{U}/^{232}\text{Th}$  que debe estar cerca de 1. También se midió la relación de señal  $^{248}\text{ThO}/^{232}\text{Th}$  para controlar la formación de óxido, siempre por debajo del 0,5% en las condiciones optimizadas seleccionadas.

En la IHQ con nanoclusteres de oro (AuNC), para el estudio de la cantidad de FPN con LA-ICP-MS, el anticuerpo FPN se conjugó previamente a un AuNC, de acuerdo con un procedimiento descrito previamente (Cruz-Alonso et al. 2019). Después del bloqueo, se añadió el anticuerpo anti-FPN marcado con AuNC ( $5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ) a las secciones y se incubó durante la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Después de esto, se realizó un paso de lavado final con PBS y los portaobjetos se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis LA-ICP-MS.

Se ablacionaron las secciones de tejido cerebral en modo de escáner proporcionado por el aparato utilizando un haz láser de  $10\text{ }\mu\text{m}$  de diámetro (Ilustración 17a). Los puntos láser superpuestos y las altas tasas de repetición (20 Hz) dan como resultado un modo de escaneo diferencial, de modo que se logró una mejor resolución lateral que el diámetro del punto láser seleccionado. Las muestras se sometieron a ablación línea por línea en condiciones optimizadas de LA-ICP-MS. En todos los casos, se escanearon secciones del hipocampo humano (la capa CA1) con un rayo láser utilizando un promedio de 70 a 80 líneas individuales. Las condiciones experimentales se optimizaron en términos de máxima sensibilidad y resolución lateral. Para el procesamiento de datos de imágenes, la contribución del objetivo de gas se eliminó de las señales de intensidad brutas, para trabajar entonces con datos de intensidades netas. Las imágenes bidimensionales obtenidas por LA-ICP-MS se crearon utilizando el software ImageJ-Fiji (Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, EE. UU.).

El software se utilizó también para separar los datos de la cuantificación de las zonas diferentes en que se organiza la CA1 del hipocampo y poder comparar la cantidad de hierro y oro entre los controles y la EA. Estas zonas fueron tres: *Stratum oriens* (SO), *Stratum pyramidale* (SP) y *Stratum molecular-radiatum* (SMR) (Ilustración 17).



**Ilustración 17.-** Evaluación de la distribución de Fe en secciones CA1 mediante LA-ICP-MS (diámetro del tamaño del punto láser 25  $\mu\text{m}$ ). (a) Imagen de transmisión de la región CA1 del hipocampo del cerebro con EA (donante #6) tomada con la cámara escáner del aparato. (b) Imagen cualitativa correspondiente de la distribución de  $^{56}\text{Fe}^+$ . Las flechas indican el hierro hemo dentro de vasos sanguíneos grandes en ambas imágenes. Los recuadros indican la zona donde se ha realizado la recogida de datos. En rojo, estrato molecular-radial (SMR); en azul, estrato piramidal (SP) y en amarillo, estrato oriens (SO).

Para la calibración del aparato y poder realizar una cuantificación exacta la distribución del hierro y la proteína FPN (anticuerpos marcados con nanoclusters de oro, AuNC) en secciones de cerebros humanos, se emplearon estándares de gelatina con concentraciones conocidas de hierro y oro. Las curvas de calibración para Au y Fe se crearon utilizando estándares con concentraciones conocidas que oscilaban entre 0 y 60  $\mu\text{g}$  de Au.  $\text{mL}^{-1}$  y de 0 a 52  $\mu\text{g}$  Fe.  $\text{mL}^{-1}$  respectivamente. Estos estándares se prepararon mezclando gelatina al 15 % (p/p) con las soluciones de  $\text{NaAuCl}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  para calibraciones de Au y Fe respectivamente. La mezcla se homogeneizó calentando y agitando a 60 °C y luego se congeló a -20 °C. El estándar de gelatina congelada se cortó en secciones de 5  $\mu\text{m}$  de espesor (semejantes a las de tejido), se montaron en portaobjetos de vidrio para microscopio y se determinaron sus concentraciones de Au y Fe usando nebulización convencional. Se usó el ICP-MS después de digestión ácida con  $\text{HNO}_3$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Cruz-Alonso et al. 2019).

### 3.6.- Observación de muestras y captación de imágenes

El objetivo de la captación de imágenes fue llevar a cabo una cuantificación de la señal IHQ para cada una de las proteínas estudiadas. Para ello, se tomaron 3 micrografías de cada zona elegida (para cada proteína y cada caso) con un aumento de 20x. En la zona CA1 del hipocampo se tomaron fotografías paralelas a la parte externa del giro dentado; en la CENT fueron tomadas en la parte más posterior. En el GP y el PUT se realizaron las fotos de forma aleatoria en cada área. Las secciones se fotografiaron mediante una cámara Nikon adaptada a un microscopio Nikon Eclipse E400.

### 3.7.- Análisis de imágenes inmunohistoquímicas

Para realizar la determinación de los niveles de las proteínas de interés en los tejidos tras el procedimiento IHQ, la señal cromogénica se ha seleccionado utilizando el programa Adobe Photoshop CS 8.0.1 (Adobe, California, Estados Unidos) y la densidad se ha medido mediante el software ImageJ 1.37c (Wright Cell Imaging Facility, Toronto, Canadá), mediante la aplicación de un método desarrollado en nuestro laboratorio (Tolivia et al. 2006). El protocolo de tratamiento de las imágenes se describe brevemente a continuación (ilustración 18):

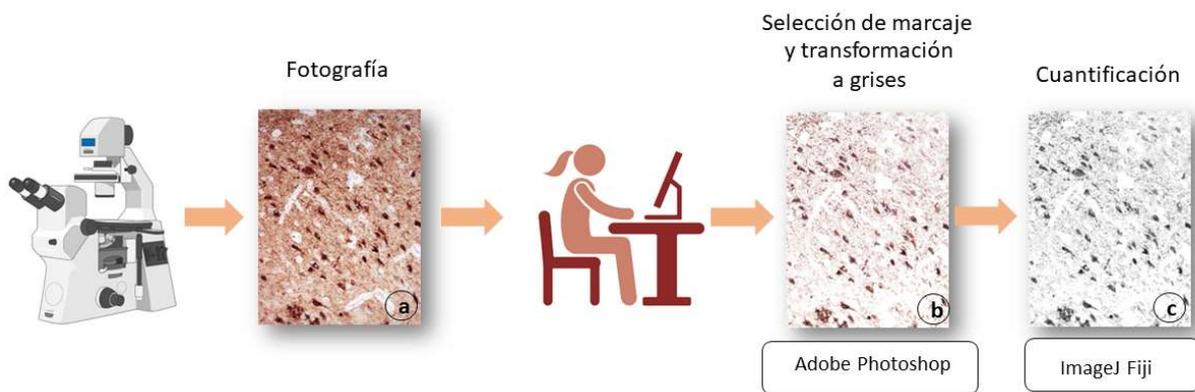


Ilustración 18.- Análisis densitométrico del marcaje inmunohistoquímico .Creación propia con Power Poinet.

- Para seleccionar la señal cromogénica específica, se selecciona "Rango de color" en el "Menú de selección" de Photoshop, y con la herramienta "Cuentagotas", se hace clic en cualquier objeto de la imagen que muestre el color deseado (es decir el color del cromógeno empleado en el procedimiento IHC). De esta manera todas las áreas dentro del rango de color seleccionado se resaltan en una imagen duplicada. Una vez finalizada la selección de cromógeno, el perfil utilizado puede archivarse para su uso con secciones teñidas similares.
- Se cierra el panel de "Gama de colores" y todos los objetos inmunopositivos en la imagen original aparecen resaltados.
- Se abre el menú "Editar" de *Photoshop* y se selecciona "Copiar" en un "Nuevo archivo" y "Pegar" la imagen seleccionada. La nueva imagen muestra sólo las áreas seleccionadas positivas sobre un fondo blanco.
- Se convierte la imagen a escala de grises para que todas las áreas seleccionadas se representen en tonos de gris y se correlacionan con la intensidad del cromógeno. Esta imagen

en escala de grises se debe guardar en formato '*tif*' para que luego se pueda abrir en el programa *ImageJ*.

- Se abre la imagen en este programa y se calcula la "Densidad media" en condiciones de "No calibrado". Las medidas obtenidas muestran la intensidad de la señal y se pueden copiar y exportar a una hoja de cálculo (p.e., Excel) donde fueron clasificados en función del caso, el sexo, la edad, la zona estudiada y la proteína cuantificada.

### **3.8.- Análisis estadístico**

Los datos obtenidos fueron extraídos y trasladados al programa GraphPad Prism 8 para realizar los cálculos pertinentes y el análisis estadístico. En todos los casos se asumió la independencia y aleatoriedad de las muestras, y se comprobó la normalidad y la homogeneidad de varianzas. Posteriormente, test de análisis de varianzas (ANOVA), de uno o dos factores, seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Durante todo el estudio se utilizó un nivel de significación de 0,05. Los datos en las gráficas se representan como las medias  $\pm$  SEM.

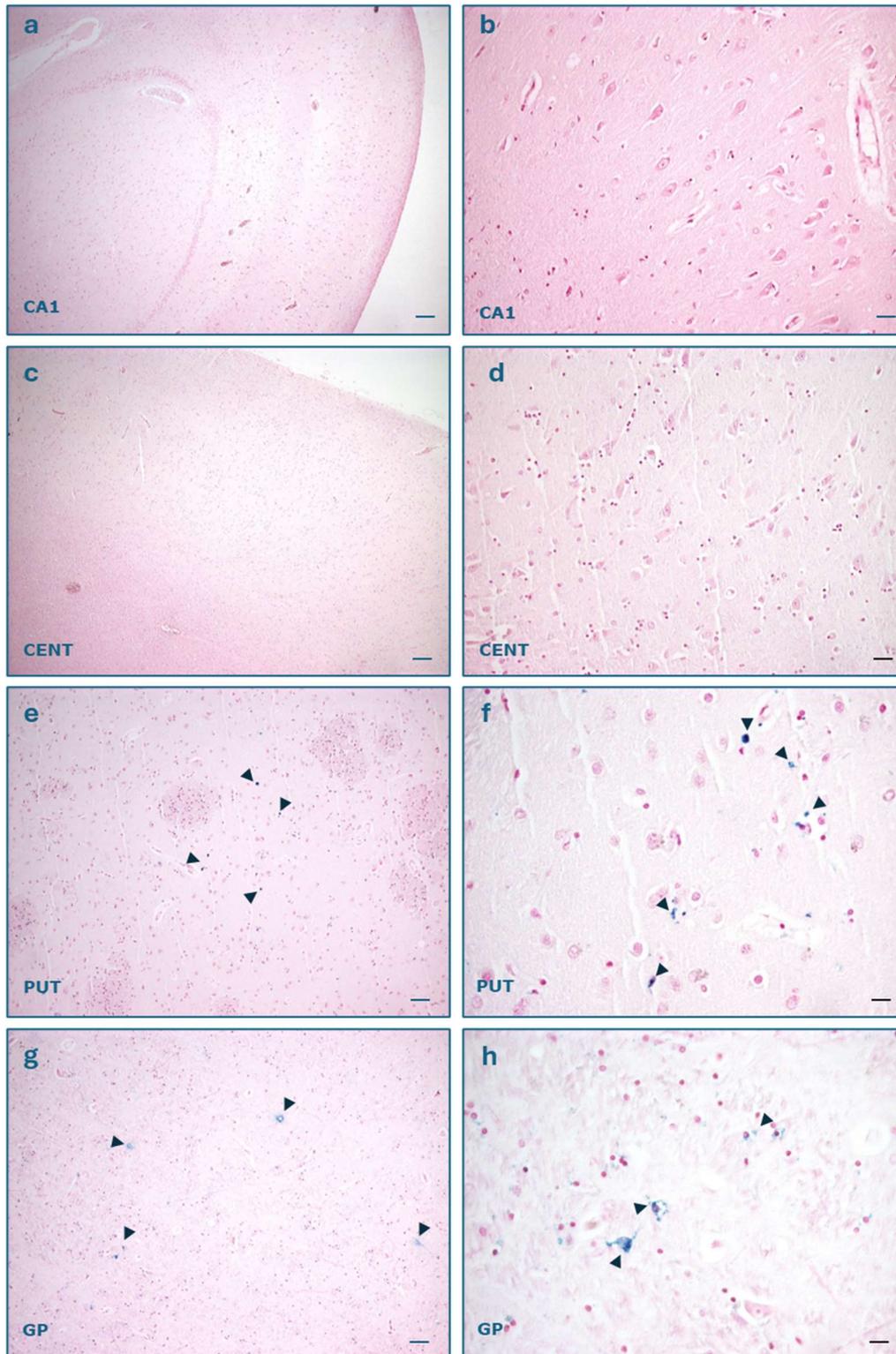


## 4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1.- Detección de hierro cerebral mediante técnicas histoquímicas

Con el fin de localizar y cuantificar el hierro no hemo en las muestras de hipocampo y CENT, así como en los núcleos PUT y GP de los ganglios basales, se utilizó, en primer lugar, la técnica histoquímica clásica de Perls. Esta técnica es una de las más usadas en el diagnóstico anatomopatológico (Bautista et al. 2008), ya que permite poner de relieve no solo el ion más abundante en el cerebro (Meguro et al., 2007) sino también aquel que presenta más capacidad de producir radicales libres. El término hierro no hemo incluye especies heterogéneas de complejos de hierro en los que este ion está más débilmente unido a bases orgánicas y proteínas de bajo peso molecular que el hemo (complejo hierro-protoporfirina). El hierro no hemo, por tanto, se libera en soluciones ácidas siendo fácilmente detectable mediante técnicas histoquímicas convencionales, como la mencionada técnica de Perls específica para el ion férrico. En este caso, aparece un precipitado en un color azul oscuro visible al microscopio, denominado azul de Prusia, allí donde están los iones y de Turnbull (para el ion ferroso) que terminan en la producción de compuestos de hierro insolubles visibles al microscopio (Kiernan 2008). Por el contrario, la tinción del hierro hemo es poco probable con este método, ya que se requiere un tratamiento con un oxidante muy fuerte para liberar y activar el hierro del grupo hemo (Meguro et al. 2003).

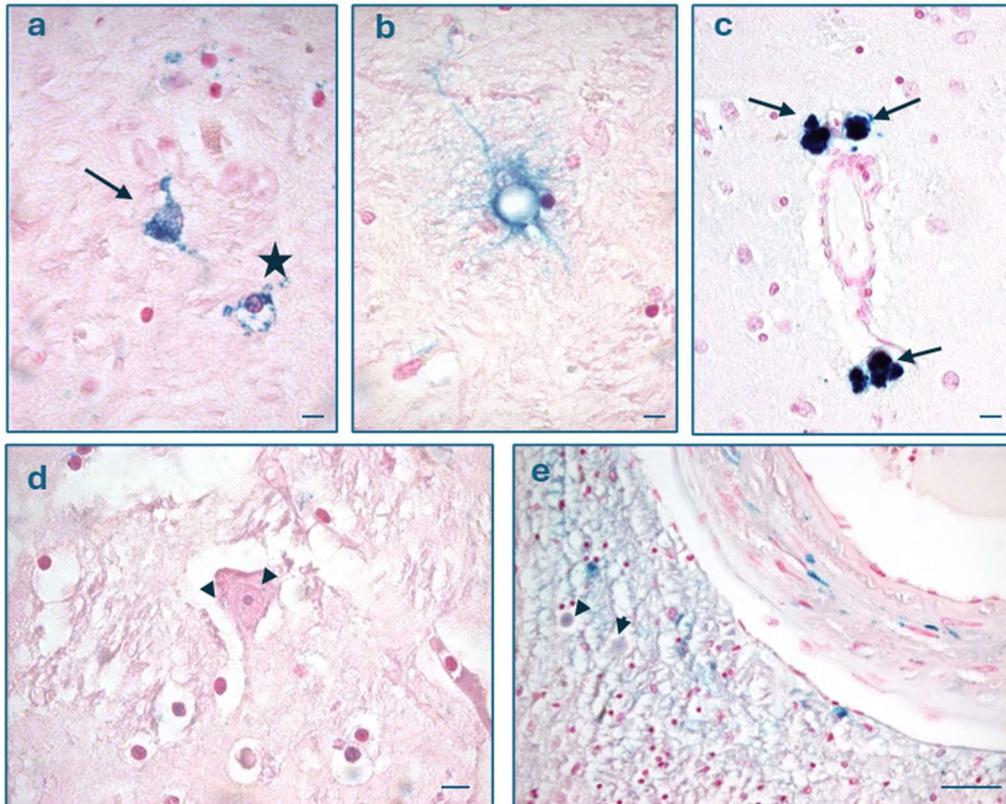
Al realizar la técnica de Perls sobre las secciones, aparece un precipitado en un color azul oscuro, denominado azul de Prusia, allí donde están los iones férricos (Kiernan 2008). Los resultados de nuestro análisis han demostrado, en primer lugar, una tinción escasa para el hierro aunque con importantes diferencias entre las zonas estudiadas. De esta manera, no se ha observado prácticamente tinción azul en la zona del hipocampo, pero si en los ganglios basales tanto en controles como en los pacientes con EA. En la Figura 1 se pueden observar algunos detalles de las zonas estudiadas. Debido a la presencia de marcaje, al menos en los ganglios basales, podemos concluir que la técnica ha funcionado. Sin embargo, no ha resultado ser lo suficientemente sensible para poner de relieve la escasa cantidad de hierro de las muestras de hipocampo y CENT y, por tanto, no fue posible la cuantificación histoquímica en estas zonas. Cabe destacar el intento de cuantificación en el PUT, algo que fue imposible en la CA1 del hipocampo por la ausencia de marcaje (Figura S2).



**Figura 1.**-Tinción de Perls en varias zonas del cerebro humano: Zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1), corteza entorrinal (CENT), globo pálido (GP) y putamen (PUT). Contraste nuclear con fucsina ácida. **(a)** CA1 de hipocampo de varón de 77 años con EA Braak IV. Aumentos 4x. Barra 100  $\mu\text{m}$ . **(b)** Detalle de la imagen anterior, a un aumento de 20x. Nótese que no existen depósitos visibles de hierro férrico. Aumentos 20x. Barra 30  $\mu\text{m}$ . **(c)** CENT de un varón de 77 años con EA. Aumentos 4x. Barra 100  $\mu\text{m}$ . **(d)** Detalle de la corteza y sus neuronas a 20x. Barra 30  $\mu\text{m}$ . **(e)** GP de los ganglios basales de una mujer de 77 años con EA Braak V-VI tomado a un aumento de 4x. Barra 100  $\mu\text{m}$ . Nótese los depósitos de hierro en azul de Prusia (cabezas de flecha) **(f)** Depósitos del mismo caso vistos en detalle a 40x. Barra 20  $\mu\text{m}$ . **(g)** GP de una mujer de 77 años con EA Braak V-VI. Depósitos de hierro señalados con cabeza de flecha. Foto realizada a 4x. Barra representa 100  $\mu\text{m}$ . **(h)** Detalle de la anterior con los precipitados en azul de Prusia señalados con cabeza de flecha, imágenes tomadas a 40x. Barra 20  $\mu\text{m}$ .

La histoquímica del hierro, en concreto la técnica de Perls, ha sido el método de elección clásico para la investigación patológica de la alteración de la homeostasis de este ion. Esta técnica es fácil y económica, aunque el límite de detección del hierro no hemo es demasiado alto (Meguro et al. 2003). Para incrementar la detección, otros autores han implementado métodos de intensificación del marcaje usando DAB. Otra alternativa es la perfusión sanguínea de los reactivos de la tinción, seguidos de DAB, pero como es lógico esto solo es útil para estudios en experimentación con animales, no en humanos (Meguro et al. 2003). En nuestro caso, hemos intentado realizar una intensificación con DAB según el protocolo de Meguro y colaboradores (2003), pero con poco éxito. La DAB tiene tendencia a precipitar y proporcionar cierto fondo en muestras humanas, sobre todo cuando la acción de la peroxidasa endógena no está bien inhibida, lo cual hace difícil cuantificar las señales obtenidas.

No obstante, mediante este método hemos podido observar depósitos tanto intracelulares como extracelulares de hierro en los ganglios basales, situándose estos últimos, preferentemente alrededor de los vasos sanguíneos como grandes cuerpos de hemosiderina (Figura 2 c,e). Desde el punto de vista celular, las células que con mayor frecuencia presentaron marcaje para el hierro fueron las células de glía, y solo de forma muy excepcional algunas neuronas de gran tamaño (Figura 2 d). Dentro de las células de glía, las más frecuentemente teñidas fueron las células de microglia y oligodendroglia, seguidas de los astrocitos reactivos (Figura 2 a,b). Estas observaciones concuerdan con los estudios de Meguro y colaboradores en cerebro de rata, donde los oligodendrocitos fueron las células más prominentes por la intensidad y el número de la tinción y, por el contrario, la mayoría de las neuronas solo estaban teñidas pálidamente. Es más, estos autores también aseguran que los oligodendrocitos incrementan su número en el envejecimiento normal y han llegado a demostrar, por microscopia electrónica, que los procesos citoplasmáticos que rodean los haces de fibras nerviosas mielinizadas contienen zonas positivas para hierro en las superficies interna y externa (es decir, collares internos y externos) de la vaina de mielina, semejante a lo que hemos observado nosotros en las imágenes de microscopia fotónica de campo claro (Figura 2a) (Meguro et al. 2007).



**Figura 2.-** Tinción de Perls, detalles celulares. Contraste nuclear con fucsina ácida. (a) Oligodendrocito (estrella) y astrocito (flecha) en el globo pálido de una mujer de 77 años con EA Braak V-VI. Aumentos 100x. Barra 10  $\mu$ m. (b) Astrocito reactivo en globo pálido de mujer de 77 años con EA Braak V-VI. Aumentos 100x. Barra 10  $\mu$ m. (c) Vaso sanguíneo en putamen de varón de 77 años con EA Braak IV. Obsérvense los depósitos de hemosiderina en azul Prusia en el espacio perivascular (flechas). Aumentos 100x. Barra 10  $\mu$ m. (d) Neurona en globo pálido de varón control de 19 años. Aumentos 100x. Pequeños granos en azul de Prusia en el citoplasma (cabeza de flecha). Barra 20  $\mu$ m. (e) Detalle de vaso arterial grande en putamen, mujer de 91 años con EA Braak V-VI. Obsérvense los cuerpos amiláceos ligeramente positivos (cabeza de flecha). Aumentos 40x. Barra 100  $\mu$ m.

En base a todo lo expuesto, nuestro estudio está de acuerdo con aquellos trabajos realizados en humanos y en roedores que demuestran, utilizando RMN, espectroscopia atómica o técnicas histoquímicas, que el córtex cerebral y subcortical junto con el hipocampo, son las zonas cerebrales que menos hierro presentan, mientras que sustancia negra, el GP y el puente muestran cantidades mayores (Gong et al. 2019; McAllum et al. 2020; Meguro et al. 2007). Además, también hemos demostrado que ciertas áreas de los ganglios basales como el GP y el PUT acumulan hierro en mayor medida en la vejez, cuando lo comparamos con otras regiones del cerebro, tal y como han reportado también otros autores (McAllum et al. 2020). Con el avance de la EA, hemos visto también un aumento del marcaje, pero ha sido difícilmente cuantificable por la falta de sensibilidad de esta técnica (Figura S2).

#### **4.2.- La cantidad de hierro, medida con técnicas analíticas, se incrementa en la CA1 de cerebros con Enfermedad de Alzheimer, pero su distribución es diferente entre capas**

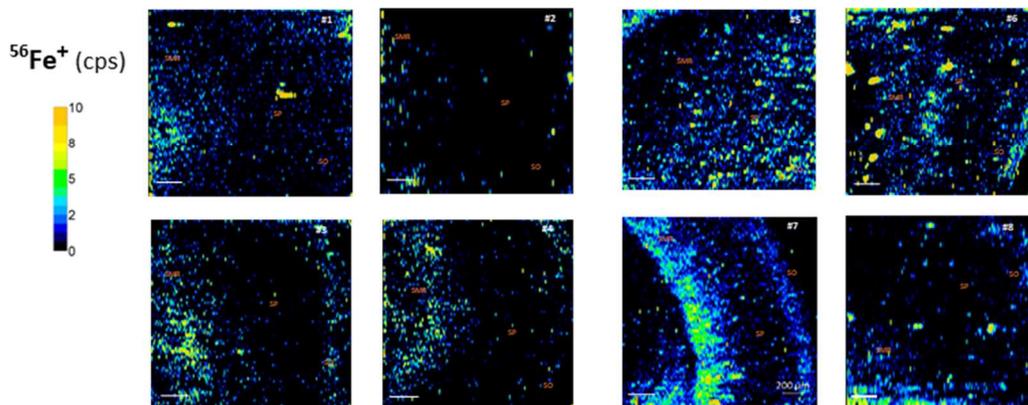
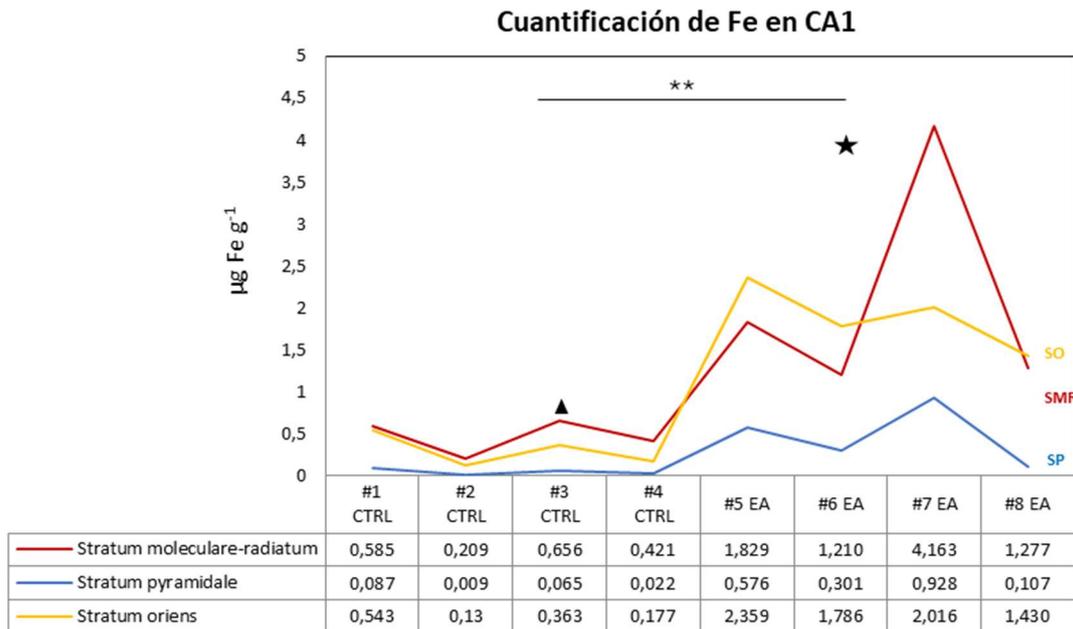
Como hemos visto en el punto anterior, las técnicas histoquímicas clásicas, aunque permiten obtener imágenes estructurales, sólo sirven para iones metálicos libres y no permiten una cuantificación fina. En nuestro caso, y dada la poca sensibilidad de la técnica de Perls, decidimos buscar otras formas de cuantificar el hierro de las muestras, en un intento de estudiar los posibles cambios y relacionarlos con las proteínas del metabolismo del hierro en la EA.

Entre las nuevas aproximaciones técnicas existentes, la LA-ICP-MS destaca por su alta sensibilidad y resolución celular (Cruz-Alonso et al. 2018, 2019). LA-ICP-MS utiliza un rayo láser enfocado para atomizar parte de una muestra. A continuación, el aerosol generado se envía a través de un ICP, que permite la atomización e ionización de la muestra. Posteriormente, los iones se separan según su relación masa-carga en el analizador de masas para ser, finalmente, detectados. De esta forma se puede conseguir información isotópica, así como un análisis elemental. Dado que el láser al moverse sobre la muestra elimina y mide sólo una pequeña zona a la vez, esta técnica genera una imagen espacial del área escaneada con una resolución en el rango de las micras (el diámetro del *spot* del láser puede estar entre 10-25µm). Ante la necesidad de obtener información detallada sobre cómo se comporta el hierro *in situ* en muestras de tejidos humanos, decidimos poner a punto esta técnica no tan convencional que nos permite la visualización del contenido de este ion en las áreas de interés, además de su cuantificación.

La LA-ICP-MS aquí implementada nos permitió visualizar imágenes bidimensionales (*bioimaging*) de hierro ( $^{56}\text{Fe}^+$ ) en la región CA1 del hipocampo humano. Esta técnica proporciona suficiente sensibilidad para estudiar el patrón de distribución del ion, así como obtener información sobre su contenido promedio en el área ablacionada, en secciones de tejido cerebral tanto de casos con EA como de controles. Además, esta metodología también nos permitió calcular la concentración media de hierro en áreas concretas de la región bidimensional obtenida, como las diferentes capas que forman la región CA1 del hipocampo (recordamos: SMR, SP y SO; Ilustración 17).

Nuestros datos indican una mayor acumulación de hierro en la sustancia gris del cerebro de los pacientes con EA, en comparación con los controles, lo que puede ser indicativo de una pérdida de la homeostasis de este ion en esta región vulnerable del cerebro. Así, en la Figura 3 se pueden observar imágenes de la distribución de hierro en la región CA1 del hipocampo humano (EA y controles), y la cuantificación absoluta de la concentración de este ion (expresada en  $\mu\text{g Fe}\cdot\text{g}^{-1}$ )

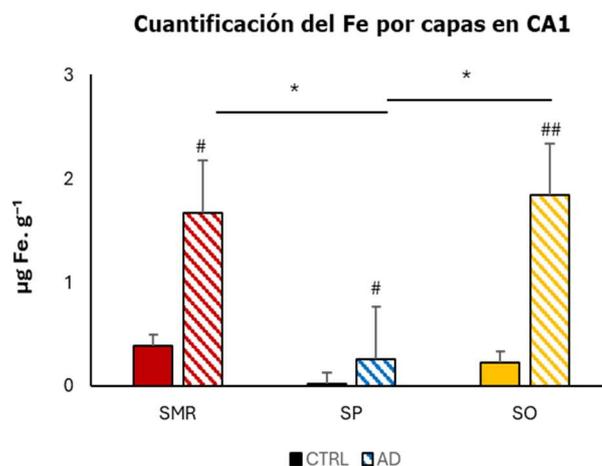
obtenida por LA-ICP-MS en esta zona cerebral. Los resultados demostraron que el hipocampo exhibe una concentración bastante baja de hierro, en el rango de 0,3-1,2  $\mu\text{g Fe}\cdot\text{g}^{-1}$  para controles y que se incrementa 2,8-7,1  $\mu\text{g Fe}\cdot\text{g}^{-1}$  para pacientes con EA. De manera interesante, se detectó un aumento estadísticamente significativo ( $p < 0,001$ ) en los niveles de hierro en los pacientes con EA ( $4,5 \pm 1,9 \mu\text{g g}^{-1}$ ) respecto a los controles ( $0,8 \pm 0,4 \mu\text{g g}^{-1}$ ) (Figura 4).



**Figura 3.-** El gráfico de líneas corresponde a la concentración promedio de hierro (Fe) obtenida en tres regiones del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1): rojo: estrato molecular-radial (SMR), azul: estrato piramidal (SP) y amarillo: estrato oriens (SO), de controles (CTRL) (donantes #1, #2, #3 y #4) y pacientes con EA (donantes #5, #6, #7 y #8) en tejidos cerebrales humanos medida con LA-ICP-MS (expresado como  $\mu\text{g Fe}$  por g de tejido). El triángulo y la estrella representan los valores medios de los controles y de EA, respectivamente. En ambos casos el análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. \*= diferencias estadísticamente significativas versus control \*\* $p < 0,001$ . Debajo se muestran las imágenes cuantitativas del  $^{56}\text{Fe}^+$  obtenidas tras la ablación del tejido. Cps: cuentas por segundo. Barra 100  $\mu\text{m}$ .

Un análisis detallado de las imágenes mostró que el hierro aparecía heterogéneamente distribuido en las capas de la región CA1 del hipocampo tanto en muestras control como de pacientes con EA (Figura 3). De hecho, se observaron niveles más altos de este ion en zonas de fibras y áreas de interneuronas que en la capa de las neuronas piramidales, lo cual es una observación novedosa e importante (Figura 3).

A continuación, se cuantificó la señal de hierro en las tres áreas de CA1, es decir, SMR, SP y SO. Las concentraciones más altas de este ion aparecían generalmente en las regiones SMR y SO de los cerebros con EA, en comparación con sus controles, siendo estas diferencias significativas (Figura 4).



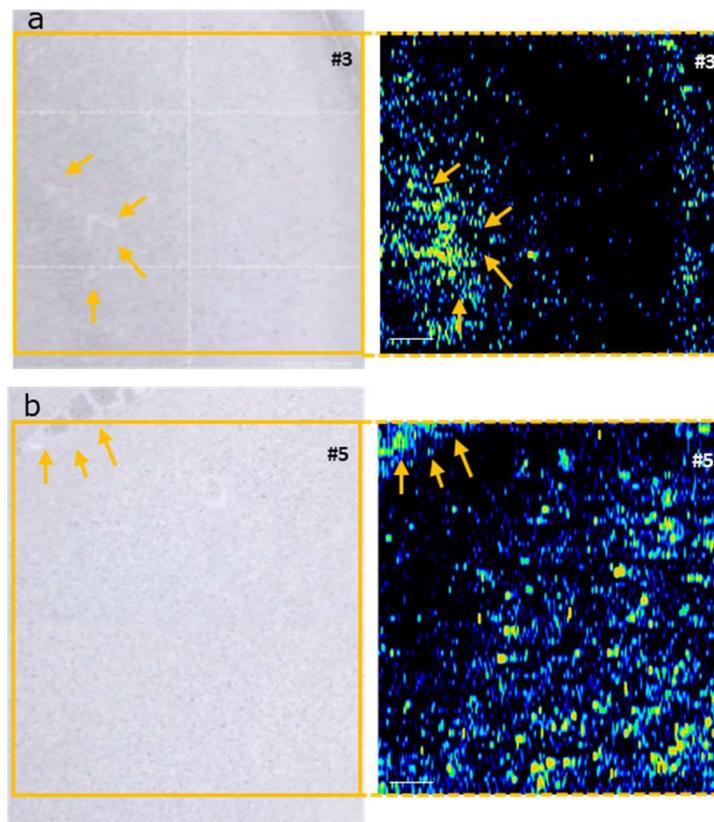
**Figura 4.** - Cuantificación del hierro (Fe) en cada capa del Cornu Ammonis1 del hipocampo obtenida con LA-ICP-MS. En colores sólidos los controles (CTRL) y en rallados los EA. Rojo: estrato molecular-radial (SMR), azul: estrato piramidal (SP) y amarillo: estrato oriens (SO). En ambos casos el análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. \*= diferencias estadísticamente significativas versus control \*  $p < 0,05$ .

También se pudo observar que el contenido de hierro era mayor en la sustancia blanca subyacente a las capas de materia gris. Sin embargo, la cuantificación de la cantidad de este ion en la sustancia blanca no fue posible ya que estaba fuera del área normalmente ablacionada de la muestra, sobre todo en las muestras de individuos control que presentan siempre una mayor superficie al no sufrir de atrofia cortical como la mayoría de los pacientes de EA.

Una observación destacable de estos análisis fue que el hierro se acumulaba en mayor cantidad en el espacio perivascular de los vasos sanguíneos subcorticales, lo que es indicativo de un drenaje del mismo a este nivel (Figura 5).

Actualmente, las técnicas analíticas, como LA-ICP-MS, que permiten la obtención de una imagen de heteroátomos con una resolución lateral en el rango de unas pocas micras, son de gran interés en los

estudios biomédicos. Su importancia radica en la posibilidad de una comprensión más profunda del papel de los metales en los sistemas biológicos, sin embargo, todavía son poco asequibles, bastante caras y muy lentas. Es justo por este motivo que no hemos podido realizar el mismo estudio en los ganglios basales del tálamo.



**Figura 5.** - A la derecha imágenes del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1) tomada con la cámara antes de la ablación. El cuadrado amarillo muestra el área ablacionada. A la izquierda las bioimágenes correspondientes del hierro (Fe). (a) CA1 de un hombre CTRL de 82 años (donante #3). (b) CA1 de una mujer con EA Braak I-II de 87 años (donante #5). Barra 100  $\mu$ m. Las flechas señalan la acumulación de hierro en el área perivascular de los vasos subcorticales.

Históricamente, se han utilizado muchas técnicas para evaluar la cantidad de hierro presente en el cerebro normal pero también en el patológico, como es el caso de la EA. Los estudios cuantitativos *post-mortem* con tinción histológica (tinción de Perl y Turnbull), como hemos visto, son imprecisos, pero ofrecen la posibilidad de realizar estudio citoarquitectónico y la posibilidad de evaluar cualitativamente las secciones teñidas con una resolución celular bastante alta. Por el contrario, la mayoría de las técnicas físicas cuantifican las diferentes formas de hierro sin distinción entre férrico, ferroso o hemo. A pesar de las limitaciones, el enfoque *post-mortem* aquí realizado ofrece valiosos conocimientos cuantitativos sobre el tejido nervioso, proporcionando mapas de distribución (*bioimaging*) y permitiendo, al tiempo, un análisis comparativo con otros métodos de análisis (Tabla

III); se pierde precisión iónica, pero se gana en precisión cuantitativa y citoarquitectónica. La LA-ICP-MS es altamente específica y sensible al hierro, con límites de detección muy por debajo de las concentraciones biológicas típicas que se encuentran en el tejido neurológico (Hare et al., 2016), lo que nos ha permitido la cuantificación de este ion incluso en áreas (hipocampo) donde sus niveles son muy bajos, al menos en condiciones control. Con respecto a la utilización de tejidos incluidos y desparafinados, es cierto que los efectos de la inclusión en parafina y la rehidratación, sobre los niveles de hierro en el cerebro, han sido cuestionados pero, hasta donde sabemos, este hecho no ha sido descrito por otros autores (Bulk et al., 2020; Cruz-Alonso et al., 2018; Hare et al., 2016). No obstante, para asegurar la reproductibilidad y optimizar la técnica, los cerebros han sido fijados, incluidos y desparafinados según protocolos estrictos de productos y tiempos.

Tabla III.- Comparación entre las técnicas utilizadas.

Análisis	Tinción Perls	LA-ICP-MS
<b>Especificidad</b>	Hierro no-hemo ( $Fe^{3+}$ libre)	Información multielemento e isotópica de hierro.
<b>Sensibilidad de detección</b>	Baja-muy baja. No se cuantifica fácilmente.	Alta ( $0,01 \mu g. g^{-1}$ ). Cuantificación más fácil.
<b>Muestra</b>	No se pierde. Se puede reutilizar con otras técnicas.	Se pierde por completo.
<b>Resolución espacial (<math>\mu m</math>)</b>	Imagen histológica y celular ( $0,2 \mu m$ )	Imagen histológica ( $10-200 \mu m$ )
<b>Técnica</b>	Reproducibile, simple y rápida	Reproducibile, sencilla y lenta
<b>Costo</b>	Barato, en el laboratorio	Caro, en servicios comunes

Anteriores análisis de LA-ICP-MS *post-mortem* de cerebros con EA han revelado que el hierro se acumula explícitamente en la sustancia gris de la corteza frontal y el hipocampo, las áreas más afectadas por las proteinopatía (Graham et al., 2014; Hare et al., 2016). Nosotros no compartimos esta observación ya que como hemos visto existen diferencias de la acumulación dentro de las capas que conforman la sustancia gris del hipocampo y además es mucho mayor en la sustancia blanca subyacente. Por ejemplo, la cantidad de hierro que hemos obtenido en la capa de neuronas piramidales de CA1 es pequeña cuando la comparamos con el resto de las capas, aunque su cantidad aumenta significativamente con la EA.

La presencia de hierro en los centros nerviosos superiores e inferiores es un hecho constatado durante años mediante el uso de infinidad de técnicas físicas y químicas (van Oostveen et al. 2021). En estos estudios se ha encontrado que los niveles más altos de hierro corresponden al PUT y al GP, mientras que los niveles más bajos se encuentran en el puente y la médula (Wang et al., 2019). Además, se ha observado que, sin lugar a duda, la cantidad de hierro aumenta durante el envejecimiento y algunas ENs. Así, el hierro se va acumulando en varias regiones del cerebro con la edad incluida la corteza, el hipocampo, la amígdala, el GP, el núcleo caudado y el PUT, pero el incremento verdaderamente importante ocurre en algunas patologías como la EP o la EA (Ramos et al., 2014; Wang et al., 2014; Wang et al., 2019). En esta última se ha visto que el aumento de este ion afecta a ciertas áreas de la corteza, en especial el hipocampo, tal y como nosotros hemos demostrado (Lu et al. 2017).

La mayoría de los estudios realizados hasta el momento se han centrado en la cuantificación del hierro en la sustancia gris cerebral, tanto *vivo* como en imágenes *post-mortem*, especialmente de la corteza temporal y frontal. Sin embargo, parece que la cantidad del ion depositado es mayor en la sustancia blanca que en la materia gris, en sujetos control y con EA, al menos en la neocorteza (Van Duijn et al. 2017; Hare et al. 2013; McAllum et al. 2020; Meguro et al. 2008). En este sentido, y aunque no ha sido cuantificado, nosotros hemos encontrado que el límite de sustancia gris-blanca cercana al estrato SMR coincidía con los niveles más elevados de hierro en el hipocampo de la EA.

En este contexto, existen evidencias que demuestran una asociación entre la acumulación de hierro en el cerebro y los déficits cognitivos en la EA. Ayton y colaboradores consideran, además, que es poco probable que el hierro aumente durante las primeras etapas de la enfermedad; los investigadores describieron que los mayores niveles del ion aparecían, exclusivamente, en personas dementes con patología de EA muy avanzada, mientras que los sujetos no dementes con un nivel similar de lesiones patológicas, no los mostraban (Ayton et al. 2020) .

La asociación significativa entre el depósito de hierro y la EA no parece discutible, pero el papel exacto de este ion en la patología sigue siendo desconocido. Es poco probable que la causa de la elevación del hierro en el cerebro durante la EA sea la misma que las que están implicadas en la sobrecarga sistémica del mismo, incluida la dieta o los trastornos periféricos del metabolismo del hierro (Jakaria et al. 2021). Tampoco está claro si el aumento del ion a nivel cerebral se produce a nivel intracelular, extracelular o a ambos, o si se debe a un acumulo por almacenamiento excesivo o a un fallo en los

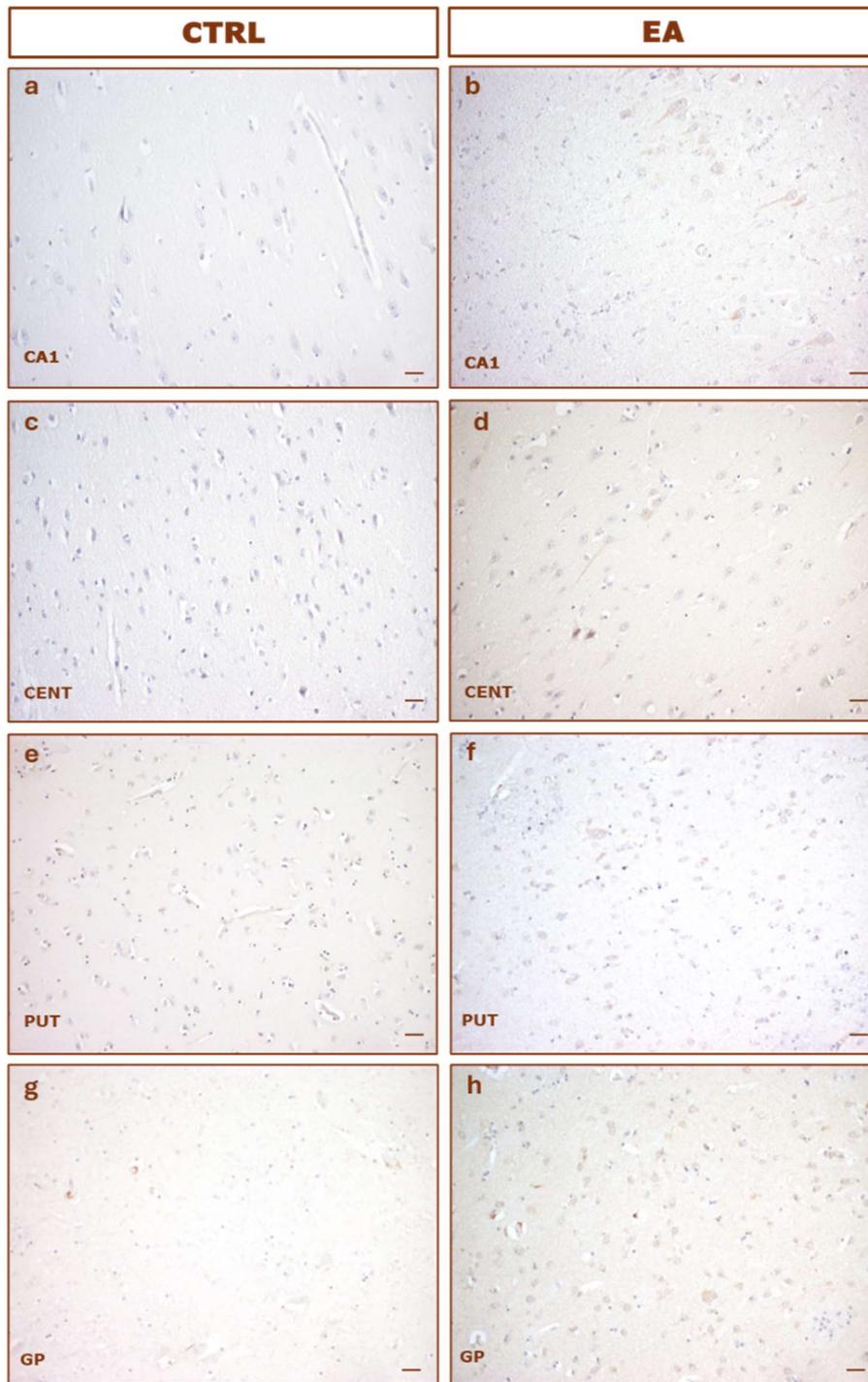
procesos de eliminación. El estudio de la expresión de las proteínas que mantienen el equilibrio del hierro a nivel cerebral podría arrojar luz sobre este hecho.

La presencia de TfR1 y DMT1 en las membranas de neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y microglía sugiere que todas estas células cerebrales tienen la capacidad de captar hierro, aunque también pueden tener otros mecanismos no específicos de absorción del mismo (Qian and Ke 2019). Además, la evidencia acumulada demuestra que la salida de hierro de las estas células se produce a través de una vía que involucra a la FPN. Se ha demostrado que la desregulación de la homeostasis de este ion en las ENs estaría relacionado con la ausencia o reducción de la expresión de sus exportadores, lo que podría redundar en un aumento de la cantidad de hierro acumulada en las células en la EA (Qian and Ke 2019; Zhao et al. 2015).

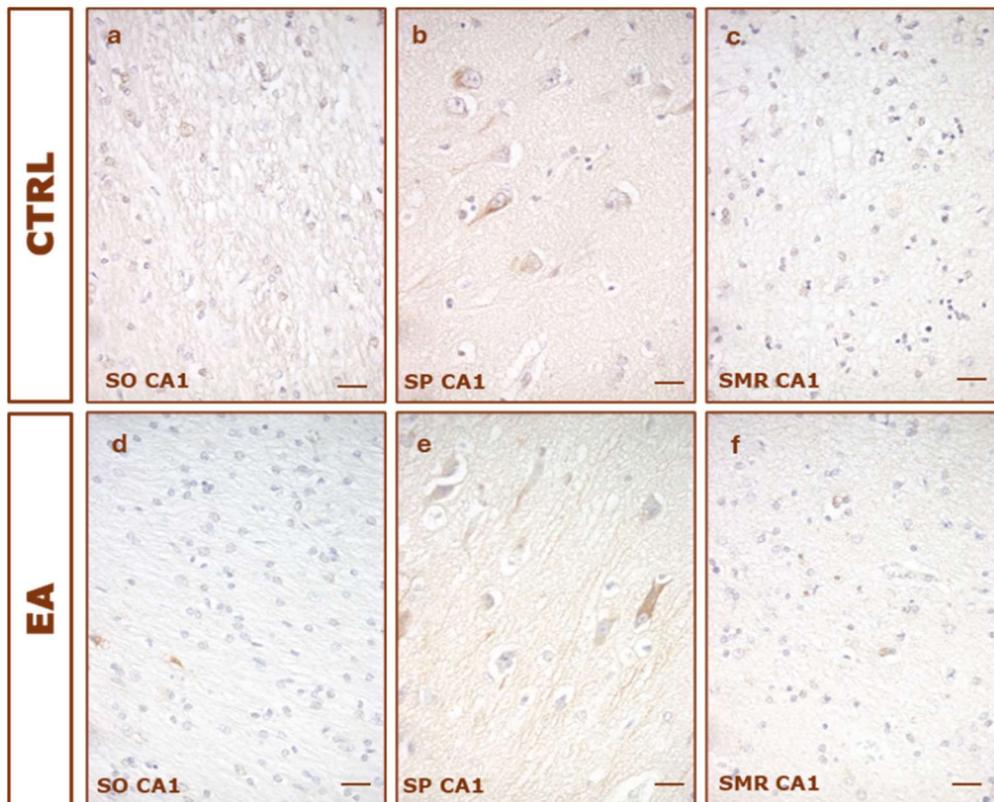
#### **4.3.- La expresión de la FPN aumenta en la corteza temporal y los ganglios basales con la edad y en la enfermedad de Alzheimer**

Tras demostrar un aumento en la concentración de hierro en los cerebros de pacientes con EA, el siguiente objetivo de nuestro estudio fue explorar el posible papel de algunas proteínas implicadas en el transporte y en el metabolismo de este ion en el cerebro. Está ampliamente aceptado que el incremento del hierro en la EA, y en el envejecimiento normal, podría estar causado por una desregulación del transporte de este ion mediada por el sistema FPN-HPC. Por este motivo, se investigó la expresión de ambas proteínas en secciones de hipocampo, CENT y ganglios basales, tanto de individuos sanos como pacientes con EA.

En primer lugar, se realizó una IHQ para FPN revelada con DAB en el hipocampo, la CENT, el PUT y el GP. El marcaje de esta proteína resultó más suave de lo esperado, lo que en cierta manera dificultó el estudio de la variación de la señal de FPN entre los controles y los pacientes con EA, y entre los diferentes estadios de Braak. En las imágenes de la Figura 6 podemos ver como la FPN se localiza en todas las áreas cerebrales analizadas, existiendo un mayor marcaje en los casos de EA, tanto en la zona de la corteza como en los ganglios basales. Además, la inmunotinción no fue igual en las diferentes capas del hipocampo y la CENT. Respecto a la CA1 del hipocampo observamos un marcaje más suave en el SO y el SMR que en la zona donde se sitúan las neuronas piramidales, la SP (Figuras 6 y 7).

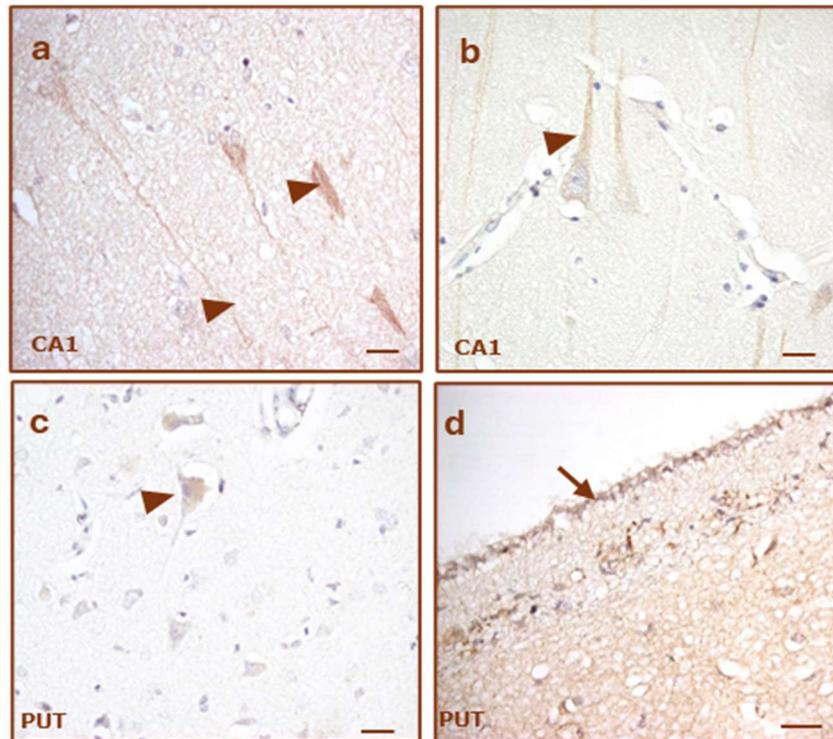


**Figura 6.-** Inmunohistoquímica para ferroportina (FPN) revelada con DAB (marrón). Contraste nuclear en azul con tiónina. Zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1), corteza entorrinal (CENT), globo pálido (GP) y putamen (PUT). (a) CA1 de un hombre CTRL de 82 años de hipocampo tomado a un aumento de 20x. (b) CA1 de hipocampo de una mujer de 91 años con EA en estadio de Braak VI. Aumento 20x. (c) CENT de una mujer CTRL de 57 años. Aumento de 20x. (d) CENT de un hombre de 61 años con EA a 20x. (e) PUT de un hombre CTRL de 41 años. Aumento 20x. (f) PUT de una mujer de 76 años con EA del estadio Braak V-VI. Aumento 20x. (g) GP de un hombre CTRL de 19 años. Aumentos 10x. (h) GP de una mujer de 76 años con EA con Braak VI. Aumentos 20x. Barra de calibración: 30  $\mu$ m.



**Figura 7.-** Inmunohistoquímica de FPN revelada con DAB. Contraste nuclear en azul con tionina. Zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1) en sus diferentes estratos: SO, estrato oriens; SP, estrato piramidal; SMR, estrato molecular-radial. (a) SO de la CA1 de un hombre CTRL de 19 años tomado a un aumento de 40x. (b) SP de la CA1 de un hombre CTRL de 19 años tomado a un aumento de 40x. (c) SMR de la CA1 de un hombre CTRL de 19 años tomado a un aumento de 40x. (d) SO de CA1 de una mujer de 84 con EA en estadio de Braak II a 20x. (e) SP de CA1 de una mujer de 84 con EA en estadio de Braak II. Foto realizada a 20x. (f) SMR de CA1 de una mujer de 84 con EA en estadio de Braak II a 40x. Barra de calibración: 30  $\mu$ m.

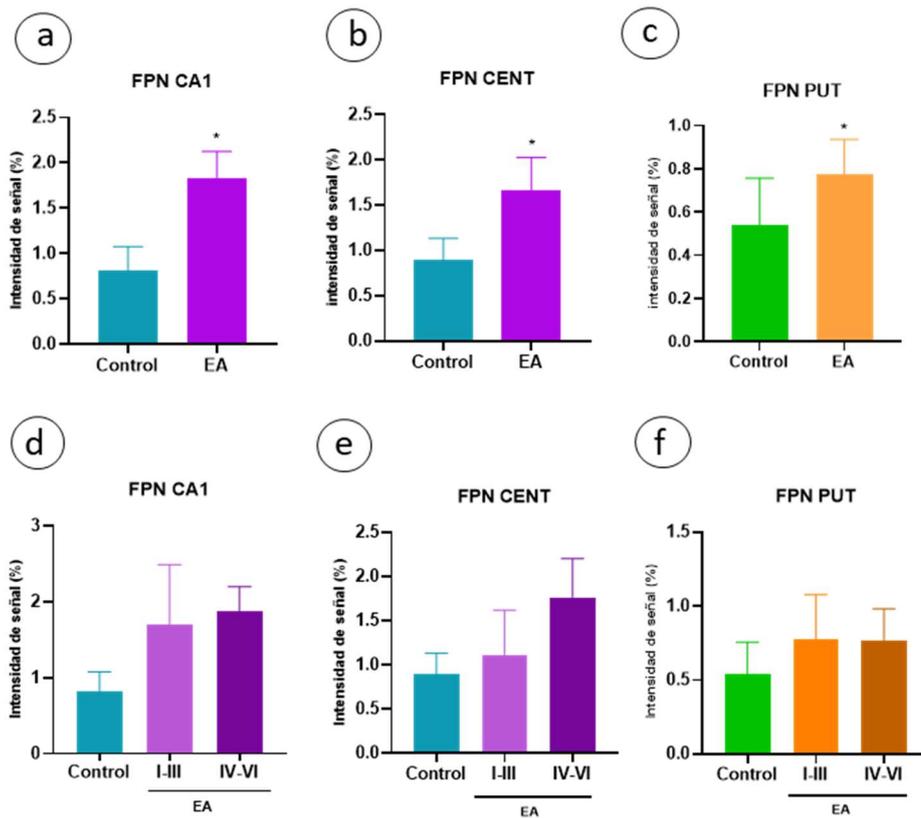
A nivel celular, la FPN se encuentra principalmente en neuronas apareciendo, aunque de forma escasa, en el citoplasma y también en las expansiones de éstas (Figura 8 a,b,c). Podemos ver un marcaje claro en las células piramidales de la CA1 y la CENT (Figuras 6, 7 y 8), así como en las neuronas espinosas del PUT (Figuras 8c). También se aprecia marcaje en algunos oligodendrocitos, pero no en los astrocitos. Las células endoteliales tampoco fueron positivas para la FPN. Por último, también se ha encontrado marcaje en los endotelios del cuarto ventrículo y en los plexos coroideos cerca del hipocampo, lo que concuerda con la función de transporte de hierro de esta proteína (Figura 8d).



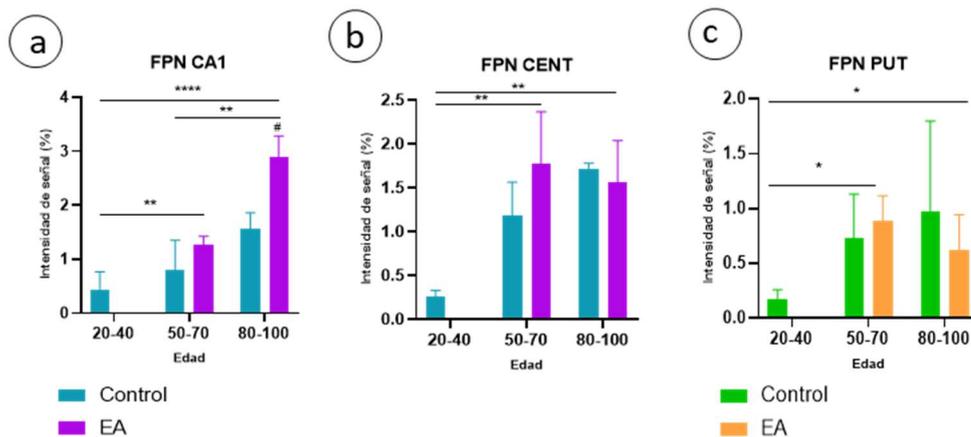
**Figura 8.-** Inmunohistoquímica de FPN revelada con DAB. Contraste nuclear en azul con tiónina. Detalle de marcaje celular. (a) CA1 de una mujer con EA en estadio IV de Braak tomado a un aumento de 40x. (b) CA1 de una mujer control de 71 años tomada a un aumento de 40x. (c) PUT de un hombre control de 19 años tomado a un aumento de 40x. (d) Cuarto ventrículo a nivel de los ganglios basales de una mujer de 71 con EA en estadio de Braak II a 40x. Flecha amarilla señala los endimocitos con marcaje positivo para FPN. Barra de calibración: 30  $\mu$ m.

La cuantificación densitométrica de la señal IHQ de la FPN demostró una diferencia significativa entre los sujetos control y aquellos que presentaban EA, tanto en la corteza como en los ganglios basales (Figura 9 a, b, c). Aunque para el GP no disponíamos de la cantidad suficiente de casos para el cálculo estadístico, los datos mostraron la misma tendencia que las demás áreas estudiadas (Figura S3). Sin embargo, cuando separamos a los individuos afectados por EA en dos grupos de diferente severidad (Braak leve y grave), no aparecían esas diferencias y (Figura 9 d, e, f). Los resultados pusieron de manifiesto que las cantidades relativas de FPN fueron ligeramente mayores en la corteza que en los ganglios basales.

Al separar los casos por grupos de edad (jóvenes, adultos y ancianos), se observó que la cantidad de FPN aumentaba de forma general con la edad, siendo mayor en los pacientes con EA que en los controles; esta tendencia era mucho más clara en el hipocampo que en la CENT y los ganglios basales (Figura 10 a, b, c).



**Figura 9.-** Representación gráfica de la intensidad de marcaje para FPN en las diferentes áreas cerebrales analizadas, zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1), corteza entorrinal (CENT), y putamen (PUT). Las gráficas **a**, **b** y **c** muestran el porcentaje de intensidad de marcaje de FPN medio  $\pm$  SEM de pacientes EA respecto a los controles. En las gráficas **d**, **e** y **f** se representa el porcentaje de intensidad de marcaje de FPN medio  $\pm$  SEM de pacientes EA separados en dos grupos, EA leve (Braak del I-III) y grave (Braak del IV-VI), respecto a los controles. En ambos casos el análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. \*= diferencias estadísticamente significativas versus control \*  $p < 0,05$ .



**Figura 10.-** Representación gráfica de la intensidad de marcaje para FPN en las diferentes áreas cerebrales analizadas, zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1), corteza entorrinal (CENT), y putamen (PUT). Las gráficas **a**, **b**, **c** muestran el porcentaje de intensidad de marcaje de FPN medio  $\pm$  SEM de pacientes EA respecto a los controles separados por grupos de edad, jóvenes (20-40), adultos (50-70) y ancianos (80-100). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de dos factores seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. \*= diferencias estadísticamente significativas entre grupos de edad \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . #= diferencias estadísticamente significativas EA versus control #  $p < 0,05$ .

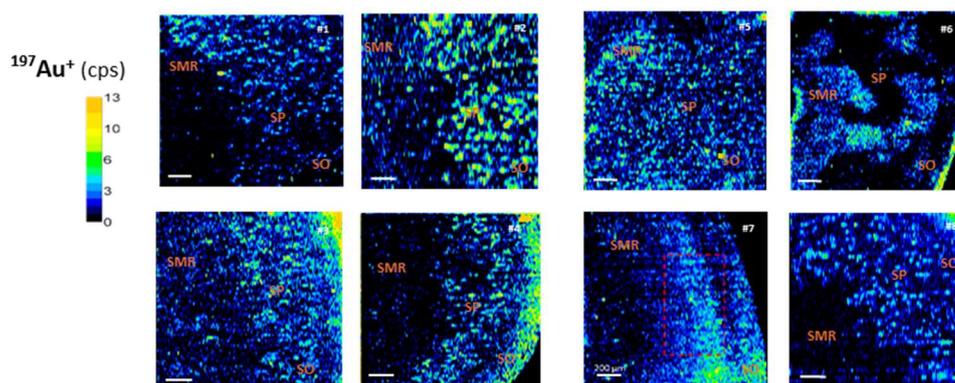
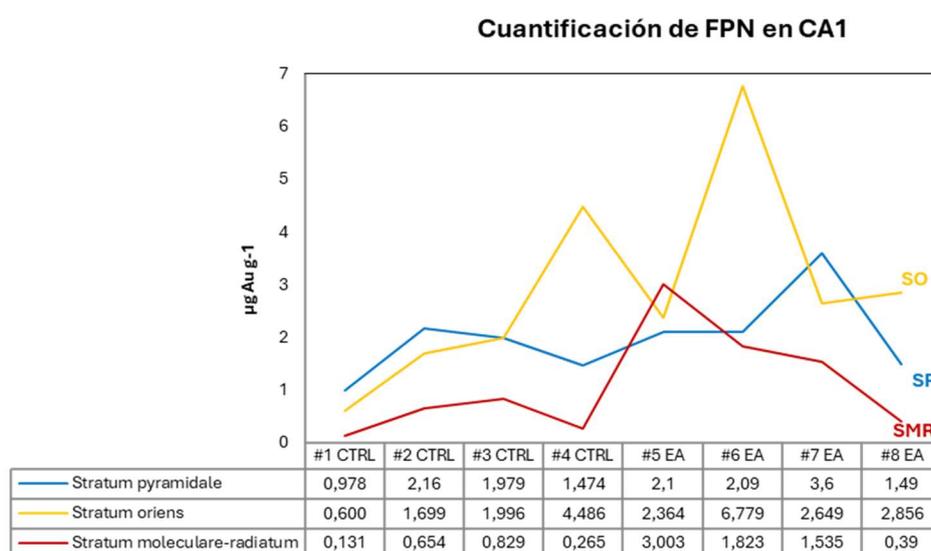
La FPN es una proteína transmembrana que se encuentra en la mayoría de las células del SN de mamíferos, y cuya función es la de transportar el hierro desde las células que lo almacenan hacia la sangre para optimizar la homeostasis sistémica del mismo. Sin embargo, no existe consenso respecto a su expresión durante el envejecimiento y la EA (Bao et al., 2021; Raha et al., 2013; Wu et al., 2004).

En los últimos años, se ha descrito una elevada cantidad y una amplia distribución de la FPN en el SN tanto en humanos como en roedores. Así, mediante IHQ e hibridación *in situ*, se ha observado que ésta se expresa ampliamente en todo el cerebro, en especial en la CENT y el hipocampo, al igual que mostramos en nuestro trabajo (Li et al. 2011; McAllum et al. 2020). La FPN en el cerebro de roedores se presenta en neuronas, oligodendrocitos, células endoteliales de vasos sanguíneos y células epiteliales del plexo coroideo, demostrando la gran importancia de este transportador del hierro tanto en adultos como en postnatales (Li et al., 2011; Moos & Nielsen, 2006; Wu et al., 2004; Wu et al., 2022). Nuestras observaciones han demostrado marcaje también para la FPN en los endotelios y plexos coroideos pero en especial en las neuronas piramidales y sus expansiones dendríticas, lo que coincide con los resultados de otros autores en roedores y humanos (Li et al. 2011; Raha et al. 2013). La localización de la FPN en las células endoteliales y del plexo coroideo sugiere que la FPN exporta hierro desde el parénquima cerebral hacia el LCR, regresando finalmente a la circulación sistémica (Wu et al., 2004). Aunque no es nuestro caso, otros autores han descrito la presencia de FPN en las células endoteliales del estriado, tálamo y cerebelo de ratón, donde es probable que sirva como transportador molecular del hierro en la membrana abluminal de las células endoteliales polarizadas (Wu et al., 2004).

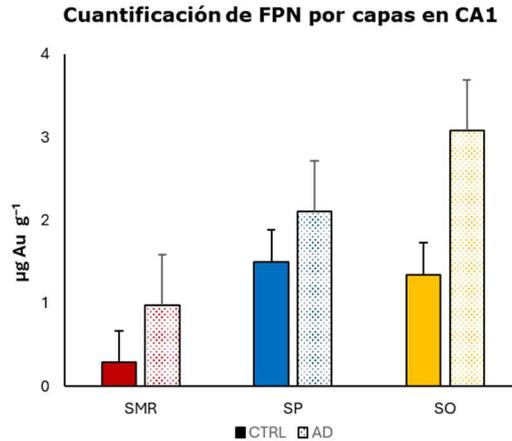
Por otro lado, los resultados de la IHQ, es decir, el aumento de los niveles de la FPN en la EA y durante el envejecimiento, concuerdan con los datos anteriormente publicados por nuestro grupo (Cruz-Alonso et al. 2019), y difieren de los que publicados por Lu y colaboradores sobre la existencia de una disminución significativa en la expresión de FPN en la corteza y el hipocampo de cerebros con EA (Lu et al. 2017).

A continuación, y para llevar a cabo una cuantificación más precisa de la FPN, utilizamos la técnica LA-ICP-MS. Ésta nos permitió, mediante el uso de un anticuerpo anti-FPN marcado con nanoclusters de oro (AuNC), obtener información sobre la situación y la cantidad promedio de esta proteína en las capas SMR, SP y SO de la región CA1 del hipocampo, tanto en controles como pacientes con EA. Por motivos técnicos, de tiempo y de presupuesto, se utilizaron ocho de los casos, 4 casos control y 4 con EA (véase la tabla II de material y métodos).

La concentración de FPN, expresada en  $\mu\text{g Au}\cdot\text{g}^{-1}$ , se calculó para el área CA1 separando los datos de cada capa, como se realizó con el hierro. Los valores generales obtenidos oscilaron entre 1,79 y 6,2  $\mu\text{g Au}\cdot\text{g}^{-1}$  en controles y 4,7-10,7  $\mu\text{g Au}\cdot\text{g}^{-1}$  en pacientes con EA. Al igual que para el hierro, parece haber una ligera tendencia a que la FPN aumente en la EA (controles  $4,3\pm 1,2$  y EA  $7,7\pm 1,6$ ) aunque con esta técnica y tan pocos casos la diferencia no llega a ser significativa (Figura 11). Además, tal y como se vio con la IHQ tradicional, la FPN no muestra una distribución uniforme en las diferentes capas de CA1 (ver Figuras 6 y 7). La mayor cantidad de FPN parece acumularse en SO y SP en comparación con SMR (Figura 12).

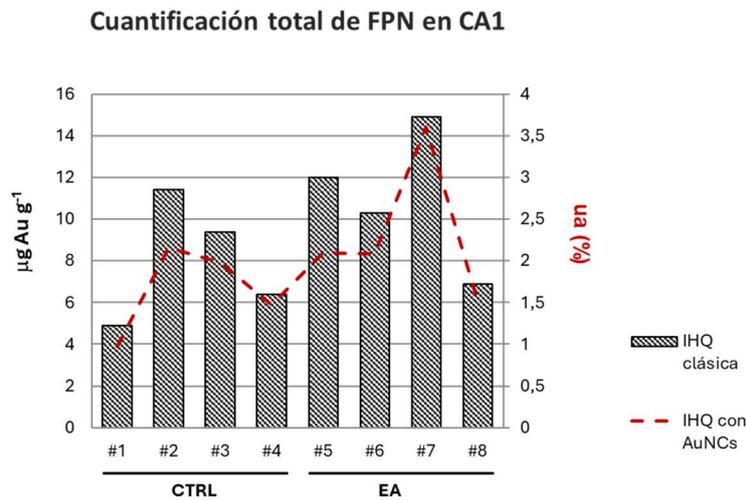


**Figura 11.-** El gráfico de líneas corresponde a la concentración promedio de ferroportina (FPN) medida a través de los nanoclusters de Au (AuNCs) obtenida en tres regiones del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1): rojo: estrato molecular-radial (SMR), azul: estrato piramidal (SP) y amarillo: estrato oriens (SO) de controles (CTRL) (donantes #1, #2, #3 y #4) y pacientes con EA (donantes #5, #6, #7 y #8) en tejidos cerebrales humanos mediante LA-ICP-MS (expresado como  $\mu\text{g Fe por g}$  de tejido). Debajo se muestran las imágenes cuantitativas del hierro obtenidas tras la ablación del tejido. Cps: cuentas por segundo. Barra 100  $\mu\text{m}$ .



**Figura 12.-** Cuantificación de la ferroportina (FPN) en cada capa del Cornu Ammonis1 del hipocampo obtenida con LA-ICP-MS. En colores sólidos los controles (CTRL) y en punteado las muestras de pacientes con EA. Rojo: estrato molecular-radial (SMR), azul: estrato piramidal (SP) y amarillo: estrato oriens (SO).

Por último, se llevó a cabo una comparación entre las concentraciones promedio de la FPN, obtenidas en CA1 de los mismos individuos y con ambas técnicas, IHQ y LA-ICP-MS. Los datos obtenidos, aunque en un caso absolutos (LA-ICP-MS) y en el otro relativos (densidad de marcaje con IHQ), presentan una gran similitud de comportamiento, lo que demuestra su utilidad para estudios de esta naturaleza (Figura 13).



**Figura 13.-** Concentración promedio de FPN obtenida en la región CA1 de controles (donantes #1, #2, #3 y #4) y pacientes con EA (donantes #5, #6, #7 y #8). El eje de la izquierda muestra los valores obtenidos mediante LA-ICP-MS (expresado como µg de Au por g de tejido). El eje de la derecha recoge la cuantificación densitométrica de FPN (expresada como unidades arbitrarias de marcaje) obtenida mediante un protocolo tradicional de inmunohistoquímica con DAB.

La localización de FPN ha sido descrita en neuronas, astrocitos, células endoteliales de vasos sanguíneos y células epiteliales del plexo coroideo, mientras que su ARNm ha sido detectado solo en vasos sanguíneos, lo que implicaría que el hierro se transporta del torrente sanguíneo al cerebro (Wu et al., 2004). Nuestras observaciones han demostrado marcaje para la FPN en las neuronas piramidales y sus expansiones dendríticas, lo que coincide con las observaciones de otros autores tanto en humanos como ratones (Raha et al. 2013). Según éstos, la disfunción o falta de expresión de la FPN en la EA y en el envejecimiento sería la causante del aumento de hierro intracelular en estas neuronas lo que causaría su degeneración y muerte, posiblemente por un mecanismo de ferroptosis (Raha-Chowdhury et al., 2015).

En este sentido, los datos provenientes de la cuantificación con LA-ICP-MS demostraron no ser concluyentes para CA1, aunque los valores de la FPN en las diferentes zona, fueron siempre mayores en la EA; la cuantificación del marcaje IHQ de la FPN de controles frente a pacientes de EA si resultó significativa. Es posible que las diferencias se deban a las características de las técnicas y al número de casos usados. No obstante, nuestros resultados contrastan con la bibliografía consultada ya que, al contrario de lo que hemos encontramos nosotros, predomina la idea de una disminución significativa en el contenido de la FPN con la edad y en la EA. Raha y colaboradores encontraron menores niveles de la proteína en lisados del hipocampo humano en comparación con otros de su misma edad (Raha et al. 2013). Los mismos autores determinaron, posteriormente, que existe una menor cantidad de FPN y de su ARNm en el hipocampo y en el estriado de los pacientes de EA respecto a controles (Raha et al. 2022). Por otra parte, una expresión de FPN regulada a la baja también se ha descrito en cerebros de ratones PPA<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> y en ratones PPA/PS1 modelos experimentales de EA (Shen et al. 2018; Xian-Hui et al. 2015). Bao y colaboradores revelaron, a su vez, que la eliminación genética de la FPN en las neuronas principales de la neocorteza y el hipocampo podría provocar atrofia del hipocampo y déficits de memoria similares a los de la EA (Bao et al. 2021). Además, la falta de expresión de la FPN en las neuronas de la neocorteza e hipocampo de los ratones NEXCre provocaba una atrofia similar a la descrita en la EA, sumada a un deterioro cognitivo (Wang et al. 2019). Hasta nuestro conocimiento, existe solo una publicación en la que no se aprecian cambios significativos en la expresión de la FPN en la corteza y el hipocampo durante el envejecimiento en el cerebro de ratón, lo cual llevó a postular que la FPN no estaría implicada en la creciente cantidad de hierro almacenada en el cerebro con la edad (Lu et al. 2017).

La disminución de la FPN podría justificarse de varias formas. En una primera hipótesis la regulación a la baja de la FPN en el envejecimiento, provocaría una deficiencia de la eliminación de hierro, el cual se acumularía en ciertas regiones del cerebro y produciría la enfermedad (Zou et al. 2024). En una segunda hipótesis lo que ocurriría es que durante el avance de la EA, la inflamación, el estrés oxidativo, el daño neuronal y la formación de placas influirían en una desregulación general de la exportación del hierro y, por ello, acabaría acumulándose en altas cantidades. La disminución de la FPN en la EA y en el envejecimiento sería la causante del aumento del hierro intracelular en las neuronas, lo que llevaría a su degeneración y muerte posiblemente por ferroptosis (Bao et al., 2021; Wang et al., 2022). En el trabajo realizado por Bao y colaboradores se reportó que la pérdida de la FPN se relacionaba con un deterioro cognitivo, aunque no estudió si existía relación con los estadios de Braak (Bao et al., 2021).

Como decíamos, en nuestro caso, la cuantificación de la FPN y el estudio comparativo entre controles y pacientes con EA demostró un aumento del transportador, no ligado al estadio de Braak, pero si a la edad del individuo. Estos resultados discrepan de los obtenidos hasta ahora. En este sentido, hay que señalar que existen pocos trabajos en humanos y, aunque las zonas analizadas son similares, la metodología utilizada no ha sido la misma. Aun teniendo en cuenta que es posible que necesitemos un mayor número de casos, las medidas de la FPN mediante IHQ y LA-ICP-MS en los mismos casos arrojaron los mismos resultados.

Resulta difícil darle una explicación al incremento de los niveles de la FPN en la EA y con la edad, ya que lo más lógico sería pensar que la causa del acumulo del hierro intracelular se debe a un fallo o a la regulación a la baja de este exportador en la membrana celular. Sin embargo, se ha demostrado que la regulación de la expresión de la FPN es complicada y que ésta está sujeta a un multicontrol transcripcional, postranscripcional y traduccional (Gammella et al. 2021).

De todas las vías conocidas de la regulación del hierro intracelular en el SN en condiciones no patológicas, destaca la “regulación postranscripcional mediada por IRP/IRE”. En condiciones de baja disponibilidad de hierro, las IRP se unen a los IRE bloqueando la traducción del ARNm de la FPN. Esto reduce la síntesis de la FPN y, por lo tanto, disminuye la salida de hierro desde las células. Cuando los niveles de hierro intracelular son altos, las IRP no se unen a los IRE, permitiendo la traducción del ARNm de la FPN y aumentando la síntesis de la FPN, facilitando la exportación de hierro (Gammella et al. 2021). Si esto es así en cultivos celulares y de forma sistémica, cabe pensar que también puede repetirse en las células nerviosas humanas. Por tanto, el exceso de hierro extracelular e intracelular

acumulado durante el envejecimiento y en la EA, lo que debería de traer consigo es una traducción de la FPN y un aumento de la proteína en la membrana de las células, justamente lo que nosotros hemos observado.

Existe también una “regulación de la expresión de la FPN por la HPC”, que es esencial para el control de la reserva sistémica de hierro. La HPC se une al dominio extracelular de la FPN en la superficie celular, lo que lleva a su internalización y degradación, previniendo eficazmente la exportación de hierro celular y limitando la cantidad de hierro que ingresa al suero o al líquido extracelular. El mecanismo basado en la interacción entre la FPN y la HPC que conduce, por ejemplo, a una hipofeemia en la inflamación, se considera el principal regulador de la liberación de hierro, como lo demuestra la hipofeemia presente en ratones *knock out* para la HPC (Gammella et al. 2021). La pregunta es ¿Cuán fuertes e importantes son las contribuciones de cada una de estas vías al control de la expresión de FPN en el sistema nervioso y especialmente en la EA?

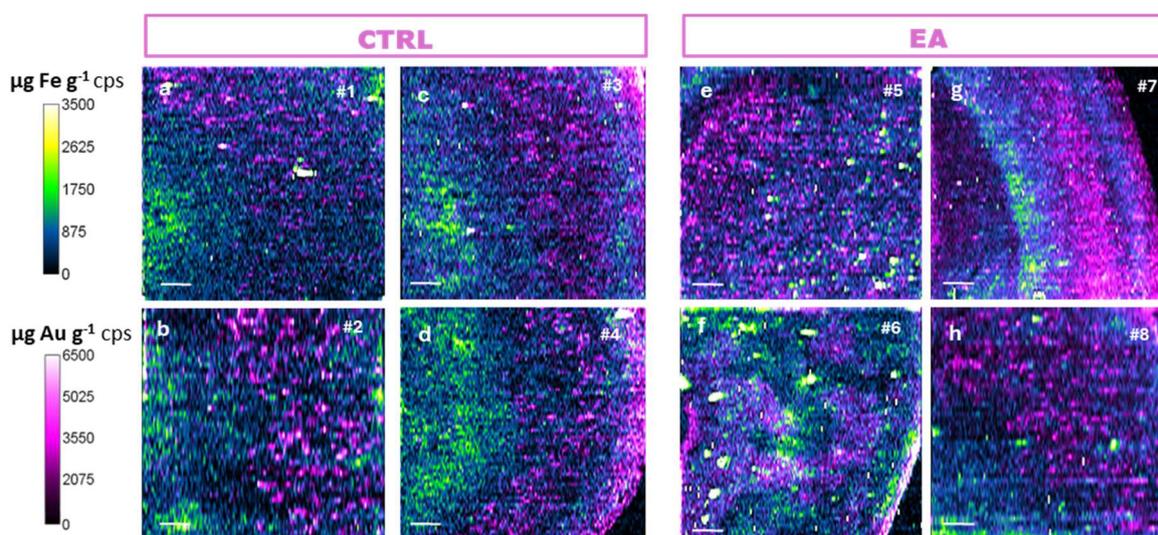
La evidencia acumulada sugiere que la expresión reducida de la FPN podría ser inducida por vías dependientes e independientes de HPC en estos trastornos. Además, la presencia de las dos vías indica que la unión de la HPC con la FPN no es la única forma de controlar o mantener el equilibrio de hierro en el cerebro, y que la expresión de la FPN no solo está relacionada con cambios en la HPC, sino que también está asociada con otros factores (Qian et al., 2023) .

Nosotros proponemos que, efectivamente, durante el envejecimiento y en la EA se produce un desbalance de la cantidad de hierro que se acumula en el sistema nervioso, tanto en el parénquima extracelular como de forma intracelular. A nivel extracelular, el hierro aumenta alrededor de las células, pero se concentra especialmente cerca de los vasos sanguíneos y en los paquetes de fibras mielínicas. A nivel intracelular, la mayor cantidad de hierro disponible en el citoplasma neuronal regularía al alza la expresión de la FPN mediante la vía de las proteínas reguladoras (IRP), lo que sería un tipo de reacción celular de defensa ante la entrada de hierro desde el LI, donde se estaría acumulado a la espera de salir del cerebro vía sanguínea, glinfática o hacia el LCR.

#### **4.4.- La mayor cantidad de hierro en la CA1 del hipocampo no se correlaciona con una mayor cantidad de FPN en la enfermedad de Alzheimer**

La técnica de LA-ICP-MS y el tratamiento de los datos, nos ha permitido correlacionar la localización del hierro y de la FPN en la región CA1 hipocampal mediante la superposición de las señales obtenidas de la misma muestra para  $^{56}\text{Fe}^+$  y  $^{197}\text{Au}^+$  (Figura 14). La distribución del hierro se corresponde con la

escala verde y amarilla, mientras que la de la FPN con la morada. En la observación de las muestras de superposición 2D, se hace evidente que existe una escasa relación entre las señales de hierro y de la FPN (Figura 14). Así, el análisis demostró que mientras que el hierro se localiza en las capas más bajas de la CA1 del hipocampo, la FPN se localiza en las más altas, coincidiendo con las capas neuronales. En la EA, las capas de CA1 se desdibujan y la organización de hierro y la FPN también (Figura 14 b, d, f, h).



**Figura 14.-** Imágenes de la distribución de  $^{56}\text{Fe}+$  y  $^{197}\text{Au}+$  (FPN) obtenidas mediante LA-ICP-MS de la región CA1 del hipocampo de tejidos cerebrales humanos control (CTRL) y con EA después de una inmunohistoquímica con un bioconjugado de AuNC para FPN. La distribución de ambos elementos se superpuso con fines comparativos. (a, c, e, g) control (casos #1, #2, #3, #4) y (b, d, f, h) EA (casos #5, #6, #7, #8). Barra 100 micras. Cps: cuentas por segundo. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

La discrepancia en la localización de la FPN y el hierro en la región CA1 del cerebro sugiere que hay poca acumulación de hierro dentro de las neuronas. Esto puede ser debido a que la FPN, como exportador de hierro, facilitaría la liberación del metal hacia el espacio extracelular. Una vez en el líquido tisular, este ion puede seguir diversas rutas para ser eliminado al plasma sanguíneo. Sin embargo, en la EA, se observa un aumento considerable de hierro en todas las capas del tejido cerebral, especialmente en la capa de células piramidales, a pesar de una mayor cantidad de la FPN. Aún no está claro si este aumento de hierro se debe a una acumulación dentro de las células o en el espacio intercelular.

Se ha propuesto un modelo en el que habría una "vía de absorción celular" del hierro, la ruta principal, y también una "vía de absorción no celular", es decir, una ruta de derivación por la que una pequeña

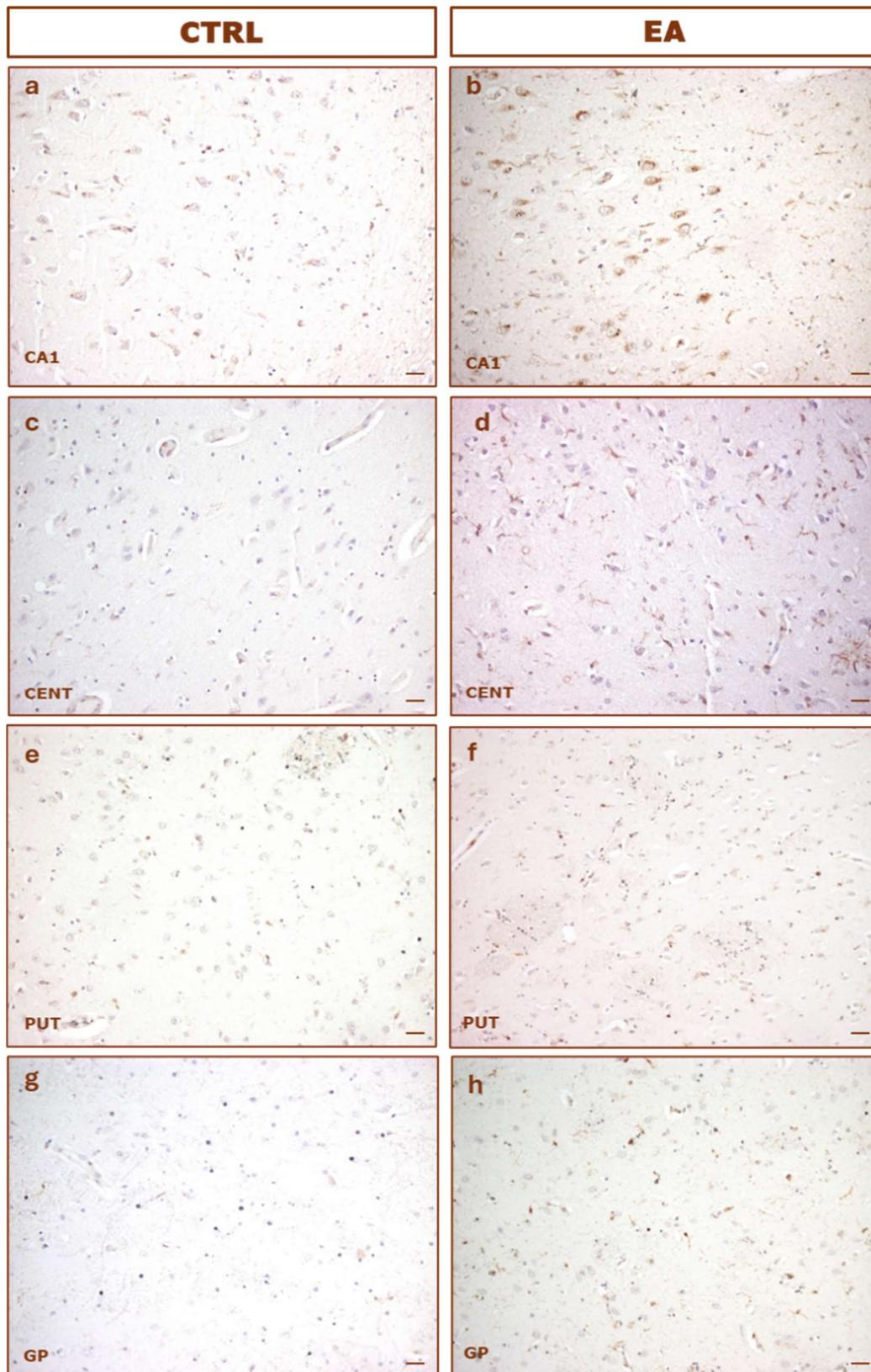
cantidad de hierro no sería absorbida por ninguna célula cerebral y saldría directamente del cerebro con relativa rapidez. Ya que, en condiciones fisiológicas, la cantidad de este ion en la “ruta de derivación” es muy pequeña, la proporción de hierro aumentaría gradualmente en el cerebro con la edad (Du et al. 2015).

El hecho de que no exista colocalización entre las zonas con mayor cantidad del exportador y aquellas con más hierro, en los controles de la CA1, podría interpretarse como que la vía de entrada y salida celular mantiene la homeostasis a nivel neuronal y que el hierro seguiría la ruta de derivación. Parece convincente pensar que, en aquellos lugares donde se expresa este transportador celular, la cantidad de hierro intracelular tiende a ser menor y que el hierro exportado al neuropilo se mueve a las zonas de la corteza donde será drenado hacia los vasos profundos, al LCR por las vellosidades aracnoideas o por otras rutas no completamente conocidas. Por tanto, además de la hipótesis que explica que la cantidad de hierro absorbida por las células está determinada por la expresión de las proteínas importadoras o exportadoras del mismo en la membrana, y no por la cantidad de hierro disponible que ingresa al cerebro, existe otra que supone un desbalance del flujo constante de hierro en cerebro, con mayor entrada y menor salida del hierro. Según esta teoría, las células nerviosas irían incorporando poco a poco, y de forma pasiva, este exceso de hierro y, por tanto, regulando al alza la expresión de la FPN en el envejecimiento y en la EA, como hemos comentado anteriormente.

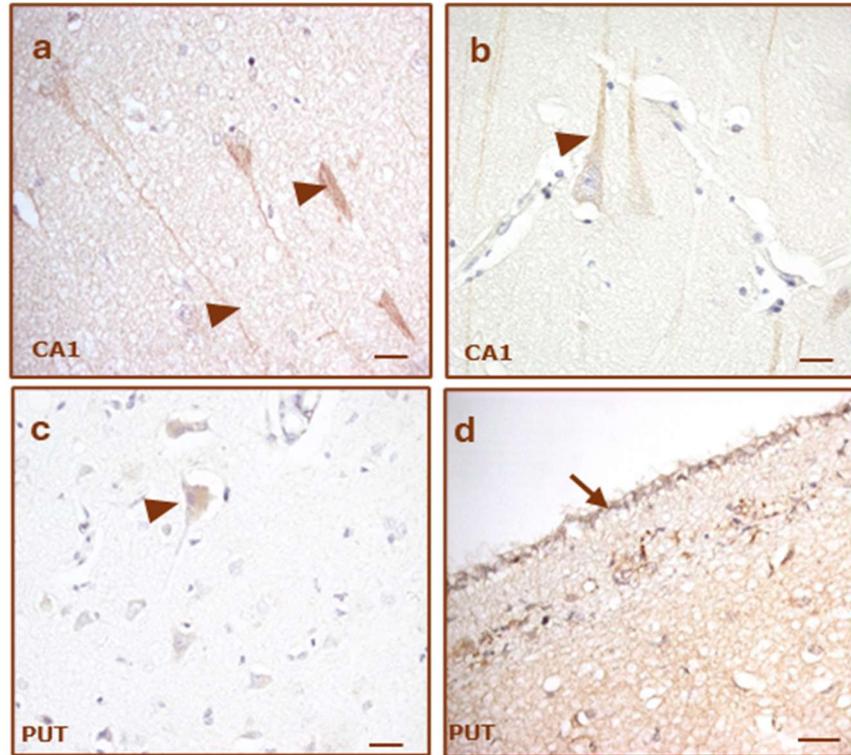
Por otra parte se ha descrito, utilizando diversas técnicas (histológicas, RMN, etc), que la cantidad de hierro es mayor en la sustancia blanca que en la sustancia gris de la corteza (Bulk et al. 2018). Esta afirmación ha sido justificada en los casos control como un reflejo del papel del ion en la síntesis y mantenimiento de la mielina. El hierro se encontraría en forma de depósitos de ferritina en los oligodendrocitos de las zonas cercanas a los lugares de mielinización. Esto justificaría la escasa cantidad de FPN en la capa SMR respecto a la neuronal. Además, que el hierro aumente en la EA y que lo haga en mayor medida en la zona cercana a la sustancia blanca (la que corresponde a SMR) podría explicarse debido a la pérdida de las prolongaciones mielínicas que se ha descrito en el EA y el envejecimiento (Peters and Rosene 2003). La pérdida de neuritas y la ruptura de las vainas de mielina puede producir un estado de retroceso en la mielinización por parte de los oligodendrocitos, con la aparición de figuras de mielina y el acúmulo de hierro extracelular en forma de hemosiderina.

#### **4.5.- La expresión de la HPC aumenta en la corteza temporal y los ganglios basales con la edad, pero no en la enfermedad de Alzheimer**

Teniendo en mente la hipótesis de la desregulación de la vía FPN/HPC en la "sobrecarga de hierro" en la EA, nos propusimos estudiar la presencia de la HPC en las situaciones y áreas cerebrales previamente descritas. Para ello se realizó, en primer lugar, una IHQ para la HPC revelada con DAB en el hipocampo, la CENT, el PUT y el GP. Los resultados mostraron un marcaje intenso en todos los territorios cerebrales muestreados, tanto en los centros superiores como en los inferiores (Figura 15). La señal IHQ aparecía de forma granular sobre todo en las neuronas piramidales, pero de forma más intensa y difusa por el citoplasma de las células de glía, la mayoría identificadas como microglía no activada por su tamaño y morfología (Figura 16 b,c). De esta manera, se observó una menor intensidad de señal para la HPC en la sustancia gris, donde hay más neuronas, y una intensidad mayor en aquellas zonas donde predominaba la sustancia blanca, con más cantidad de células gliales. También es remarcable el marcaje positivo de algunas células perivasculares, posiblemente pericitos, y ependimocitos (Figura 16d).

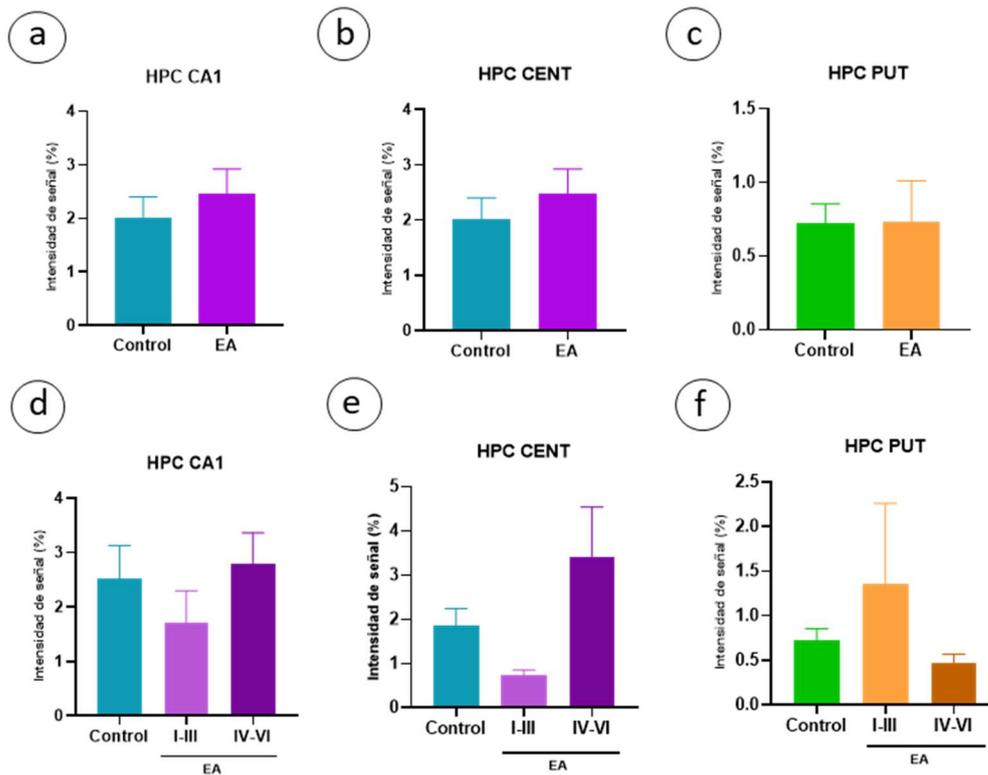


**Figura 14.-** Inmunohistoquímica para la hepcidina (HPC) revelada con DAB en varias zonas del cerebro humano. Contraste nuclear en azul con tionina. Zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1), corteza entorrinal (CENT), globo pálido (GP) y putamen (PUT). **(a)** CA1 de hipocampo de una mujer control de 57 años. **(b)** CA1 de hipocampo de una mujer de 76 años con EA en estadio de Braak VI. **(c)** CENT de una mujer control de 57 años. **(d)** CENT de un hombre de 61 años con EA. **(e)** PUT de una mujer control de 68 años. **(f)** PUT de una mujer de 84 años con EA del estadio Braak III. **(g)** GP de un hombre control de 19 años. **(h)** GP de una mujer de 76 años con EA con Braak VI. Todas las imágenes fueron tomadas a un aumento de x20. Barra de calibración: 30  $\mu$ m.

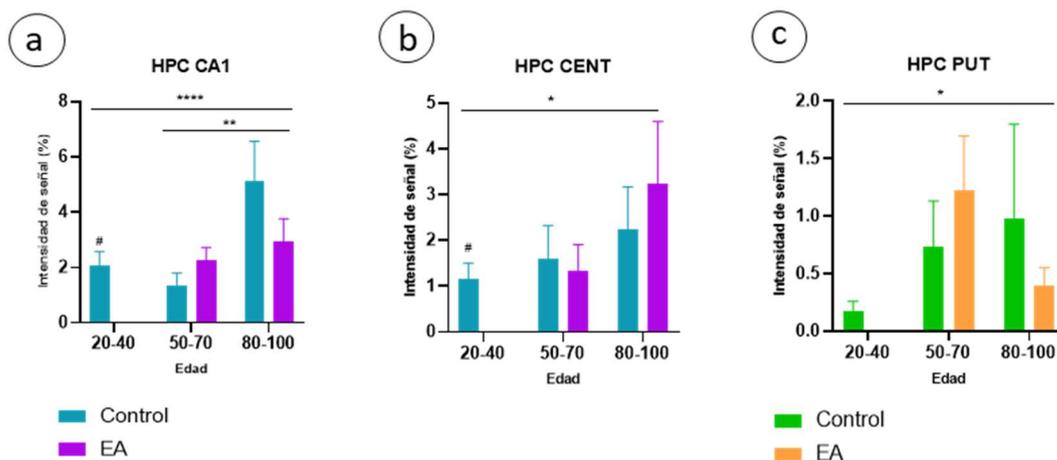


**Figura 15.-** Detalles de la inmunohistoquímica de hepcidina (HPC) revelada con DAB. Contraste nuclear en azul con tionina. **(a)** Neuronas en CA1 de una mujer control de 57 años. Aumento 100x. Nótese el marcaje de forma granular dentro de las células. Barra 10  $\mu$ m. **(b)** Astrocito en CA1 de hipocampo de un hombre control de 41 años. Aumento 100x. Barra 10  $\mu$ m. **(c)** Microglía en PUT un hombre control de 41 años. Tomado a 100x. Barra 10  $\mu$ m **(d)** Cuarto ventrículo en los ganglios basales en un caso de un hombre de 61 años con EA. Tomado a 20x. Barra 30  $\mu$ m.

La cuantificación de la señal IHQ para la HPC, tal y como se puede observar en la Figura 17, no mostró cambios significativos en la cantidad de esta proteína entre los cerebros de pacientes con EA, en ningún estadio ni en ninguna de las áreas estudiadas, respecto a los controles (Figura 17). Sin embargo, en el análisis por grupos de edad se observó un aumento significativo de la expresión de la HPC tanto en los casos control como en los de EA a nivel de la corteza cerebral y el PUT (Figura 18).



**Figura 16.-** Representación gráfica de la intensidad de marcaje para la hepcidina (HPC) en las diferentes áreas cerebrales analizadas, zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1), corteza entorrinal (CENT), y putamen (PUT). Las gráficas **a, b y c** muestran el porcentaje de intensidad de marcaje de HPC medio  $\pm$  SEM de pacientes EA respecto a los controles. En las gráficas **d, e y f** se representa el porcentaje de intensidad de marcaje de HPC medio  $\pm$  SEM de pacientes EA separados en dos grupos, EA leve (Braak del I-III) y grave (Braak del IV-VI), respecto a los controles. En ambos casos el análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni.



**Figura 17.-** Representación gráfica de la intensidad de marcaje para hepcidina (HPC) en las diferentes áreas cerebrales analizadas, zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1), corteza entorrinal (CENT), y putamen (PUT). Las gráficas **a, b, c** muestran el porcentaje de intensidad de marcaje de HPC medio  $\pm$  SEM de pacientes EA respecto a los controles separados por grupos de edad, jóvenes (20-40), adultos (50-70) y ancianos (80-100). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de dos factores seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. \*= diferencias estadísticamente significativas entre grupos de edad \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . # = diferencias estadísticamente significativas EA versus control #  $p < 0,05$ .

A nivel sistémico la HPC, sintetizada en el hígado, regula la homeostasis del hierro controlando su flujo desde el duodeno al plasma. Cuando los niveles de la HPC son bajos se produce sobrecarga de hierro, mientras que los niveles altos causan anemia o inflamación al restringir la absorción intestinal de este ion y su liberación asociada a los macrófagos (Raha et al. 2021). Además de los niveles de hierro circulante, la inflamación es otro factor que regula la transcripción de la HPC en los hepatocitos; las citocinas proinflamatorias disparan la expresión de HPC a nivel sistémico (Vela 2018).

Se sabe poco sobre el origen de la HPC en el SN, ya que aunque se han encontrado cantidades importantes en el cerebro de mamíferos, su expresión podría ser sistémica y llegar al tejido nervioso a través del endotelio (Raha-Chowdhury et al., 2015). Así, el ARNm de la HPC ha sido detectado en varias regiones del cerebro, incluida la corteza, el hipocampo, la amígdala, el tálamo, el hipotálamo, el bulbo olfatorio, el mesencéfalo, el cerebelo, la protuberancia y la médula espinal, aunque en niveles bajos comparados con los de su proteína (Zechel and Huber-Wittmer 2006). También se demostró una distribución amplia del ARNm de la HPC en el cerebro de roedores que además resultó aumentar con la edad (Urrutia et al. 2013). En base a la disparidad entre los niveles de transcripción del gen de la HPC y el contenido de la proteína, y los hallazgos en el cerebro de ratones con inhibición sistémica de la HPC, se ha sugerido que la HPC cerebral se debe en parte a la producción *in situ* pero también a su síntesis fuera del cerebro de forma sistémica (Du et al. 2015; Qian and Ke 2020; Ruma; Raha-Chowdhury et al. 2015). Algunos autores han encontrado que la HPC aparece en los cerebros humanos dentro de macrófagos que bordean los vasos y los ventrículos, pero no en la microglía activada. Esto parece apuntar a una entrada de la HPC desde el plasma (Raha et al. 2021). También podría ser que la HPC expresada por las células nerviosas suministradoras, pudiese ser transportada a otras células diana de forma paracrina, o que simplemente pudiese desempeñar un papel autocrino para controlar el equilibrio del hierro local (Nemeth and Ganz 2021; Yanase et al. 2020).

Como se ha comentado anteriormente, se sabe que en condiciones fisiológicas y en la mayoría de las células, la HPC es capaz de unirse a la FPN dando lugar a un complejo proteico sujeto a internalización y degradación lisosomal y que, por tanto, bloquea el flujo de salida de hierro de las células (Yanase et al. 2020). En este sentido, una posible razón que justificaría los niveles elevados de hierro en el cerebro durante el envejecimiento y, particularmente, en la EA podría ser el aumento de los niveles de HPC, ya que, detendría su exportación al neuropilo (Billesbølle et al. 2020). Se ha demostrado mediante inyecciones intracraneales de HPC en roedores o añadiéndola directamente a cultivos

primarios de neuronas, astrocitos y microglía, que ésta puede regular a la baja la expresión de la FPN y como consecuencia aumentar el hierro intracelular (Du et al., 2015; Li et al., 2011; Qian et al., 2023b; Raha-Chowdhury et al., 2015). También se ha apuntado que la HPC podría tener un efecto inhibitor en la expresión de otras proteínas encargadas del transporte del hierro (de entrada y salida), como la TfR, lo que produciría la retención del hierro en el citoplasma celular (Du et al. 2015).

El hecho de que la HPC inhiba la liberación de hierro, así como su absorción, tanto en neuronas como astrocitos, sugiere para Qian y Ke la existencia de un “mecanismo de autoprotección (o defensa) celular mediado por HPC” en el cerebro. De forma que cuando el hierro aumenta, la expresión de HPC también aumentaría, permitiendo a las células cerebrales aislarse del entorno con mayor contenido de hierro y preservar la supervivencia celular (Qian and Ke 2020).

Mediante análisis histoquímico de muestras de cerebros humanos tomadas tras la autopsia, Raha y colaboradores demostraron la amplia distribución de la HPC en el cerebro humano normal y su colocalización con la FPN en neuronas y astrocitos. También describieron que la HPC se reducía a zonas del neuropilo, vasos sanguíneos, neuronas dañadas y procesos neuríticos anormales en la EA (Raha et al. 2013). De hecho, se encontró que los niveles proteicos de HPC y FPN se reducían significativamente en lisados *post-mortem* de hipocampo de pacientes con EA (Raha-Chowdhury et al., 2015; Raha et al., 2013a) posiblemente como resultado de su descomposición lisosomal. Otra explicación podría ser que la disminución sea secundaria y esté relacionada con el daño neuronal sufrido durante la EA.

Basándose en datos de cuantificación de la proteína HPC o de su ARNm en lisados de cerebro, otros autores han reportado que la HPC mostró una regulación positiva de 2,4 veces en las muestras de estadio III-VI Braak en comparación con los controles de Braak en estadio I y II y con demencia sin EA (Chaudhary et al. 2021). Los autores lo explican por una activación de la microglía inducida por Tau y A $\beta$  en los cerebros de EA, que aumentaría la síntesis y secreción de IL-6 en el estadio III-VI de Braak, lo que resultaría en una regulación positiva de la HPC (Chaudhary et al. 2021). Sería esperable que la regulación positiva de la HPC regulase negativamente la FPN en las células vecinas mediante su actividad paracrina. Sin embargo, no se observaron cambios en la expresión de FPN en las muestras de Braak leve en relación con los controles, aunque sí una disminución significativa de la misma en las muestras de Braak severo, coincidiendo con el aumento de la HPC. En este sentido, parece pertinente comentar un estudio de los niveles de proteínas relacionadas con el metabolismo de hierro, que demostró que los niveles de estas proteínas tienden a ser más altos en el suero de los

pacientes con EA que en los controles, alcanzando significación estadística en los pacientes con EA pura con niveles séricos de HPC tres veces más altos que los controles (Sternberg et al. 2017).

Debido a que la HPC de forma sistémica puede actuar como un péptido antimicrobiano y antiinflamatorio, la inflamación propia de la EA podría ser la causa adicional del aumento de la cantidad de HPC, de la misma forma que ocurre a nivel sistémico (Du et al. 2015). Los niveles de hierro en sangre aumentan la síntesis de HPC por los hepatocitos, mediada por citocinas como la IL-6, por tanto, cabría esperar una mayor concentración de HPC con la progresión de la enfermedad y con la edad, debido al estado de neuroinflamación de la EA (Vela 2018). En este contexto, se ha demostrado que la HPC suprime la respuesta inflamatoria desencadenada por agregados de  $A\beta_{41-42}$  en astrocitos y microglia, reduciendo la expresión y secreción de las citoquinas proinflamatorias, IL-6 y TNF- $\alpha$ , y disminuyendo así el daño oxidativo de las neuronas del hipocampo. Además, la inyección estereotáxica de la HPC suprimió la activación de astrocitos y microglía, así como la inducción de marcadores de estrés oxidativo en las neuronas (Urrutia et al., 2017). Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que la HPC es un agente antiinflamatorio que bloquea las acciones proinflamatorias y prooxidantes del péptido  $A\beta$  en el cerebro, a través de la reducción de la expresión y secreción de TNF- $\alpha$  e IL-6 en ratones (Hofer and Perry 2016; Urrutia et al. 2013).

Nosotros no hemos visto aumentos significativos de los niveles cerebrales de la HPC entre los cerebros control y con EA, para ninguna de las áreas estudiadas, pero si diferencias individuales bastante altas que hacen difícil la obtención de conclusiones significativas. Según hemos observado, la expresión de la HPC en nuestro caso está relacionada con la edad, como también lo está el acumulo de hierro en casi todas las áreas cerebrales, lo que ha sido descrito también anteriormente en el cerebro de ratones envejecidos (Urrutia et al., 2013). Estos datos son más consistentes con la teoría de un aumento de la HPC cerebral dependiente de procesos inflamatorios que de una regulación de la cantidad de hierro intraparenquimal en la EA.

Ciertos hallazgos respaldan la idea de que la disponibilidad de hierro intracelular es crucial para la degradación de FPN mediada por HPC y respaldan un vínculo mecanicista entre la disponibilidad de hierro citosólico y la unión a la HPC. Por el contrario, la quelación del hierro férrico extracelular no alteró la respuesta de FPN después de dos horas de tratamiento con HPC (Lu et al. 2017).

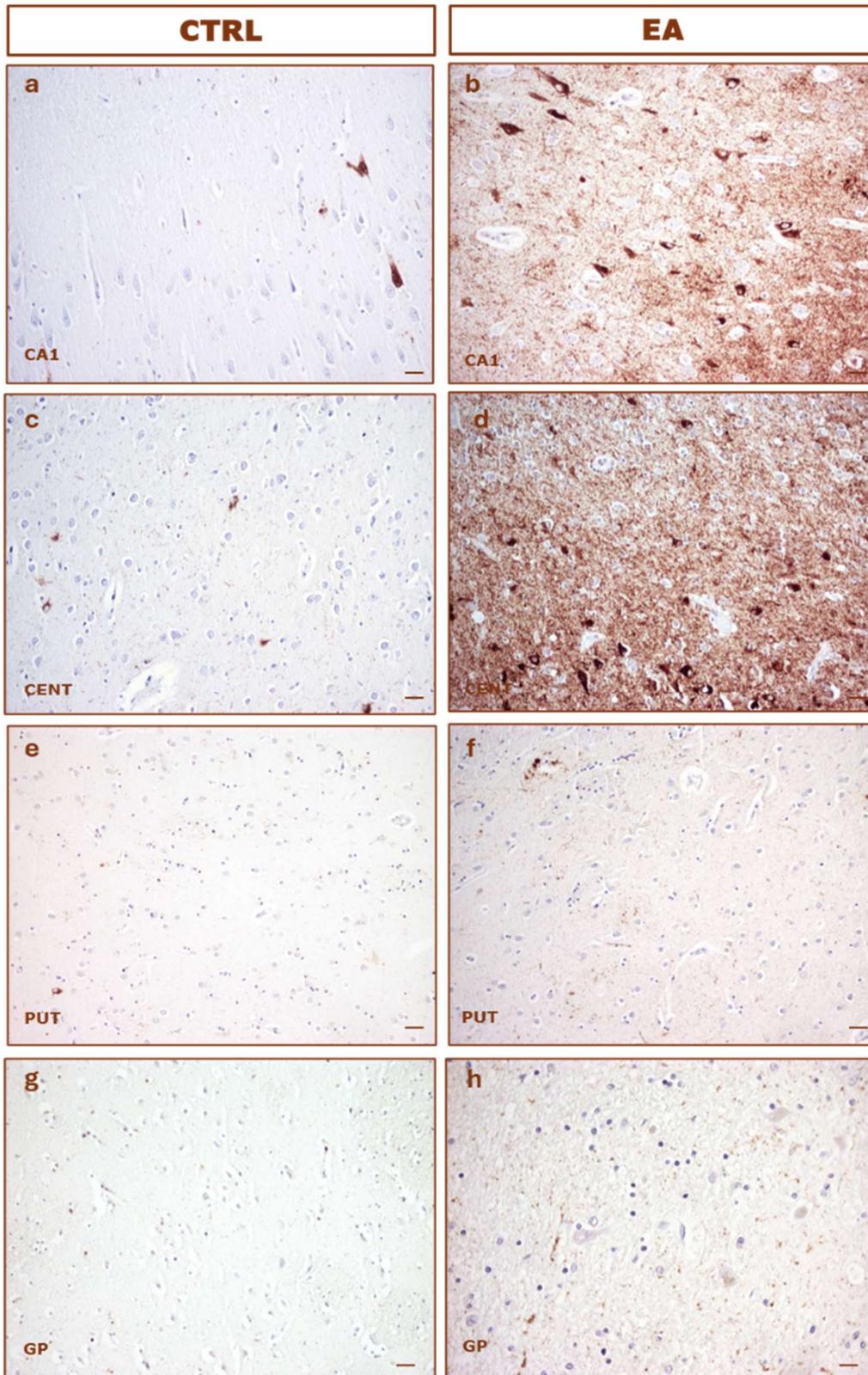
Otros datos sobre la expresión de HPC en neuronas en condiciones basales son contradictorios y aún no se comprenden bien, aunque su expresión se ha observado consistentemente en neuronas

expuestas a estímulos inflamatorios. Sin embargo, la HPC no parece ser importante para la homeostasis del hierro en condiciones basales, ya que los modelos *knock out* de HPC no muestran una sobrecarga cerebral significativa de hierro. Parece que la señalización inflamatoria en el cerebro inclina la balanza a favor de una mayor importación de hierro y secuestro celular de hierro, así la inflamación acompañada del efecto de la HPC al bloquear la exportación de hierro, empeorarían aún más la sobrecarga de hierro observada en las neuronas. Debido a esta aparente contradicción, Vela y colaboradores propusieron un papel dual de la HPC, sugiriendo que la existencia o no de inflamación en el cerebro, es la principal razón de esta contradicción. Plantearon la hipótesis de que el pretratamiento con HPC podría proteger a las células cerebrales del daño oxidativo, mientras que la inducción de HPC durante un proceso inflamatorio aumentaría la lesión neuronal debida al hierro (Vela 2018).

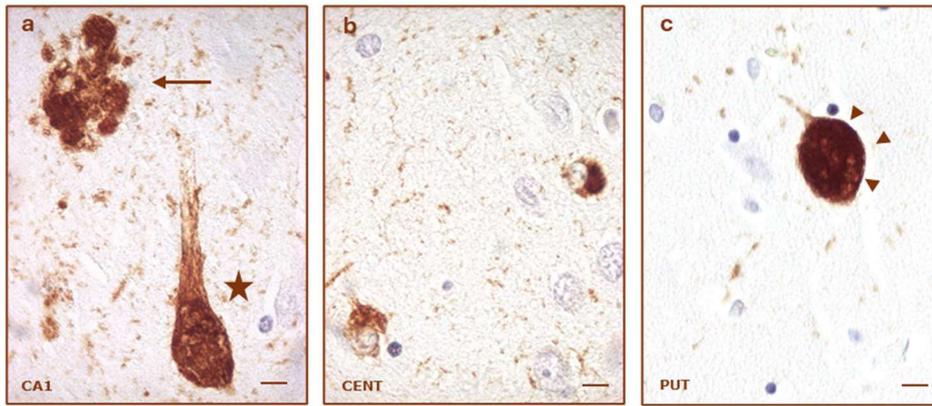
#### **4.6.- Colocalización del hierro, las proteínas transportadoras y los marcadores clásicos de la enfermedad de Alzheimer**

En todo estudio sobre la EA que se precie se hace necesaria una valoración de los marcadores clásicos de la patología, Tau y A $\beta$ , para corroborar el diagnóstico de forma precisa, pero, también, para correlacionar con otros parámetros que puedan estar influyendo en la patología.

En lo que respecta a la proteína Tau, la IHQ para la misma demostró que la proteína Tau fosforilada no aparecía prácticamente en ninguna de las áreas cerebrales analizadas en los individuos control, estando especialmente ausente en los ganglios basales. Sin embargo, el marcaje aumentaba considerablemente en la EA, siendo su cantidad dependiente del grado de Braak (Figura 19 y Figura 21). En concreto, se observó cómo esta proteína estaba presente en los ONF de las neuronas piramidales, así como en las neuritas distróficas del neuropilo y de las que forman parte de las PS en la corteza hipocampal CA1 y en la CENT (Figura 19 a, b, c, d y figura 20 a, b). En los ganglios basales, la cantidad de Tau era baja comparada con los centros superiores, incluso cuando hablamos de casos de EA con un grado alto de Braak (Figura 19). La proteína no aparecía en las neuronas de la zona, sino que se concentraba en las prolongaciones, que posiblemente sean axones de paso. Es frecuente observar grandes prolongaciones axonales en degeneración (Figura 20 c).

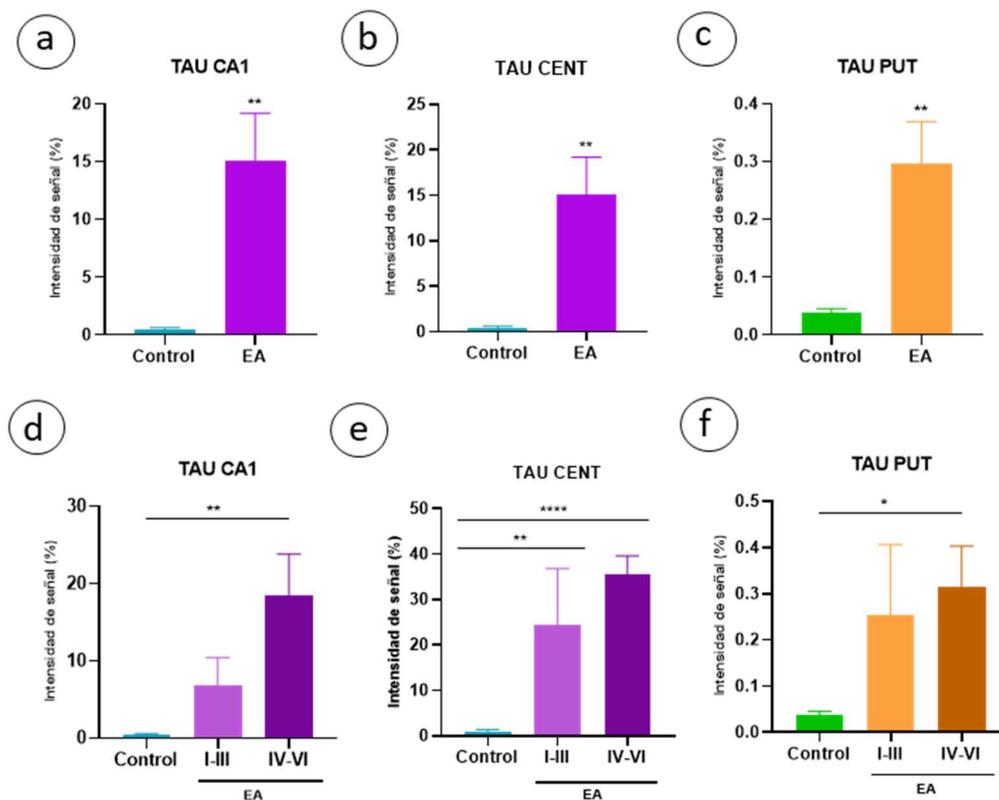


**Figura 18.-** Inmunohistoquímica de Tau revelada con DAB en varias zonas del cerebro humano: Zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1), corteza entorrinal (CENT), globo pálido (GP) y putamen (PUT). Contraste nuclear en azul con tionina. (a) CA1 de hipocampo de un hombre control de 82 años. Aumento de 20x. (b) CA1 de hipocampo de un hombre de 81 años con EA. Aumento de 20x. (c) CENT de una mujer control de 71 años. Aumento de 20x. (d) CENT de una mujer de 81 años con EA Braak V-VI. Aumento 20x. (e) PUT de una mujer control de 68 años. Aumento de 20x. (f) PUT de una mujer de 84 años con EA del estadio Braak III. Aumento 20x. (g) GP de un hombre control de 19 años. Aumento 20x. (h) GP de una mujer de 91 años con EA del estadio Braak V-VI. Aumento 20x. Barra de calibración: 30  $\mu$ m.



**Figura 19.-** Inmunohistoquímica de Tau revelada con DAB en varias zonas del cerebro humano: Zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1), corteza entorrinal (CENT), globo pálido (GP) y putamen (PUT). Contraste nuclear en azul con tiónina. (a) Neurona piramidal con degeneración granulovacuolar (estrella) y neuritas distróficas (flecha) de la CA1 del hipocampo de una mujer control de 100 años tomado a un aumento de 100x. (b) CENT de hipocampo de un hombre de 81 años con EA. Aumento de 100x. (c) PUT de una mujer de 76 años con EA del estadio Braak V-VI. Axón distrófico (cabezas de flecha). Aumento 100x. Barra de calibración: 20  $\mu$ m.

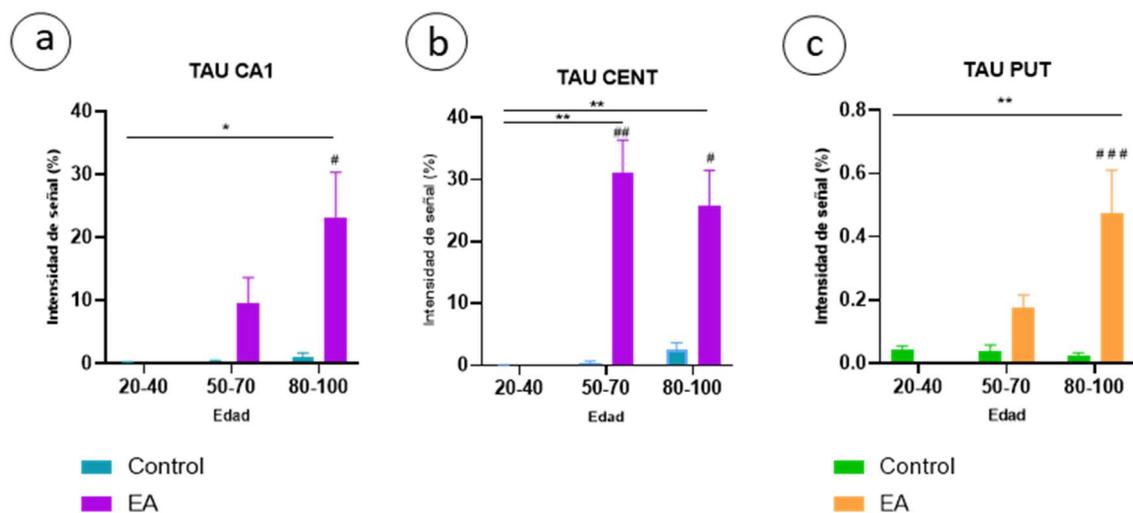
La cuantificación de la señal IHQ de Tau corroboró lo observado en las imágenes, es decir, que existe una mayor cantidad de la proteína ligada a la EA y que ésta aumenta significativamente en relación con los estadios de Braak (Figura 21). Esto se cumple tanto para la corteza como para los ganglios basales, aunque éstos presenten una menor cantidad relativa de Tau.



**Figura 20.-** Representación gráfica de la intensidad de marcaje para Tau en las diferentes áreas cerebrales analizadas, zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1), corteza entorrinal (CENT), y putamen (PUT). Las gráficas a, b y

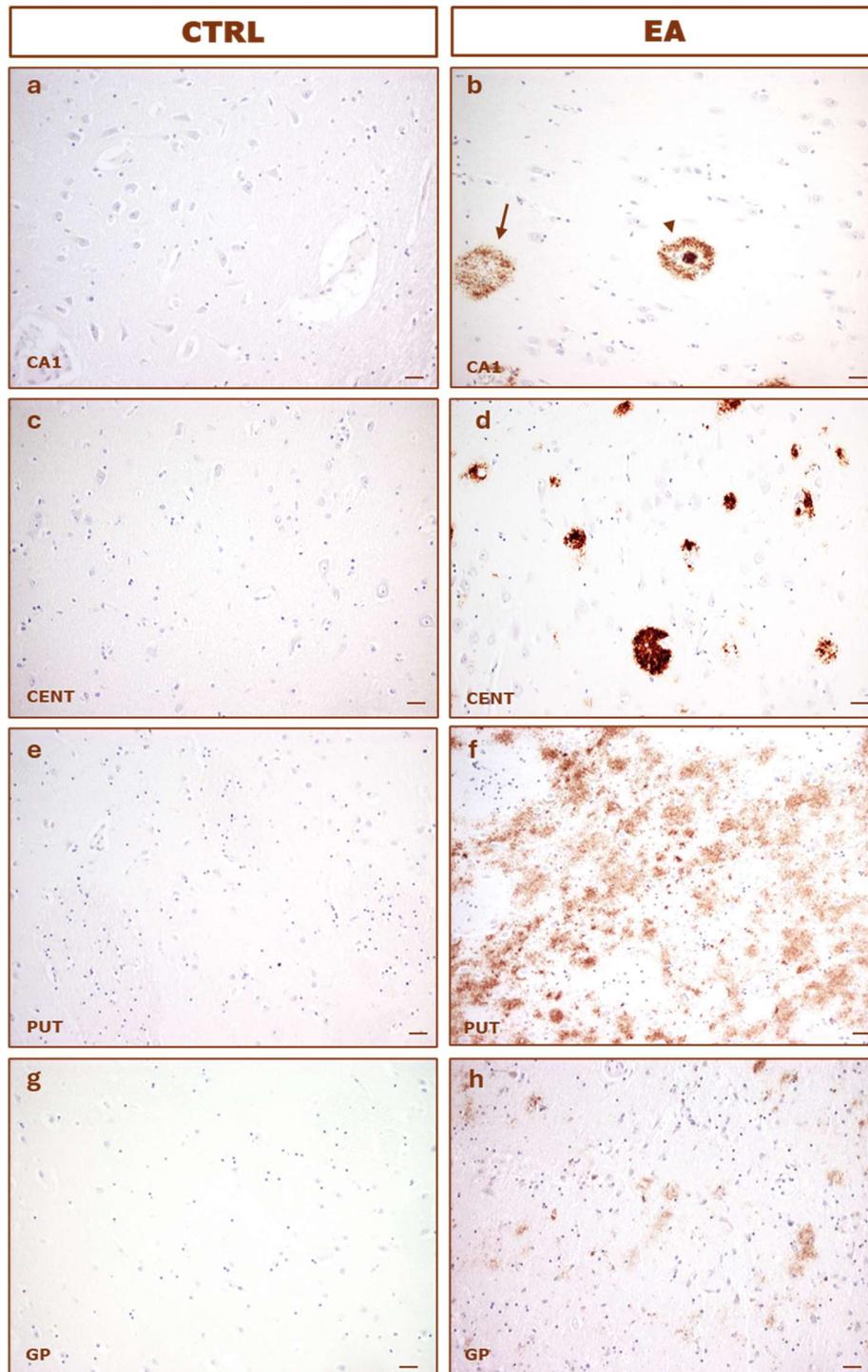
c muestran el porcentaje de intensidad de marcaje de Tau medio  $\pm$  SEM de pacientes EA respecto a los controles. En las gráficas d, e y f se representa el porcentaje de intensidad de marcaje de Tau medio  $\pm$  SEM de pacientes EA separados en dos grupos, EA leve (Braak del I-III) y grave (Braak del IV-VI), respecto a los controles. En ambos casos el análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. \*= diferencias estadísticamente significativas versus control \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Cuando se analizó la relación entre la cantidad de Tau y la edad, se observó un aumento significativo de la cantidad de esta proteína con la edad en los pacientes con EA tanto en la CA1 del hipocampo, como la CENT y la PUT (Figura 22).

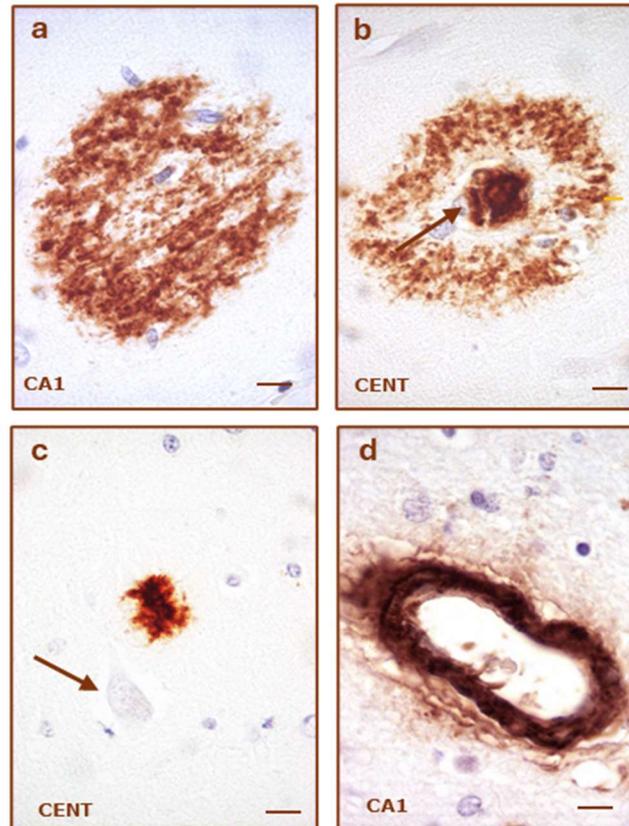


**Figura 21.-** Representación gráfica de la intensidad de marcaje para Tau en las diferentes áreas cerebrales analizadas, zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1), corteza entorrinal (CENT), y putamen (PUT). Las gráficas a, b y c muestran el porcentaje de intensidad de marcaje de Tau medio  $\pm$  SEM de pacientes EA respecto a los controles separados por grupos de edad, jóvenes (20-40), adultos (50-70) y ancianos (80-100). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de dos factores seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. \*= diferencias estadísticamente significativas entre grupos de edad \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . # = diferencias estadísticamente significativas EA versus control #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$ .

En lo que respecta al péptido A $\beta$ , el análisis IHQ demostró marcaje para el mismo en las PS difusas y maduras del neuropilo del hipocampo y la CENT, sobre todo en los casos con EA avanzado. Por el contrario, en los ganglios basales, la proteína se distribuía de forma difusa y no formaba PS con core, ni siquiera en los estadios más avanzados de la patología (Figuras 23 y 24). También se encontró un depósito de A $\beta$  alrededor de vasos sanguíneos de tamaño medio y grande en la corteza de algunos de los casos de EA (Figura 24).

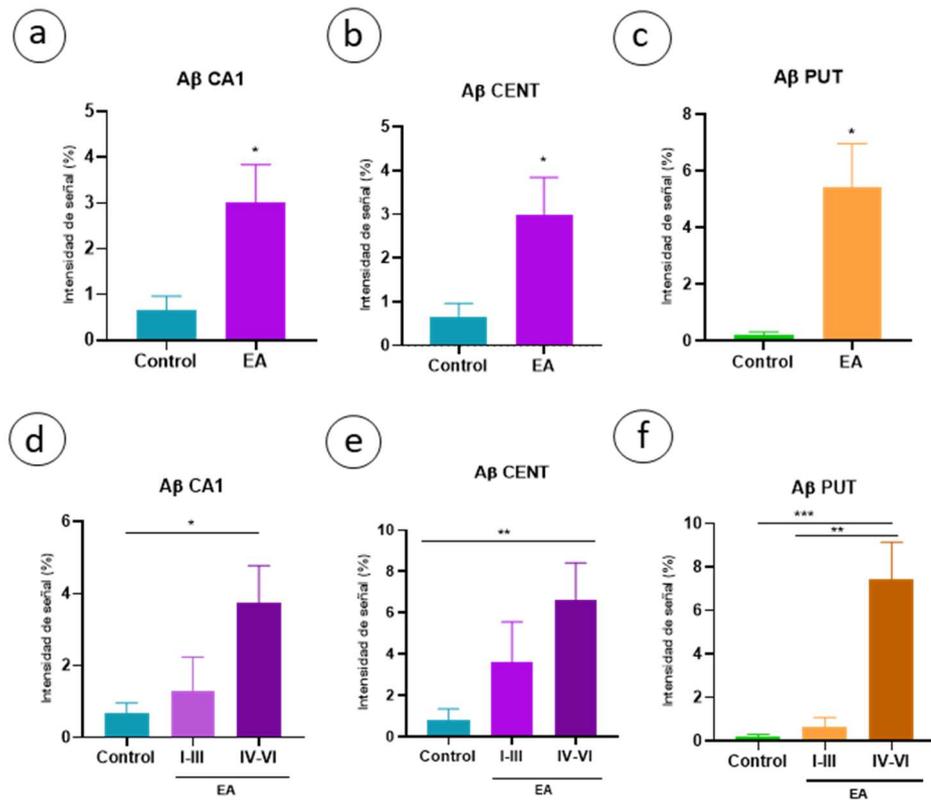


**Figura 22.-** Inmunohistoquímica de A $\beta$  revelada con DAB en varias zonas del cerebro humano: Zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1), corteza entorrinal (CENT), globo pálido (GP) y putamen (PUT). Contraste nuclear en azul con tiónina. (a) CA1 de hipocampo de una mujer control de 57 años. Aumento 20x. (b) Placa senil difusa (flecha) y placa madura (cabeza de flecha) en CA1 de hipocampo de un hombre de 62 años con EA estadio Braak VI. Aumento 20x. (c) CENT de una mujer control de 41 años. Aumento de 20x. (d) CENT de un hombre de 87 años con EA estadio de Braak VI. Aumento 20x. (e) PUT de una mujer control de 68 años. Aumento 20x. (f) PUT de un hombre de 68 años con EA en estadio de Braak VI. Aumento 20x. (g) GP de un hombre control de 19 años. Aumento 20x. (h) GP de una mujer de 91 años con EA con estadio Braak V-VI. Aumento 20x. Barra: 30  $\mu$ m.

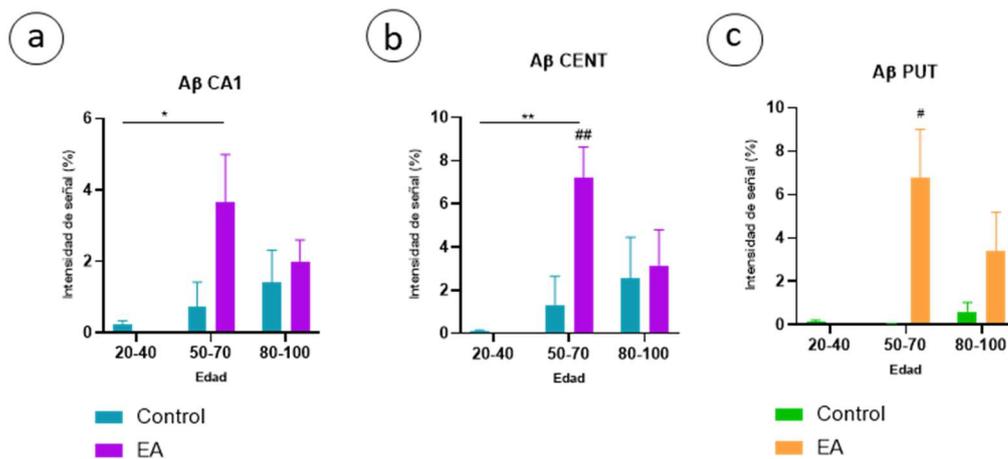


**Figura 23.-** Inmunohistoquímica de  $A\beta$  revelada con DAB. Detalles en Zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1) y corteza entorrinal (CENT). Contraste nuclear en azul con tiónina. (a) Placa difusa del CA1 del hipocampo de una mujer control de 100 años. Aumento 100x. Barra 30  $\mu\text{m}$  (b) Placa madura en el CENT de hipocampo de un hombre de 81 años con EA. Flecha azul marca en "core" de la placa. Aumento 100x. Barra 30  $\mu\text{m}$  (c) Deposito de  $A\beta$  cerca de una neurona piramidal (cabeza de flecha) en el neuropilo de la CENT de una mujer de 76 años con EA del estadio Braak V-VI. Aumento 100x. Barra 20  $\mu\text{m}$ . (d) Deposito perivascular de  $A\beta$  en una arteriola del CA1 en un hombre de 68 con EA. Aumento 40x. Barra 20  $\mu\text{m}$ .

La cuantificación de la señal IHQ puso de manifiesto una cantidad de  $A\beta$  mayor en los casos de EA respecto a los controles en todas las zonas seleccionadas, aumentando en relación con la edad y el estadio de Braak (Figura 25). Por el contrario, no se observó una correlación positiva con la edad en el grupo de control, lo que sugiere que el cambio en la susceptibilidad en estas regiones se debe a cambios patológicos asociados a  $A\beta$  (Figura 26).

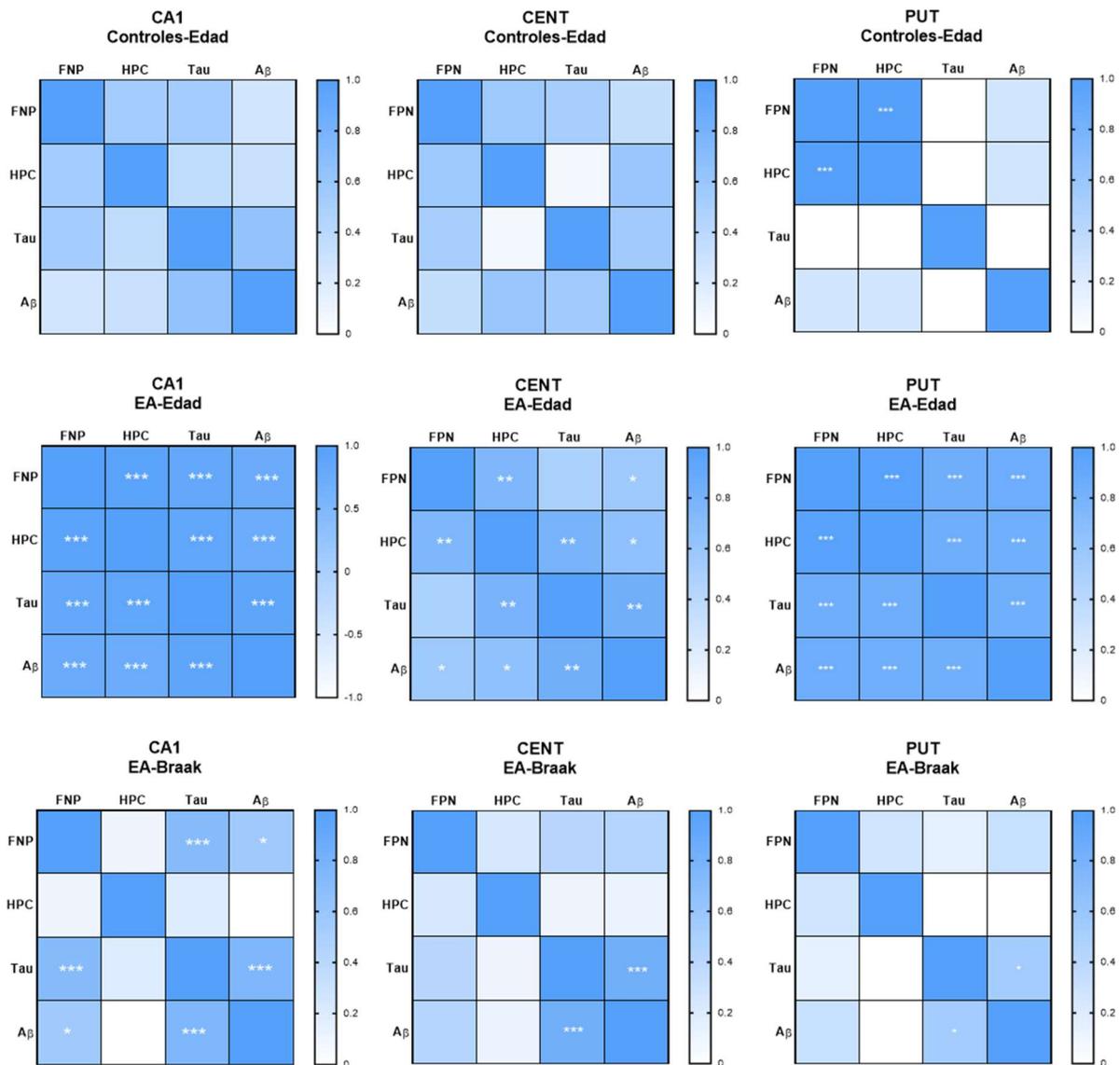


**Figura 24.-** Representación gráfica de la intensidad de marcaje para Aβ en las diferentes áreas cerebrales analizadas, zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1), corteza entorrinal (CENT), y putamen (PUT). Las gráficas **a**, **b** y **c** muestran el porcentaje de intensidad de marcaje de Aβ medio  $\pm$  SEM de pacientes EA respecto a los controles. En las gráficas **d**, **e** y **f** se representa el porcentaje de intensidad de marcaje de Aβ medio  $\pm$  SEM de pacientes EA separados en dos grupos, EA leve (Braak del I-III) y grave (Braak del IV-VI), respecto a los controles. En ambos casos el análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. \*= diferencias estadísticamente significativas versus control \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Figura 25.-** Representación gráfica de la intensidad de marcaje para Aβ en las diferentes áreas cerebrales analizadas, zona 1 del Cornu Ammonis del hipocampo (CA1), corteza entorrinal (CENT), y putamen (PUT). Las gráficas **a**, **b** y **c** muestran el porcentaje de intensidad de marcaje de Aβ medio  $\pm$  SEM de pacientes EA respecto a los controles separados por grupos de edad, jóvenes (20-40), adultos (50-70) y ancianos (80-100). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de dos factores seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. \*= diferencias estadísticamente significativas entre grupos de edad \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . # = diferencias estadísticamente significativas EA versus control #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ .

Ya que en la bibliografía se ha relacionado el enriquecimiento de hierro cerebral con la progresión de la EA y la presencia, cada vez mayor, de Tau y A $\beta$  en la corteza (Connor et al. 1992; Falangola et al. 2005; Meguro et al. 2008). El siguiente paso fue explorar las posibles correlaciones entre los niveles de marcadores moleculares (Tau, A $\beta$ ) y las proteínas transportadoras de hierro (FPN, HPC) con las etapas de Braak y la edad de los individuos en la CA1 del hipocampo, la CENT y el PUT.

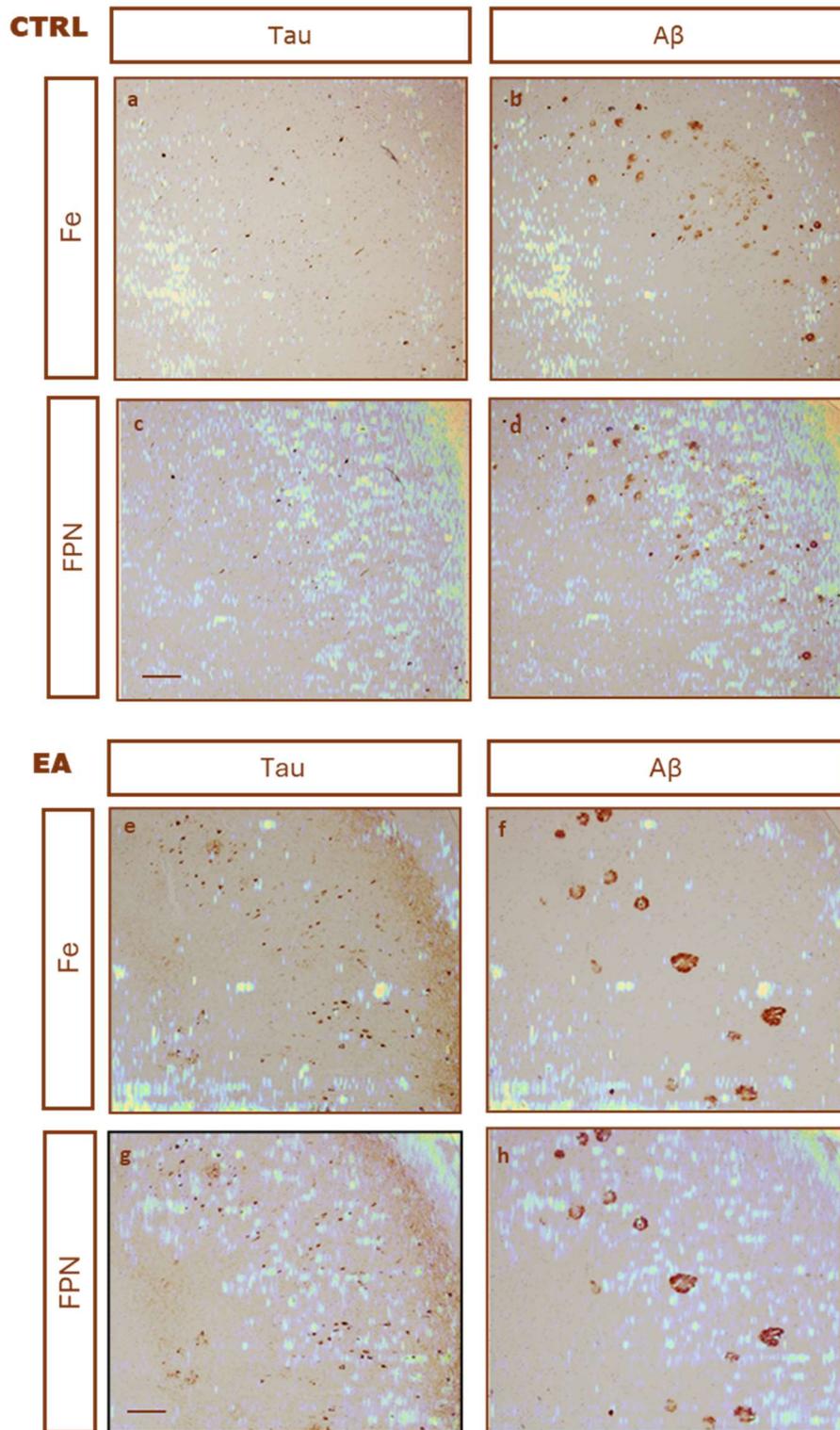


**Figura 26.-** Matrices de correlación  $\rho$  de Spearman entre los marcadores de la patología Tau y A $\beta$ , y las proteínas del transporte del hierro hepcidina (HPC) y ferroporfina (FPN). El color de cada cuadrícula está en relación con el grado de correlación de las variables, donde un color oscuro muestra correlación alta y un color claro muestra correlación baja. \*= significación estadística. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Los datos revelaron, que los niveles de FPN y HPC se correlacionaban de manera significativa a medida que avanzaba la edad en la EA en la CA1 del hipocampo y el PUT. Sin embargo, no se

encontraron estas asociaciones entre los niveles de estos transportadores de hierro con los estadios de Braak (Figura 26). Los resultados indican, además, que la relación entre los marcadores de la EA, A $\beta$  y Tau, y las proteínas transportadoras de hierro, FPN y HPC, varía según la región cerebral. Las diferencias observadas entre las regiones sugieren que la progresión de la EA y la regulación del hierro no son uniformes en todo el cerebro. Así, se encontró una correlación entre la FPN y el A $\beta$  y Tau, así como entre la HPC y estos marcadores patológicos en la CA1 y en el PUT con la edad, lo que podría reflejar una mayor susceptibilidad de esta región a los cambios en el metabolismo del hierro y su impacto en la patología amiloide y Tau (Figura 26). Resultados similares se observaron para en el hipocampo según avanzaba la gravedad de la patología. Estos hallazgos implican que, si bien las alteraciones en el metabolismo del hierro pueden estar presentes en la EA, no necesariamente se alinean de manera simple con la progresión patológica descrita por las etapas de Braak, aunque si lo hacen con la edad de los pacientes, lo que hace pensar que otros factores, aparte del avance clásico de la patología, podrían influir en la regulación del hierro en el cerebro en el contexto de la EA.

Por último, y con el objetivo de confirmar la relación entre los transportadores de hierro y los marcadores típicos de la EA, se llevó a cabo una superposición de las imágenes de la localización del hierro y de FPN obtenidas con la LA-ICP-MS y de las IHQ realizadas para las proteínas Tau y A $\beta$  en la CA1 del hipocampo (Figura 27). Como se aprecia en las imágenes, las muestras de la materia gris cortical de la CA1 de individuos control exhiben niveles muy bajos o nulos de A $\beta$ , Tau y hierro sobre todo en las capas SO y SP. En la EA, como hemos visto anteriormente, se produce una acumulación significativa de hierro en la capa SMR, sin embargo, se observó un marcaje mínimo o nulo para Tau y A $\beta$  en la misma (Figura 27 a, b, e y f). En estas muestras, también se observaron cambios significativos en los niveles de hierro en todas las áreas analizadas, incluida aquella que ocupan las neuronas piramidales (SP), lo que coincide con la presencia de numerosas PS y numerosos ONF (Figura 27 f). Ya que los límites de la materia gris-blanca (SMR) coinciden con una señal alta de hierro, pero baja de los demás marcadores, tanto en controles como en EA, la acumulación del ion en esta región podría ser debida a factores como la alta actividad metabólica, o la presencia de BHE localizadas.



**Figura 27.-** Superposición de las imágenes de la localización del hierro (Fe) y de ferroportina (FPN) obtenidas con la LA-ICP-MS con las obtenidas por inmunohistoquímica clásica para Tau y A $\beta$  en una muestra control (**a, b, c, d**) (Donante #3) y otra de EA (**e, f, g, h**) (Donante #8). (**a**) Tau + Fe; (**b**) A $\beta$ +Fe; (**c**) Tau + FPN; (**d**) A $\beta$  + FPN de la muestra control (Donante #3). (**e**) Tau + Fe; (**f**) A $\beta$ +Fe; (**g**) Tau + FPN; (**h**) A $\beta$ + FPN de la muestra EA (Donante #8). Barra de calibración: 200  $\mu$ m.

De manera interesante, hemos visto que la mayor cantidad de A $\beta$  y Tau en la EA ocurre justamente en la capa de la materia gris cortical (SP) en la que se observa un mayor marcaje para la FPN (Figura 27 c, d y g, h), lo que sugiere un papel potencialmente protector o modulador de la FPN en el metabolismo del hierro en la EA.

En general, los resultados indican una diferencia clara en la distribución del hierro y de los marcadores patológicos entre las muestras de control y las de EA, específicamente en la región CA1 del hipocampo. En las muestras de control, se observaron niveles muy bajos o nulos de A $\beta$ , Tau y hierro, especialmente en las capas SO y SP. En las muestras de EA, aunque se detectó una acumulación significativa de hierro en la SMR, el marcaje para Tau y A $\beta$  fue mínimo en esa capa. Sin embargo, la capa SP presentó una notable colocalización de la FPN con A $\beta$  y Tau, a pesar de tener los niveles más bajos de hierro.

Aún hoy en día, sigue siendo un desafío para los investigadores determinar en qué medida los niveles elevados de hierro y otros metales depositados en el parénquima cerebral están relacionados con la formación y progresión de las PS y los ONF, o si por el contrario son procesos independientes y asociados a la progresión de la EA y/o al envejecimiento. Una gran cantidad de estudios han observado que tanto la RMN como el mapeo cuantitativo de susceptibilidad (QSM) pueden utilizarse para detectar cambios cerebrales tempranos en la sobreacumulación de hierro en regiones cerebrales subcorticales de personas con EA sintomática y asintomática (Lin et al. 2023; van Oostveen et al. 2021; Spotorno et al. 2020). Las técnicas basadas en RMN pueden medir el hierro en la materia blanca y gris cortical, y han resultado útiles para la clínica, pero difícilmente alcanzan un nivel de resolución lo suficientemente alto para ver la colocalización del hierro y la lesiones de la EA (McAllum et al. 2020). La QSM, aunque se considera más sensible para realizar medidas de hierro cortical en el estudio de las ENs, tampoco es demasiado específica (Gong et al. 2019; Nikparast et al. 2022). Su mayor ventaja radica en la posibilidad de poder asociar el hierro con el marcaje de las proteínas relacionadas con la neurodegeneración de la EA. Existe cierta evidencia *in vivo* de una asociación entre la deposición de hierro, la agregación de Tau y la neurodegeneración (Spotorno et al. 2020). De hecho, se ha encontrado una fuerte relación entre la acumulación de hierro relacionada con la edad y la PET de Tau en los ganglios basales, pero los datos encontrados en la corteza cerebral son inconsistentes (Cogswell and Fan 2023). Las relaciones QSM entre el hierro y el amiloide en áreas corticales han sido mucho más variables en la literatura previa. Algunos estudios encontraron correlaciones positivas entre susceptibilidad al hierro y el PET de amiloide en la corteza

frontotemporal (Ayton et al. 2017; Spotorno et al. 2020), mientras que otros no encontraron relaciones significativas (Cogswell et al. 2021). La limitación de esta técnica radica en que tanto el amiloide acumulado como la agregación de Tau en la corteza, pueden causar una señal QSM que se opone a la del hierro colocalizado en la EA (Cogswell and Fan 2023; Gong et al. 2019). Aunque se ha demostrado que el hierro se encuentra en PS y en asociación con la neurodegeneración, su cantidad es insuficiente para detectarlo de manera fiable en la corteza mediante esta metodología (Cogswell et al. 2021). Como decimos, las PS pueden reducir el contraste y, por tanto, la detección del hierro, especialmente en el cerebro humano; podría haber una gran carga de hierro alrededor de las PS, pero no se detectaría. Se hacen necesario más estudios para perfeccionar las técnicas QSM de forma que se generen nuevos marcadores basados en la susceptibilidad magnética para proteínas agregadas y hierro asociado (Gong et al. 2019).

En nuestras muestras y con la técnica LA-ICP-MS, hemos observado que el área de las neuronas piramidales en la EA, a pesar de la presencia de PS concentradas y numerosos ONF, cuenta con la menor cantidad de hierro de todas capas del CA1. Resulta extraña esta observación, ya que se esperaría encontrar mucho más hierro si lo consideramos implicado en la neurodegeneración y el depósito de amiloide.

Existe evidencia citohistológica limitada (con resolución a nivel celular) sobre la acumulación de hierro en PS y ONF. En muchas de las publicaciones, las imágenes obtenidas no son concluyentes, posiblemente debido al escaso contenido de hierro en estas áreas específicas, cómo hemos podido comprobar mediante la técnica de Perls y con la LA-ICP-MS (Cogswell et al. 2021; Cogswell and Fan 2023). Se ha descrito que el hierro normalmente se deposita dentro y alrededor de las PS mientras que solo se encontró una asociación limitada con los ONF (Connor et al. 1992; Falangola et al. 2005; Meguro et al. 2008; Nikparast et al. 2022). Plasencia-Villa y colaboradores, mediante un conjunto de técnicas avanzadas de microscopía electrónica analítica, han podido identificar y cuantificar las cantidades de algunos iones metálicos como el hierro, cobre y zinc presentes en el *core* de las PS. Así, observaron que el cobre y el zinc estaban directamente asociados con las fibras de A $\beta$ , mientras que la mayor parte del hierro era independiente de las fibras y se almacenaba en forma de nanopartículas de óxido de hierro altamente estructuradas y cristalinas (magnetita) (Plasencia-Villa et al. 2016). Estos autores han propuesto a éste como un posible mecanismo que presentarían las neuronas asociadas a las PS para mitigar el aumento del estrés oxidativo y el desequilibrio de los metales cerebrales.

En la EA esporádica, así como en la familiar, el péptido A $\beta$  es propenso a la agregación y forma parte de las PS que se observan en el cerebro de estos pacientes. Clásicamente, se ha descrito que el hierro férrico está más asociado con las PS difusas, que históricamente se describen como estructuras patológicas en etapa temprana, mientras que el hierro más particulado y cristalino (como la magnetita) se encuentra comúnmente dentro de regiones densas y amorfas que son los “core” de PS (Telling et al. 2017). También se ha propuesto que la neurotoxicidad que surge de la agregación del hierro y el péptido A $\beta$  puede explicarse, en parte, por la capacidad de reducción del hierro que tiene el amiloide (Telling et al. 2017). Se cree que el hierro puede almacenarse dentro de estos agregados amiloides (Everett et al., 2014) promoviendo la toxicidad del péptido A $\beta$  (Liu et al., 2011). Estas observaciones son relevantes para la enfermedad, ya que el hierro se concentra en las PS. Más importante aún, se ha reportado que el aumento del contenido de hierro es anterior a la formación de PS en un modelo animal de EA, con lo que es un dato más a favor de que este ion puede tener un papel importante en la etiología de esta enfermedad (Hare et al., 2013). Aunque existe la teoría de que el hierro pueda promover el depósito del A $\beta$  en las PS, los vínculos entre este péptido y la patología de la EA aún no se comprenden completamente. Actualmente no se cree que las fibrillas de amiloide maduras que constituyen estas placas sean el principal agente citotóxico. Realmente existe fuerte evidencia, tanto *in vitro* como *in vivo*, de que los agregados A $\beta$  más tóxicos son especies pequeñas y solubles que preceden, pero también pueden acompañar, a la aparición de fibrillas maduras. Algunos datos apoyan la hipótesis de que el hierro retrasa la formación de agregados bien ordenados de A $\beta$ , y por tanto, redundaría en la toxicidad del A $\beta$  en la EA (Liu et al. 2011).

En nuestro trabajo quizás no hemos alcanzado el nivel de precisión necesario para colocalizar, intra o extracelularmente, el hierro con las proteínas de depósito, Tau y A $\beta$ . Sin embargo, podemos afirmar que las áreas con máximos niveles de hierro y de gran cantidad de PS u ONF, no coinciden. Además, las áreas de acumulación de Tau no se alinearon con las regiones con concentraciones más altas de del ion, sino que correspondieron a regiones con abundante FPN, presumiblemente situada a nivel neuronal ya que esta proteína ha sido localizada casi exclusivamente en estas células (Everett et al. 2014; Raha et al. 2013). En las muestras de individuos control, la materia gris cortical del área CA1 del hipocampo mostró una tinción baja para A $\beta$ , Tau y hierro en las capas SO y SP, pero los niveles de FPN fueron notablemente elevados. A medida que avanzaba la EA, el marcaje de A $\beta$  y Tau se intensificaba en estas capas, mientras que los niveles de la FPN solo aumentaban levemente. En la capa SMR, con una presencia sustancial de fibras de mielina, se observó un marcaje mínimo o nulo

para Tau o A $\beta$ , pero se distinguió una acumulación significativa de hierro tanto en los casos de individuos control como en los de EA. Como se mencionó anteriormente, los límites de la materia gris-blanca coincidieron con niveles elevados de hierro, pero niveles disminuidos de la FPN.

El estudio de otras proteínas transportadoras de hierro como la Ft y la Tf demostró que ambas están alteradas en las proximidades de las PS y, en el caso de la Tf, también en la sustancia blanca de la corteza cerebral. La reacción difusa de la Tf observada alrededor de las PS y así como la del con hierro indicarían una naturaleza extracelular, lo que implica extravasación. La inmunotinción fuerte y atípica de la Ft observada a lo largo de los vasos sanguíneos en el tejido cerebral de pacientes con EA proporciona evidencias que respaldan la hipótesis de que el transporte del hierro al cerebro está alterado en la patología (Connor et al., 1992a; Connor et al., 1992b). La disminución de los niveles de la Tf podría indicar un descenso de la movilidad y la posterior acumulación del hierro en el cerebro, que según nuestras observaciones ocurriría en las capas cercanas a los vasos sanguíneos subcorticales del hipocampo, pero también en los vasos del putamen. Tal disminución en la exportación de hierro, o en la limpieza del exceso del mismo, podría desempeñar un papel importante en la degeneración neuronal y en el aumento del daño peroxidativo que se sabe que ocurre en la EA.

Otra relación entre el hierro y el A $\beta$  viene de la mano de la proteína PPA. Se ha demostrado que la sPPA a través de un motivo REWEE en el dominio E2 estabiliza la FPN, en la membrana plasmática y, por lo tanto, estimula el eflujo de hierro. Esta actividad, junto con el hecho de que la transcripción de PPA contiene un IRE en su UTR 5', sugiere que, entre otras posibles funciones fisiológicas, la PPA desempeña un papel en la homeostasis del hierro celular. Esta premisa es consistente también con el hecho de que los motivos en el extremo C de sPPA (y no de sPPA $\beta$ ) se unen a Fe<sup>2+</sup>. En la medida en que sPPA estabiliza la FPN de membrana, se ha llegado a la conclusión de que sPPA desempeña un papel agonista en el tráfico de hierro en contraste con el papel antagonista que desempeña la HPC. Podría ser que la expresión constitutiva de PPA pueda estar respondiendo a niveles elevados de hierro en neuronas individuales, con el propósito de ayudar a la exportación de hierro por parte de la FPN a través de la membrana plasmática (Dlouhy et al. 2019). La expresión de PPA no cambia en el córtex de la EA, pero lo que sí se ha descrito, es que su capacidad ferrosidasa está deprimida en la patología (Hare et al., 2013). Esto podría entorpecer la salida de hierro mediada por la FPN y la entrada por Tf, lo que produciría retención de hierro en las células nerviosas. En este contexto, Tsatsanis y colaboradores demostraron que la PPA estabiliza la FPN en la membrana cuando existen

altas concentraciones de hierro, y de esta forma, el proceso amiloidogénico inhabilitaría la estabilización de FPN en la membrana, lo que alteraría la exportación del hierro (Tsatsanis, Wong, Gunn, Ayton, Bush, Devos, et al. 2020). El procesamiento de PPA por parte de la  $\beta$ -secretasa que ocurre en la EA podría promover indirectamente la ferroptosis, ya que se ha demostrado que es inducida por el agotamiento de FPN en células de neuroblastoma (Tsatsanis, Wong, Gunn, Ayton, Bush, Devos, et al. 2020).

El hierro también colocaliza con los ONF en la EA. Las fibrillas de Tau unirían hierro de una manera dependiente del estado redox celular, actuando como una fuente de ROS dentro de las neuronas (Ahmadi et al. 2017; Smith et al. 1997). El  $Fe^{3+}$ , pero no el  $Fe^{2+}$ , induce la agregación de Tau *in vitro*, agregación que nuevamente puede revertirse reduciendo el  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ . Sin embargo, el  $Fe^{2+}$  sería el causante de la hiperfosforilación de Tau (Hare et al. 2013; Wan et al. 2019). Aunque no existen pruebas directas, los niveles de Tau soluble se reducen en los cerebros con EA en comparación con los cerebros control, por tanto, el acúmulo de hierro podría resultar de la deposición de Tau en agregados insolubles durante el progreso de la enfermedad. Así mismo, la pérdida de Tau funcional podría perturbar aún más la exportación de hierro mediada por PPA, al restringir el transporte y la presentación de esta proteína en la superficie celular (Hare et al., 2013; Jakaria et al., 2021; Singh et al., 2014).

Por último, el supuesto papel del hierro en la patogénesis de la EA se ha revitalizado actualmente tras el descubrimiento de un mecanismo de muerte celular dependiente de este ion en el SNC, la ferroptosis. La ferroptosis es una forma única de muerte celular programada mediada por hierro, conservada evolutivamente entre los vertebrados. Este fenómeno depende del hierro intracelular, pero no de otros metales, y es morfológica, bioquímica y genéticamente distinta de la apoptosis, la necrosis y la autofagia. La muerte celular ferroptótica resulta de una desigualdad redox entre la producción de hidroperóxidos lipídicos inducida por el hierro y la acción de varias enzimas de defensa antioxidantes, principalmente la glutatión peroxidasa 4 (GPX4) que desintoxica los radicales libres y los productos de oxidación de lípidos (Jakaria et al. 2021). Si bien el hierro tiene un papel crucial en la muerte de las células ferroptóticas, esta muerte celular no se caracteriza por una elevación tóxica del ion. Así, según Dixon y colaboradores, el hierro lábil disponible dentro de la célula se libera incrementando la formación de ROS lipídicos tóxicos mediante dos mecanismos principales: la generación de ROS lipídicos a través de la reacción de Fenton y/o la dioxigenasa que contiene hierro y la lipooxigenasa, que, a su vez, cataliza la peroxidación de lípidos (Dixon et al. 2012). Por lo tanto,

parece que el hecho de que se produzca una elevación tóxica del hierro no es lo único necesario para la ferroptosis sino que, los niveles totales de hierro lábil dependen de otras variables homeostáticas celulares, y la muerte puede ser debida también a la susceptibilidad al mismo en las células afectadas (Dixon et al. 2012).

## 5.- DISCUSIÓN GENERAL

La acumulación de hierro es una característica común a varios tipos de patologías neurológicas, algunas de ellas neurodegenerativas como la EP, EA, la Esclerosis Múltiple (EM) y la enfermedad de Huntington (EH), pero también de otras situaciones como el cáncer, los accidentes cerebrovasculares y algunos desórdenes mentales. La diferencia entre ellas radica en la gravedad de la deposición del ion y las regiones anatómicas donde se éste se acumula (Lee and Kovacs 2024).

Durante años, se ha estudiado el papel de la deposición anormal del hierro en la patogénesis de la EA, considerada también una proteinopatía combinada de A $\beta$  y Tau, pero la solución a esta incógnita aún no se conoce. De hecho, hoy en día sigue sin darse respuesta algunas preguntas como: ¿Cuál es la causa del acumulo del hierro? o ¿es el hierro un impulsor o una consecuencia de esta patología proteica?

Para contestar a las cuestiones se ha de tener en cuenta que la homeostasis del hierro ya sea sistémica o cerebral, comprende la absorción, el almacenamiento y la excreción de este, todo bajo un estricto control (Kulaszyńska, Kwiatkowski, and Skonieczna-Żydecka 2024). La cantidad de hierro en el cerebro es bastante alta y además es más resistente a los cambios dietéticos que los tejidos periféricos, lo que induce a pensar que sus niveles están regulados por mecanismos homeostáticos propios del sistema nervioso (Ashraf, Clark, and So 2018).

El sistema celular y molecular de entrada del hierro al parénquima cerebral a través de la BHE, es decir atravesar de forma transcelular el endotelio, involucra a gran cantidad de proteínas de entrada (Tf, TfR, DMT1) y de salida (FPN) mediante un mecanismo bastante conocido (ver introducción). La entrada de hierro al cerebro también puede ocurrir a través de las células epiteliales del plexo coroideo al LCR y de éste al parénquima nervioso. A diferencia de la BHE, el plexo coroideo consta de capilares fenestrados por lo que el hierro puede cruzar el epitelio coroideo fácilmente para ingresar en los ventrículos, de forma semejante a cómo lo hace en el endotelio (Ashraf et al. 2018). Es importante enfatizar que no existe una barrera de difusión que separe el LCR ventricular del LI cerebral. Si bien se conoce bastante bien el mecanismo de la entrada de hierro de la sangre al cerebro, hay escasos datos sobre el transporte inverso desde el cerebro a la sangre, aunque se sabe que la Tf puede pasar a través de las vellosidades aracnoideas y la placa cribiforme hacia las venas para ingresar en la circulación sistémica (Johansson et al. 2008). El reciente descubrimiento del sistema glinfático, un sistema “linfático” en el cerebro, puede ser una de las rutas por las cuales los

metales de transición, incluido el hierro, se transportan y eliminan del cerebro, a través de un flujo convectivo masivo de LI, posiblemente ayudado por el canal acuaporina-4 de los astrocitos (Bohr et al. 2022; Toriello et al. 2021).

La discordancia entre el flujo de entrada y salida del hierro del cerebro podría provocar una acumulación excesiva del mismo, que por lo que sabemos, es una característica común en muchas ENs, pero también del proceso de envejecimiento fisiológico. De hecho, los estudios revelan una conexión significativa entre la disfunción de la BHE, los trastornos metabólicos y el avance de la EA. Durante el envejecimiento y, especialmente en la EA, se han observado daños en la BHE, tales como la degeneración de los pericitos, daño en las células endoteliales, despolarización de los astrocitos, disminución de la integridad de las uniones estrechas del endotelio y desorganización de la membrana basal (Bandyopadhyay 2021; Rius-Pérez et al. 2018). Por otra parte, el LCR e incluso el sistema glinfático, que es la ruta principal para la exportación de hierro desde el cerebro a la sangre desde el espacio subaracnoideo, puede también verse afectado con la edad (Rasmussen et al. 2018).

En base a esto, podríamos proponer que, si la funcionalidad de la BHE está disminuida, es posible que la mayor cantidad de hierro que entra en el parénquima nervioso salga de forma más lenta por el sistema de exportación/limpieza, lo que haría que se acumulara en aquellas áreas donde fuese mayor el daño vascular. En este sentido, se ha descrito que la Tf es muy baja en el LCR, por lo que la exportación de hierro del cerebro a la sangre es limitada. Algunas otras proteínas que almacenan hierro, como la lactoferrina o la Ft pueden ayudar a la exportación del ion, pero la función de estas proteínas también se ve afectada por algunas condiciones patológicas, como la EA (Wang et al. 2019).

De forma breve, en humanos la deposición total de hierro se correlaciona positivamente con la edad, encontrándose los mayores niveles en los ganglios basales, incluidos el PUT, el GB y la sustancia negra; mientras que las concentraciones más bajas se observan en la corteza cerebral, el tronco del encéfalo y cerebelo (Connor et al. 1992; Ramos et al. 2014; Zecca et al. 2004). En los cerebros afectados por la EA, el nivel elevado de hierro afecta también a varias áreas que incluyen la cortezas frontal, temporal, parietal, occipital, insular y cingulada. En las regiones subcorticales, el hierro se localiza sobre todo en el núcleo caudado y el PUT, dónde una mayor carga del mismo se asocia estrechamente con la progresión de la enfermedad, definida por el deterioro cognitivo avanzado y la duración de la misma (Cogswell et al. 2021; Cogswell and Fan 2023; Tsatsanis et al. 2020). Nosotros hemos comprobado ese aumento de hierro en el área CA1 del hipocampo y en los ganglios basales de los pacientes con EA en relación con los controles. Al igual que ocurre con las proteínas A $\beta$  y Tau

en la EA, se ha descrito que el hierro se acumularía años antes del inicio clínico de la enfermedad y estaría relacionado con la edad del individuo (van Oostveen et al. 2021). En un futuro, sería interesante buscar marcadores de la disfunción vascular y linfática en las zonas perivasculares y periventriculares que apoyasen la teoría sobre este origen de los niveles incrementados de hierro en el envejecimiento y en la EA.

Debido al aumento progresivo del hierro en el parénquima nervioso, y posiblemente a otros cambios celulares y moleculares causados por el envejecimiento y la EA, el nivel intracelular del ion también puede verse afectado. Dado que la muerte neuronal es la causa primaria de la pérdida cognitiva en la EA, se ha puesto mucho énfasis en averiguar si ésta pudiese estar ocasionada por el exceso de hierro. En línea con esta suposición, se ha descubierto, recientemente, que la deposición intracelular de hierro y la posterior ferroptosis son un mecanismo potencial para la pérdida neuronal en muchas ENs (Wang et al., 2022). En los últimos años, se ha propuesto que el aumento del hierro neuronal sea consecuencia de un desbalance en los mecanismos transportadores. En este sentido, los niveles elevados de hierro en el envejecimiento y, particularmente en la EA, podrían explicarse mediante la “hipótesis de la ferroportina-hepcidina”, donde la unión de la HPC a la FPN daría como resultado un complejo sujeto a internalización y degradación lisosomal, lo que detendría la exportación de hierro y causaría la sobrecarga de este en las células. Sin embargo, de forma sorprendente se ha encontrado, tanto en cerebros humanos con EA como en modelos animales, que los niveles de ambas proteínas eran significativamente más bajos que los de los cerebros control (Raha et al. 2013, 2022) lo que ha sido explicado como el resultado de la internalización en el endosoma del complejo y su degradación.

Si tenemos en cuenta el papel del hierro sobre la expresión del gen de la HPC y la FPN, parece lógico esperar que el aumento de la cantidad de éste en las células nerviosas producido por la edad y la EA tuviese cierta influencia sobre la expresión de ambas moléculas, sobre todo la FPN, como parte de un mecanismo de respuesta celular de defensa frente al exceso del ion. Nuestros datos han mostrado niveles crecientes de la FPN y niveles estables de la HPC durante el envejecimiento y la EA. Esto sugiere que no hay una regulación negativa del exportador, sino más bien una regulación al alza. Consideramos que esto refleja la capacidad de las células nerviosas para intentar evitar el aumento de hierro intracelular, posiblemente causado por un mayor influjo del ion a través de otros transportadores. Sin embargo, se ha descrito que la disponibilidad de hierro férrico, tanto dentro como fuera de la célula, no tiene un efecto directo sobre la estabilidad de la proteína FPN, lo que destaca la importancia de otros mecanismos reguladores adicionales a nivel transcripcional y

postranscripcional (Link et al. 2021). En otras palabras, las células podrían estar reaccionando a los altos niveles del hierro aumentando su exportación mediante la síntesis de más FPN, mientras toleran el hierro guardado de forma intracelular y extracelular (LeVine 2024).

Resulta evidente que, como se ha comentado, la HPC pueda tener también un papel crucial en la cantidad de hierro intracelular, ya que es capaz de unirse a la FPN para bloquear la salida del ion de la célula. Los estudios sobre la HPC sugieren que existen dos fuentes en el cerebro; una local y otra proveniente de la circulación (Billesbølle et al. 2020; Fleszar et al. 2019; Ganz 2019).

La fuente local más importante de HPC la constituyen las células gliales, las cuales podrían influir en la homeostasis del hierro neuronal (Vela 2018). Efectivamente, en nuestras observaciones hemos visto que son las células de microglía y algunos astrocitos, las que mayor cantidad de HPC poseen. Se sabe poco sobre los mediadores moleculares de la expresión local de HPC. Por un lado, se ha demostrado que la inflamación y el exceso de hierro inducen su expresión en el cerebro pero, por otro lado, también se ha cuestionado que la HPC tenga un papel importante en la homeostasis de este ion, ya que los modelos *knock out* de HPC en condiciones basales no muestran una sobrecarga cerebral significativa del mismo (Kim et al. 2014). Debido a las aparentes contradicciones, se ha hipotetizado entonces un papel dual para la HPC. Ante señales inflamatorias se induciría una mayor importación y secuestro celular de hierro, pero aumentaría también la expresión de HPC en el cerebro. La acción de las moléculas inflamatorias se sumaría al efecto de la HPC al bloquear la exportación de hierro y empeoraría aún más la sobrecarga del ion observada en las neuronas. Cuando no hay inflamación, la HPC protegería de la sobrecarga de hierro debido a su papel en la reducción de la entrada de hierro y la salida de las neuronas (Vela 2018). Se considera que la EA es una patología con fuerte componente inflamatorio y mayor cantidad de hierro, por lo que, según esta teoría, la HPC empeoraría la situación de estrés oxidativo debido a esta situación. Se considera que la EA es una patología con fuerte componente inflamatorio y mayor cantidad de hierro, por lo que, según esta teoría, la HPC empeoraría la situación de estrés oxidativo. No obstante, trabajos recientes consideran que la HPC es una molécula con propiedades antiinflamatoria en los macrófagos. Bajo esta hipótesis se ha visto un papel antiinflamatorio de la HPC en los astrocitos y la microglía activados por A $\beta$ , y también un papel protector en las neuronas debido a la capacidad de reducir la señalización inflamatoria en células pretratadas (Urrutia et al. 2017).

Otra cuestión que es necesario dilucidar es el motivo por el cual algunas regiones del cerebro muestran diferente vulnerabilidad para acumular hierro en la EA lo cual coincide, como hemos visto,

con el comportamiento de las proteínas de depósito A $\beta$  y Tau (Braak & Braak, 1997). Recordemos que, generalmente y aunque se propagan conjuntamente a lo largo de la progresión de la enfermedad, la molécula más temprana en depositarse es el péptido A $\beta$  y posteriormente aparece Tau (Lv et al. 2017); la primera aparece inicialmente en las isocortezas y la segunda en la CENT. La patología A $\beta$  afecta progresivamente al hipocampo, la CENT, los ganglios basales y el diencefalo, el tronco del encéfalo y el cerebelo, mientras que la patología de Tau afecta a la CENT, las circunvoluciones temporales inferior y media y la corteza occipital (Braak & Braak, 1991; Braak & Braak, 1997). Los estudios post-mortem y de RMN que evalúan la carga patológica de hierro y las proteínas depositadas, revelan diferentes asociaciones con A $\beta$  y Tau (Ayton et al. 2017; Bulk et al. 2018; Gong et al. 2019).

En el contexto de la propagación de la patología proteica a lo largo de la progresión de la EA, la acumulación de hierro parece estar más estrechamente asociada con la deposición de Tau y los cambios estructurales del cerebro (atrofia) que con la deposición de A $\beta$ , tanto en términos temporales como en cantidad (Lee and Kovacs 2024). En este sentido, y para explicar las relaciones entre la acumulación de hierro y la patología proteica en la EA se han propuesto varias hipótesis (Lee and Kovacs 2024): (1) que el hierro es una consecuencia de la alteración patológica en las proteínas, (2) que el hierro promueve la patología proteica, y (3) que el desbalance del hierro es un fenómeno convergente o paralelo a la acumulación de proteínas.

En cuanto a la primera hipótesis, que el hierro es una consecuencia de la alteración patológica de las proteínas en la EA (*downstream role*), la bibliografía consultada coincide en la idea de que la PPA participa de forma fisiológica en la homeostasis celular del hierro al estabilizar la FPN en la membrana celular y facilitar la salida del mismo; su papel como ferroxidasa es un tema controvertido (Lee and Kovacs 2024).

Según esta teoría, las alteraciones de la PPA pueden inducir alteraciones de la homeostasis del hierro en las neuronas. Así, se ha demostrado la estabilización de PPA-FPN está mediada por Tau, que actúa como transportadora de PPA a la membrana celular (Wang et al. 2022). Según esto las neuronas de los cerebros afectados por taupatías serían más vulnerables a la toxicidad inducida por el hierro, sin embargo, todavía no hay evidencia directa que respalde la desregulación de este ion inducida por la agregación de Tau en estos casos (Ahmadi et al. 2017; Wakasaya et al. 2011; Wang et al. 2022; Yamamoto et al. 2002).

Los astrocitos, por su parte, serían más vulnerables a los depósitos extracelulares de A $\beta$ , provocando una desregulación de la entrada del hierro a través de la BHE (Li et al. 2011; Xu et al. 2020; Zhang et al. 2021). Tanto en células como en cerebros afectados por EA, este mecanismo puede estar exacerbado debido al secuestro de hierro extracelular por las placas A $\beta$ , provocando una escasez del ion disponible, lo cual sería una señal para su absorción por parte de los astrocitos en la BHE, aumentando así la carga local de hierro (Zhang et al. 2015, 2021). El péptido A $\beta$  también induciría cambios en la microglía, que junto con la exposición al interferón, conduciría a la conversión microglial en un fenotipo inflamatorio (Tang and Le 2016).

En este contexto, existe también interés en determinar si el acoplamiento de iones metálicos a los constituyentes proteicos de las lesiones en la EA se debe a su propia naturaleza o si es una consecuencia de la modificación de estas proteínas por mediadores del estrés oxidativo, como son los productos finales de la glicación avanzada o los aldehídos derivados de la lipoxidación como el hidroxinonenal (HNE) (Sayre et al. 2000; Smith et al. 1997). Se ha visto que la modificación por glicación, aumenta el potencial de unión de metales a las cadenas laterales de dichas proteínas de forma extracelular (Sayre et al. 2000).

En esta teoría se está suponiendo que la presencia de hierro en las lesiones de la EA está ligada de forma principal a las proteínas mal plegadas. Sin embargo, el cerebro tiene mecanismos para neutralizar el hierro activo tanto intracelular como extracelularmente a través de la Ft (Pérez et al. 1998; Quintana et al. 2006; Quintana and Gutiérrez 2010). La función fisiológica de la Ft es proteger a las células del hierro redox activo (Fe<sup>2+</sup>). En condiciones normales, la respuesta a un aumento en la producción de hierro Fe<sup>3+</sup>, tanto intra como extracelularmente, es la rápida absorción de hierro en los núcleos de Ft preexistentes. Si se produce un fallo en el secuestro de hierro, el resultado es estrés oxidativo inducido por el hierro ferroso Fe<sup>2+</sup>. Se ha demostrado que en las lesiones de EA también aparece la Ft de forma sistemática, localizada en la periferia y en el corazón de las PS intercalada entre las fibrillas de A $\beta$  pero no en los ONF (Quintana and Gutiérrez 2010). Se ha descrito que la Ft fisiológica se presenta como óxido de hierro férrico hexagonal (ferrihidrita), mientras que en las fases principales de la EA cerebral la Ft patológica adopta la forma de dos óxidos de hierro férrico-ferroso cúbicos mixtos, magnetita y wüstita (Quintana et al. 2006). La presencia adicional de Hs en la EA sería un argumento a favor de esta hipótesis, ya que se considera que el Hs es un producto de degradación del Ft (Quintana et al. 2006; Quintana and Gutiérrez 2010). En la actualidad se ha propuesto que dentro de las placas existiría una interacción A $\beta$ /Ft lo que ha sido observado en el

modelo animal PPA/PS1 de EA, en tejido humano y en los corazones aislados de PS (Everett et al. 2020; Telling et al. 2017). Dada la abundancia de Ft en todo el cerebro humano y la capacidad del A $\beta$  para crear un entorno en el que la Ft se reduce químicamente, lo que podría conducir a la producción sostenida de un exceso de ROS y, por lo tanto, al estrés oxidativo en los tejidos con EA (Everett et al. 2020). Por otra parte se ha descrito la presencia de Ft junto a los filamentos Tau, lo que ha sido interpretado por distintos autores como un intento de la célula para neutralizar el hierro unido a los filamentos de Tau para eliminar el metal tóxico (Pérez et al. 1998).

En lo que respecta a la segunda hipótesis, que el hierro promueve la patología proteica (*upstream role*), parece que las alteraciones en la homeostasis de este ion serían uno de los factores clave en la deposición de A $\beta$ . Así como la PPA contribuye a la regulación del hierro, éste a su vez regula la expresión de PPA a través de la interacción entre IRP/IRE. Una alta concentración intracelular de hierro mejora la interacción de IRP/IRE, lo que induce la regulación positiva de la PPA. La PPA regulada al alza se escinde por la acción de la  $\beta$ -secretasa a A $\beta$ 40/42, acelerando su deposición. Mientras tanto, la PPA ya no puede ayudar a la FPN, lo que resulta en un eflujo de hierro deteriorado y una deposición agravada (Wang et al. 2022).

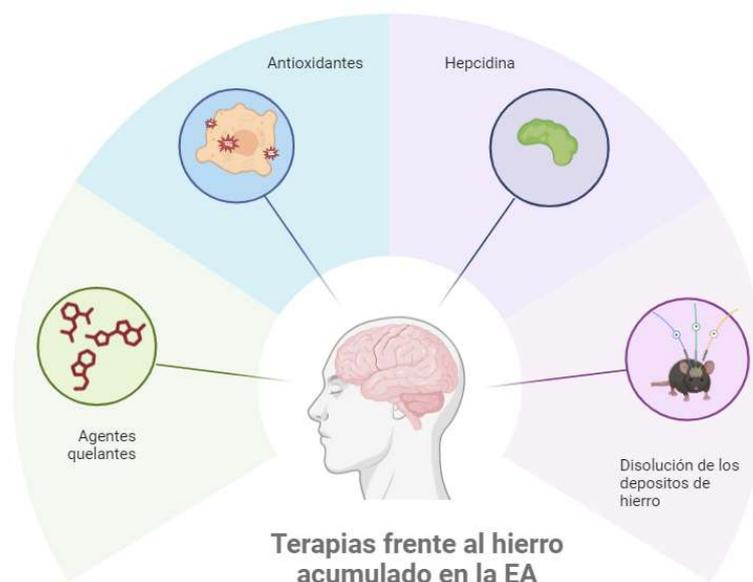
Algunos investigadores han propuesto incluso que el A $\beta$  no es tóxico en ausencia de metales redox, y que su agregación requiere la participación de dichos metales (Li et al. 2014; Plascencia-Villa et al. 2016; Tsatsanis, Wong, Gunn, Ayton, Bush, and Duce 2020). El A $\beta$  soluble se uniría a Fe<sup>3+</sup> cuando aumenta el hierro extracelular, para eliminar su exceso, pero es difícil disociarlos después de que interactúan. El hierro liberado de las células durante la patología permitía que el A $\beta$  se deposite más fácil y rápidamente, formando más PS (Ha, Ryu, and Chan 2007). De hecho, algunos investigadores creen que la deposición de este ion debería incluirse en la “hipótesis de la cascada del A $\beta$ ” de la EA. La colocalización observada entre el hierro y las placas de A $\beta$  a nivel celular sería una prueba que apoyaría esta idea (Chourrout et al. 2023; Plascencia-Villa et al. 2016). Sin embargo, la participación del hierro en la oligomerización y fibrilación de A $\beta$  requiere un examen detenido, ya que mientras algunos estudios demuestran que este ion promueve la agregación de A $\beta$ , otros estudios indican que el hierro disminuye la formación de estructuras fibrilares de láminas  $\beta$  y produce una “cepa” diferente de A $\beta$  más tóxica (Chia et al. 2024).

Así mismo, se ha demostrado que el hierro también promueve la fosforilación y agregación de Tau, tanto en cultivos celulares como en modelos experimentales de EA (Wan et al. 2019). El ion ferroso y el férrico se unen a la proteína Tau produciendo cambios estructurales. Además, se especula que

los iones de hierro, particularmente el ferroso, median las interacciones Tau-Tau, lo que resulta en la dimerización y agregación de la proteína (Ahmadi et al. 2017; Yamamoto et al. 2002). De hecho, para estos autores, las interacciones de la Tau con los metales no están mediadas por la fosforilación, lo que debilita la hipótesis de que el hierro se acumula como resultado de la formación de ONF, pero no es la causa de la formación.

Por último, y en lo que se refiere a la tercera hipótesis, que la homeostasis del hierro y la acumulación de proteínas son vías paralelas y convergentes, se ha descrito que existen correlaciones entre este ion y las funciones cognitivas en diferentes regiones del cerebro con EA, incluso en ausencia de un aumento significativo de los niveles de hierro y en etapas patológicas bajas en proteínas (Chen et al. 2021; Cogswell and Fan 2023). La falta de correlación (o correlación negativa) entre los niveles regionales de hierro y A $\beta$  en las observaciones de RMN de los pacientes de EA sugieren que la deposición del ion puede no tener una relación lineal con la del péptido en la progresión de la EA. Estos datos, junto con la falta de estudios funcionales que respalden la desregulación del hierro inducida por A $\beta$ , podrían interpretarse como que ambas deposiciones, de A $\beta$  y de hierro, son independientes (Chen et al. 2021; Cogswell et al. 2021; Lv et al. 2017).

Se ha hipotetizado, entonces, un papel adicional del hierro como efector de la neurodegeneración, actuando independientemente de las patologías Tau o amiloide. El nivel de este ion en el tejido es un rasgo que dictaría la probabilidad de neurodegeneración en la EA por ferroptosis (Ayton et al. 2021; Wang et al. 2022).



**Ilustración 19.-** Tipos de terapias para luchar contra el depósito de hierro y las especies reactivas de oxígeno que se generan en el contexto de la enfermedad de Alzheimer. Creación propia con Biorender.com.

A medida que avanzamos con nuestro estudio, hemos ido haciéndonos una idea de cuáles son las incógnitas que sobre el papel del hierro faltan en el contexto de la EA y aunque el papel del hierro en la EA aún no ha sido completamente clarificado es indudable que la acumulación patológica progresiva de hierro en la EA está fuertemente asociada con el deterioro cognitivo. Esto lo convierte en una diana terapéutica potencialmente valiosa.

Hasta que comprendamos mejor las causas de esta acumulación de hierro y los mecanismos en los que podemos intervenir para detener su depósito, una estrategia factible podría ser su eliminación a nivel cerebral, ya sea de manera general o focalizada en áreas específicas. Esta intervención, realizada sin provocar una deficiencia sistémica de hierro, podría ofrecer beneficios terapéuticos significativos y es una línea de investigación muy interesante. Varios tipos de abordajes se están realizando en la actualidad (Ilustración 29). Entre los abordajes, destacan las terapias de quelación, que tienen como objetivo el secuestro del exceso global de hierro. Sin embargo, una limitación es la eliminación completa de las funciones del hierro sistémico que podría causar también resultados adversos.

Varios tipos de agentes quelantes se han probado en pacientes de EA y en modelos experimentales de esta patología con éxito bajo o moderado habiéndose probado que revierten en mayor o menor grado los déficits de memoria inducidos por hierro e inhiben el procesamiento amiloidogénico de la PPA y la agregación de A $\beta$  (Guo et al. 2013; Klopstock et al. 2019; McLachlan et al. 1991; Wang et al. 2023). Sin embargo, muchos requieren una inyección, lo que resulta incómodo y puede dificultar el cumplimiento del tratamiento. A pesar de los avances en la síntesis y administración de quelantes, el requisito principal de los quelantes sigue estando fuera del alcance terapéutico, los quelantes más eficaces (es decir, los que tienen una alta afinidad y especificidad por los metales de transición como el hierro y el cobre) son voluminosos e hidrófilos, lo que dificulta que atraviesen la BHE y limitan su alcance fisiológico. Además, los quelantes pequeños y lipofílicos, que pueden atravesar la pared defensiva del cerebro, pecan esencialmente por su sobreeficacia. Es decir, inducen toxicidad en las células al eliminar los metales de transición de las enzimas vitales de la célula (Bonda et al. 2012; Wang et al. 2023).

Debido a que para muchos quelantes existe la duda de si penetran por la BHE o cual es la eficacia de su entrada, otros estudios se han centrado en refinar la vía de administración de estos utilizando nanopartículas (NP). Se ha demostrado que la administración y el transporte de quelantes de hierro desde la sangre hasta el cerebro se puede mejorar encapsulándolos dentro de NP o uniéndolos covalentemente a sus superficies, y se ha demostrado su viabilidad en el tratamiento de la EA (Bonda

et al. 2012; Liu et al. 2010). Sin embargo, se necesitan más estudios para demostrar la eficacia y seguridad de los sistemas de nanopartículas quelantes de hierro para la administración al SNC y para evaluar su toxicidad con más detalle.

Además de los quelantes de hierro, se están realizando estudios para identificar opciones terapéuticas alternativas. Una vía terapéutica lucha contra el estrés oxidativo generado por el hierro en la EA a través de antioxidantes debido a su poder de reducir los ROS, la lipoperoxidación y la ferroptosis generados en la patología. Entre los antioxidantes estudiados destacan la vitamina C, la vitamina E, el selenio, la ferrostatina y el ácido  $\alpha$ -lipoico aunque sin resultados concluyentes (Wang et al. 2022). Otro grupo potencial de quelantes naturales del hierro en estudio, son la curcumina y los polifenoles, que también muestran efectos antioxidantes y antiinflamatorios que se juntarían a la quelación (Gucký and Hamuláková 2024).

Como ya ha sido comentado, la HPC es un péptido sistémico que puede reducir el transporte de hierro a través de la BHE y prevenir la sobrecarga de hierro en el cerebro (Nemeth and Ganz 2023). Algunos investigadores han propuesto que la terapia con HPC podría revertir la sobrecarga de hierro en el cerebro sobrecargado de hierro al inhibir las proteínas transportadoras de hierro, lo que se ha confirmado en experimentos con células y animales. De manera consistente, un estudio encontró que el tratamiento con adenovirus recombinante que porta el gen de la HPC redujo la retención de hierro y el estrés oxidativo en el cerebro (Gong et al. 2019; Xu et al. 2020). Basándose en estos estudios y explorando el potencial de la hepcidina para el tratamiento de la EA, la HPC se está investigando para utilizarla en estudios preclínicos.

Por otro lado, están los estudios basados en el intento de disolver los depósitos de óxido de hierro redox-activos, distintos de los iones de hierro lábiles celulares, que existen en forma de agregados proteicos insolubles y sus efectos neurotóxicos son continuos a través de la inducción de neuroinflamación. Los tratamiento de estimulación de protones en un modelo de ratón de EA demostraron una reducción de la deposición de hierro en las placas A $\beta$  y una mejora del deterioro cognitivo (Seo et al. 2021).

En un novedoso abordaje, se ha intentado la estimulación del campo eléctrico transcraneal sin contacto en el cerebro, sobre los depósitos de hierro tóxico en la estructura de fibrillas A $\beta$  o en la placa A $\beta$  en un modelo de ratón de EA. Los resultados previos sugieren una degradación efectiva de las fibrillas o placas amiloides unidas a magnetita en el cerebro con EA mediante el efecto electro-

Fenton de la magnetita sensibilizada por el campo eléctrico, lo que ofrece una posible opción de tratamiento electroquímico para la EA (Choi et al. 2023).



## 6.-CONCLUSIONES

1.- La detección de hierro a nivel cerebral es más sensible y precisa mediante la técnica analítica del LA-ICP-MS que mediante la técnica histoquímica de Perls.

2.- La cantidad de hierro se incrementa en la CA1 del hipocampo de los cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer, respecto a los individuos control, pero su distribución es diferente en las distintas capas que la conforman. Hay mayor cantidad de hierro en la zona de fibras que en la capa de células de piramidales. Además, no existe colocalización en CA1 entre las zonas con mayor cantidad de hierro y las que presentan mayor cantidad de ferroportina, que corresponde con la zona de neuronas piramidales.

3.- La expresión tanto de ferroportina como de hepcidina aumenta en todas las áreas estudiadas con la edad en la enfermedad de Alzheimer, aunque no presentan correlación significativa con los estadios de Braak.

4.- Los niveles de ferroportina y hepcidina se correlacionan de manera significativa a medida que avanza la edad en la EA en la CA1 del hipocampo y el putamen, pero no con las etapas de Braak. También se encontró una asociación entre los principales marcadores histopatológicos de la enfermedad, como son las placas de A $\beta$  y los ovillos de Tau, y la expresión de ferroportina y hepcidina en el hipocampo y putamen con la edad.

5.- Los hallazgos de este trabajo sugieren que, si bien las alteraciones en el metabolismo del hierro pueden estar presentes en la enfermedad de Alzheimer, no necesariamente se alinean de manera simple con la progresión patológica, lo que sugiere que otros factores, aparte del avance clásico de la patología, podrían influir en la regulación del hierro en este contexto.



## 7.- BIBLIOGRAFÍA

- Ahmadi, Soha, Iraklii I. Ebralidze, Zhe She, and Heinz Bernhard Kraatz. 2017. "Electrochemical Studies of Tau Protein-Iron Interactions—Potential Implications for Alzheimer's Disease." *Electrochimica Acta* 236:384–93.
- Allen. 2019. "Brain Map - Brain-Map.Org." *Allen Mouse Brain Atlas* Available from: <http://mouse.brain-map.org>.
- Alzheimer's and Dementia. 2021. *2021 Alzheimer's Disease Facts and Figures*. Vol. 17. John Wiley & Sons, Ltd.
- Anon. 2018. *World Alzheimer Report 2018 The State of the Art of Dementia Research: New Frontiers*.
- Aquino, Domenico, Alberto Bizzi, Marina Grisoli, Barbara Garavaglia, Maria Grazia Bruzzone, Nardo Nardocci, Mario Savoiaro, and Luisa Chiapparini. 2009. "Age-Related Iron Deposition in the Basal Ganglia: Quantitative Analysis in Healthy Subjects." *Radiology* 252(1):165–72.
- Arnsten, Amy F. T., Dibyadeep Datta, Kelly Del Tredici, and Heiko Braak. 2021. "Hypothesis: Tau Pathology Is an Initiating Factor in Sporadic Alzheimer's Disease." *Alzheimer's and Dementia* 17(1):115–24.
- Ashraf, Azhaar, Maryam Clark, and Po-wah Wah So. 2018. "The Aging of Iron Man." *Frontiers in Aging* 10(65):1–23.
- Ayers, Jacob I., Benoit I. Giasson, and David R. Borchelt. 2018. *Prion-like Spreading in Tauopathies*. Vol. 83. Biol Psychiatry.
- Ayton, Scott, Amir Fazlollahi, Pierrick Bourgeat, Parnesh Raniga, Amanda Ng, Yen Ying Lim, Ibrahima Diouf, Shawna Farquharson, Jurgen Fripp, David Ames, James Doecke, Patricia Desmond, Roger Ordidge, Colin L. Masters, Christopher C. Rowe, Paul Maruff, Victor L. Villemagne, Olivier Salvado, and Ashley I. Bush. 2017. "Cerebral Quantitative Susceptibility Mapping Predicts Amyloid- $\beta$ -Related Cognitive Decline." *Brain* 140(8):2112–19.
- Ayton, Scott, Stuart Portbury, Pawel Kalinowski, Puja Agarwal, Ibrahima Diouf, Julie A. Schneider, Martha Clare Morris, and Ashley I. Bush. 2021. "Regional Brain Iron Associated with Deterioration in Alzheimer's Disease: A Large Cohort Study and Theoretical Significance." *Alzheimer's and Dementia* 17(7):1244–56.
- Ayton, Scott, Yamin Wang, Ibrahima Diouf, Julie A. Schneider, John Brockman, Martha Clare Morris, and Ashley I. Bush. 2020. "Brain Iron Is Associated with Accelerated Cognitive Decline in People with Alzheimer Pathology." *Molecular Psychiatry* 25(11):2932–41.
- Bandyopadhyay, Sanghamitra. 2021. "Role of Neuron and Glia in Alzheimer's Disease and Associated Vascular Dysfunction." *Frontiers in Aging Neuroscience* 13(June):1–21.
- Bandyopadhyay, Sanghamitra, and Jack T. Rogers. 2014. "Alzheimer's Disease Therapeutics Targeted to the Control of Amyloid Precursor Protein Translation: Maintenance of Brain Iron Homeostasis." *Biochemical Pharmacology* 88(4):486–94.
- Bao, Wen Dai, Pei Pang, Xiao Ting Zhou, Fan Hu, Wan Xiong, Kai Chen, Jing Wang, Fudi Wang, Dong Xie, Ya Zhuo Hu, Zhi Tao Han, Hong Hong Zhang, Wang Xia Wang, Peter T. Nelson, Jian Guo Chen, Youming Lu, Heng Ye Man, Dan Liu, and Ling Qiang Zhu. 2021. "Loss of Ferroportin Induces Memory Impairment by Promoting Ferroptosis in Alzheimer's Disease." *Cell Death and Differentiation* 28(5):1548–62.
- De Barros, Amaury, Germain Arribarat, Jeanne Combis, Patrick Chaynes, and Patrice Péran. 2019. "Matching Ex Vivo MRI with Iron Histology: Pearls and Pitfalls." *Frontiers in Neuroanatomy* 13(July).
- Bautista, Chaveco, Frómeta Luna, Flora Iluminada, Babié Reyes, Belkis Estela, Ronda León, Mercedes Febronia, and Menéndez Franco. 2008. "Valor Utilitario Específico de La Técnica Modificada de Perls Para El Diagnóstico Anatomopatológico." *MEDISAN* 12(2).
- Billesbølle, Christian B., Caleigh M. Azumaya, Rachael C. Kretsch, Alexander S. Powers, Shane Gonen, Simon

- Schneider, Tara Arvedson, Ron O. Dror, Yifan Cheng, and Aashish Manglik. 2020. "Structure of Hepcidin-Bound Ferroportin Reveals Iron Homeostatic Mechanisms." *Nature* 586(7831):807–11.
- Blom, Elin S., Peter Holmans, Sampath Arepalli, Omanma Adighibe, Marian L. Hamshere, Margaret Gatz, Nancy L. Pedersen, A. L. Min. Bergem, Michael J. Owen, Paul Hollingworth, Alison Goate, Julie Williams, Lars Lannfelt, John Hardy, Fabienne Wavrant-De Vrièze, and Anna Glaser. 2008. "Does APOE Explain the Linkage of Alzheimer's Disease to Chromosome 19q13?" *American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics* 147(6):778–83.
- Boeve, Bradley F., Adam L. Boxer, Fiona Kumfor, Yolande Pijnenburg, and Jonathan D. Rohrer. 2022. "Advances and Controversies in Frontotemporal Dementia: Diagnosis, Biomarkers, and Therapeutic Considerations." *The Lancet Neurology* 21(3):258–72.
- Bohr, Tomas, Poul G. Hjorth, Sebastian C. Holst, Sabina Hrab, Vesa Kiviniemi, Tuomas Lilius, and Kent-andre Mardal. 2022. "The Glymphatic System: Current Understanding and Modeling." *IScience* 29(104987):1–33.
- Bonda, David J., Gang Liu, Ping Men, George Perry, Mark A. Smith, and Xiongwei Zhu. 2012. "Nanoparticle Delivery of Transition-Metal Chelators to the Brain: Oxidative Stress Will Never See It Coming! NIH Public Access." *CNS Neurol Disord Drug Targets* 11(1):81–85.
- Braak, H., and E. Braak. 1991. "Neuropathological Staging of Alzheimer-Related Changes." *Acta Neuropathologica* 82(4):239–59.
- Braak, Heiko, Irina Alafuzoff, Thomas Arzberger, Hans Kretschmar, and Kelly Del Tredici. 2006. "Staging of Alzheimer Disease-Associated Neurofibrillary Pathology Using Paraffin Sections and Immunocytochemistry." *Acta Neuropathologica* 112(4):389–404.
- Braak, Heiko, and Eva Braak. 1991. "Neuropathological Stageing of Alzheimer-Related Changes." *Acta Neuropathologica* 82:239–59.
- Braak, Heiko, and Eva Braak. 1995. "Staging of Alzheimer's Disease-Related Neurofibrillary Changes." *Neurobiology of Aging* 16(3):271–84.
- Braak, Heiko, and Eva Braak. 1997. "Diagnostic Criteria for Neuropathologic Assessment of Alzheimer's Disease." *Neurobiology of Aging* 18(4 SUPPL.):85–88.
- Breijyeh, Zeinab, and Rafik Karaman. 2020. "Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment." *Molecules* 25(24).
- Bulk, Marjolein, Walid M. Abdelmoula, Hanneke Geut, Wim Wiarda, Itamar Ronen, Jouke Dijkstra, Louise van der Weerd, Wico Breimer, Nikita Lebedev, Andrew Webb, Jelle J. Goeman, Roberta J. Ward, Martina Huber, Tjerk H. Oosterkamp, Lucia Bossoni, Walid M. Abdelmoula, Hanneke Geut, Wim Wiarda, Itamar Ronen, Jouke Dijkstra, and Louise van der Weerd. 2020. "Quantitative MRI and Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry Imaging of Iron in the Frontal Cortex of Healthy Controls and Alzheimer's Disease Patients." *NeuroImage* 215(1).
- Bulk, Marjolein, Walid M. Abdelmoula, Rob J. A. Nabuurs, Linda M. van der Graaf, Coen W. H. Mulders, Aat A. Mulder, Carolina R. Jost, Abraham J. Koster, Mark A. van Buchem, Remco Natté, Jouke Dijkstra, and Louise van der Weerd. 2018. "Postmortem MRI and Histology Demonstrate Differential Iron Accumulation and Cortical Myelin Organization in Early- and Late-Onset Alzheimer's Disease." *Neurobiology of Aging* 62:231–42.
- Chang, Yan-zhong. 2019. *Brain Iron Metabolism and CNS Diseases*. edited by Yan-Zhong Chang. Shijiazhuang, Hebei, China ISSN: Springer.
- Chaudhary, Suman, Ajay Ashok, Dallas McDonald, Aaron S. Wise, Alexander E. Kritikos, Neil A. Rana, Clifford V Harding, and Neena Singh. 2021. "Upregulation of Local Hepcidin Contributes to Iron Accumulation in Alzheimer's Disease Brains." *Journal of Alzheimer's Disease* 82(4):1487–97.

- Cheignon, C., M. Tomas, D. Bonnefont-Rousselot, P. Faller, C. Hureau, and F. Collin. 2018. "Oxidative Stress and the Amyloid Beta Peptide in Alzheimer's Disease." *Redox Biology* 14:450–64.
- Chen, Lin, Anja Soldan, Kenichi Oishi, Andreia Faria, Yuxin Zhu, Marilyn Albert, Peter C. M. van Zijl, and Xu Li. 2021. "Quantitative Susceptibility Mapping of Brain Iron and  $\beta$ -Amyloid in MRI and PET Relating to Cognitive Performance in Cognitively Normal Older Adults." *Radiology* 298(2):353–62.
- Chia, Sean, Rodrigo Lessa Cataldi, Francesco Simone Ruggeri, Ryan Limbocker, Itzel Condado-Morales, Katarina Pisani, Andrea Possenti, Sara Linse, Tuomas P. J. Knowles, Johnny Habchi, Benedetta Mannini, and Michele Vendruscolo. 2024. "A Relationship between the Structures and Neurotoxic Effects of A $\beta$  Oligomers Stabilized by Different Metal Ions." *ACS Chemical Neuroscience* 15(6):1125–34.
- Choi, Younshick, Won Seok Lee, Jaemeun Lee, Sun Hyun Park, Sunwoung Kim, Ki Hong Kim, Sua Park, Eun Ho Kim, and Jong Ki Kim. 2023. "Capacitive Electrode-Based Electric Field Treatments on Redox-Toxic Iron Deposits in Transgenic AD Mouse Models: The Electrochemical Targeting of Alzheimer's Disease Feasibility Study." *International Journal of Molecular Sciences* 24(11).
- Chourrout, Matthieu, Christophe Sandt, Timm Weitkamp, Tanja Dučić, David Meyronet, Thierry Baron, Jan Klohs, Nicolas Rama, Hervé Boutin, Shifali Singh, Cécile Olivier, Marlène Wiart, Emmanuel Brun, Sylvain Bohic, and Fabien Chauveau. 2023. "Virtual Histology of Alzheimer's Disease: Biometal Entrapment within Amyloid- $\beta$  Plaques Allows for Detection via X-Ray Phase-Contrast Imaging." *Acta Biomaterialia* 170:260–72.
- Cogswell, Petrice M., and Audrey P. Fan. 2023. "Multimodal Comparisons of QSM and PET in Neurodegeneration and Aging." *NeuroImage* 273(March):120068.
- Cogswell, Petrice M., Heather J. Wiste, Matthew L. Senjem, Jeffrey L. Gunter, Stephen D. Weigand, Christopher G. Schwarz, Arvin Arani, Terry M. Therneau, Val J. Lowe, David S. Knopman, Hugo Botha, Jonathan Graff-Radford, David T. Jones, Kejal Kantarci, Prashanthi Vemuri, Bradley F. Boeve, Michelle M. Mielke, Ronald C. Petersen, and Clifford R. Jack. 2021. "Associations of Quantitative Susceptibility Mapping with Alzheimer's Disease Clinical and Imaging Markers." *NeuroImage* 224(August 2020):117433.
- Conde, M. A., E. Navarro, and J. Olazarán. 2015. "Differential Etiopathogenic Diagnosis of Dementias: Alzheimer's Disease." *Medicine (Spain)* 11(72):4340–44.
- Connor, J R., S. L. Menzies, S. M. St. Martin, and E. J. Mufson. 1992. "A Histochemical Study of Iron, Transferrin, and Ferritin in Alzheimer's Diseased Brains." *Journal of Neuroscience Research* 31(1):75–83.
- Connor, J R, B. S. Snyder, J. L. Beard, R. E. Fine, and E. J. Mufson. 1992. "Regional Distribution of Iron and Iron-regulatory Proteins in the Brain in Aging and Alzheimer's Disease." *Journal of Neuroscience Research* 31(2):327–35.
- Cristóvão, Joana S., Renata Santos, and Cláudio M. Gomes. 2016. "Metals and Neuronal Metal Binding Proteins Implicated in Alzheimer's Disease." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016.
- Cruz-Alonso, María, Beatriz Fernandez, Montserrat García, Héctor González-Iglesias, and Rosario Pereiro. 2018. "Quantitative Imaging of Specific Proteins in the Human Retina by Laser Ablation ICPMS Using Bioconjugated Metal Nanoclusters as Labels." *Analytical Chemistry* 90(20):12145–51.
- Cruz-Alonso, María, Beatriz Fernandez, Ana Navarro, Susana Junceda, Aurora Astudillo, and Rosario Pereiro. 2019. "Laser Ablation ICP-MS for Simultaneous Quantitative Imaging of Iron and Ferroportin in Hippocampus of Human Brain Tissues with Alzheimer's Disease." *Talanta* 197:413–21.
- Derry, Paul J., Muralidhar L. Hegde, George R. Jackson, Rakez Kaye, James M. Tour, Ah Lim Tsai, Thomas A. Kent, and Ah-lim Tsai. 2020. "Revisiting the Intersection of Amyloid, Pathologically Modified Tau and Iron in Alzheimer's Disease from a Ferroptosis Perspective." *Progress in Neurobiology* 184(August 2019):101716.
- Devi, Gayatri. 2023. "The Tauopathies." Pp. 251–65 in *Handbook of Clinical Neurology*. Vol. 196. Elsevier B.V.

- Dixon, SJ, KM Lemberg, MR Lamprecht, R. Skouta, EM Zaitsev, CE Gleason, AM Patel, DN, Bauer, AJ, Cantley, Yang WS, B. Morrison, and BR Stockwell. 2012. "Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Non-Apoptotic Cell Death." *Cell* 149(5):1060–72.
- Dlouhy, Adrienne C., Danielle K. Bailey, Brittany L. Steimle, Haley V Parker, and Daniel J. Kosman. 2019. "Fluorescence Resonance Energy Transfer Links Membrane Ferroportin, Hephaestin but Not Ferroportin, Amyloid Precursor Protein Complex with Iron Efflux." *Journal of Biological Chemistry* 294(11):4202–14.
- Du, Fang, Zhong Ming Qian, Qianqian Luo, Wing Ho Yung, and Ya Ke. 2015. "Hepcidin Suppresses Brain Iron Accumulation by Downregulating Iron Transport Proteins in Iron-Overloaded Rats." *Molecular Neurobiology* 52(1):101–14.
- Dubois, Bruno, Howard H. Feldman, Claudia Jacova, Harald Hampel, José Luis Molinuevo, Kaj Blennow, Steven T. Dekosky, Serge Gauthier, Dennis Selkoe, Randall Bateman, Stefano Cappa, Sebastian Crutch, Sebastiaan Engelborghs, Giovanni B. Frisoni, Nick C. Fox, Douglas Galasko, Marie Odile Habert, Gregory A. Jicha, Agneta Nordberg, Florence Pasquier, Gil Rabinovici, Philippe Robert, Christopher Rowe, Stephen Salloway, Marie Sarazin, Stéphane Epelbaum, Leonardo C. de Souza, Bruno Vellas, Pieter J. Visser, Lon Schneider, Yaakov Stern, Philip Scheltens, and Jeffrey L. Cummings. 2014. "Advancing Research Diagnostic Criteria for Alzheimer's Disease: The IWG-2 Criteria." *The Lancet Neurology* 13(6):614–29.
- Duce, James A., Andrew Tsatsanis, Michael A. Cater, Simon A. James, Elysia Robb, Krutika Wikhe, Su Ling Leong, Keyla Perez, Timothy Johanssen, Mark A. Greenough, Hyun Hee Cho, Denise Galatis, Robert D. Moir, Colin L. Masters, Catriona McLean, Rudolph E. Tanzi, Roberto Cappai, Kevin J. Barnham, Giuseppe D. Ciccotosto, Jack T. Rogers, and Ashley I. Bush. 2010. "Iron-Export Ferroxidase Activity of  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein Is Inhibited by Zinc in Alzheimer's Disease." *Cell* 142(6):857–67.
- Van Duijn, Sara, Marjolein Bulk, Sjoerd G. Van Duinen, Rob J. A. Nabuurs, Mark A. Van Buchem, Louise Van Der Weerd, and Remco Natté. 2017. "Cortical Iron Reflects Severity of Alzheimer's Disease." *Journal of Alzheimer's Disease* 60(4):1533–45.
- Everett, J., E. Céspedes, L. R. Shelford, C. Exley, J. F. Collingwood, J. Dobson, G. Van Der Laan, C. A. Jenkins, E. Arenholz, and N. D. Telling. 2014. "Ferrous Iron Formation Following the Co-Aggregation of Ferric Iron and the Alzheimer's Disease Peptide  $\beta$ -Amyloid (1-42)." *Journal of the Royal Society Interface* 11(95).
- Everett, James, Jake Brooks, Frederik Lermyte, Peter B. O'Connor, Peter J. Sadler, Jon Dobson, Joanna F. Collingwood, and Neil D. Telling. 2020. "Iron Stored in Ferritin Is Chemically Reduced in the Presence of Aggregating A $\beta$  (1-42)." *Scientific Reports* 10(1):1–16.
- Falangola, Maria F., Sang Pil Lee, Ralph A. Nixon, Karen Duff, and Joseph A. Helpert. 2005. "Histological Co-Localization of Iron in A $\beta$  Plaques of PS/APP Transgenic Mice." *Neurochemical Research* 30(2):201–5.
- Ferreira, Sofia, Ana F. Raimundo, Regina Menezes, and Ivo C. Martins. 2021. "Islet Amyloid Polypeptide & Amyloid Beta Peptide Roles in Alzheimer's Disease: Two Triggers, One Disease Dementia and Amyloid Beta Peptide." *Neuronal Regeneratio Research* 16(6):1127–30.
- Fleszar, Mariusz G., Jerzy Wiśniewski, Izabela Berdowska, Bogdan Zieliński, Marzena Zboch, Dorota Diakowska, Andrzej Gamian, and Małgorzata Krzystek-Korpacka. 2019. "Systemic Hepcidin Quantified with LC-MS/MS in Dementia in Association with Disease Pathology and Severity and with Structural Changes in the Brain." *Peptides* 122(May):170169.
- Folstein, MF, SE Folstein, and PR McHugh. 1975. "'Mini-Mental State'. A Practical Method for Grading the Cognitive State of Patients for the Clinician." *Journal of Psychiatric Research* 12:189–98.
- Forrest, Shelley L., and Gabor G. Kovacs. 2023. "Current Concepts of Mixed Pathologies in Neurodegenerative Diseases." *Canadian Journal of Neurological Sciences* 50(3):329–45.
- Gammella, Elena, Margherita Correnti, Gaetano Cairo, and Stefania Recalcati. 2021. "Iron Availability in Tissue Microenvironment: The Key Role of Ferroportin." *International Journal of Molecular Sciences* 22(6):1–15.

- Ganz, Tomas. 2019. "The Discovery of the Iron-Regulatory Hormone Heparin." *Clinical Chemistry* 65(10):1330–31.
- Garre-Olmo, Josep. 2018. "Epidemiology of Alzheimer's Disease and Other Dementias." *Revista de Neurologia* 66(11):377–86.
- Gibbons, Garrett S., Virginia M. Y. Lee, and John Q. Trojanowski. 2019. "Mechanisms of Cell-to-Cell Transmission of Pathological Tau: A Review." *JAMA Neurology* 76(1):101–8.
- Ginzburg, Yelena Z. 2019. "Hepcidin-Ferroportin Axis in Health and Disease." Pp. 17–45 in *Vitamins and Hormones*. Vol. 110. Vitam Horm.
- Goedert, M., M. G. Spillantini, M. C. Potier, J. Ulrich<sup>1</sup>, and R. A. Crowther. 1989. "Cloning and Sequencing of the cDNA Encoding an Isoform of Microtubule-Associated Protein Tau Containing Four Tandem Repeats: Differential Expression of Tau Protein MRNAs in Human Brain." *The EMBO Journal* 8(2):393–99.
- Gong, Nan Jie, Russell Dibb, Marjolein Bulk, Louise van der Weerd, and Chunlei Liu. 2019. "Imaging Beta Amyloid Aggregation and Iron Accumulation in Alzheimer's Disease Using Quantitative Susceptibility Mapping MRI." *NeuroImage* 191(100):176–85.
- Graeber, Manuel B. 1999. "No Man Alone: The Rediscovery of Alois Alzheimer's Original Cases." *Brain Pathology* 9(2):237–40.
- Graham, Stewart F., Muhammad Bin Nasaruddin, Manus Carey, Christian Holscher, Bernadette McGuinness, Patrick G. Kehoe, Seth Love, Peter Passmore, Christopher T. Elliott, Andrew A. Meharg, and Brian D. Green. 2014. "Age-Associated Changes of Brain Copper, Iron, and Zinc in Alzheimer's Disease and Dementia with Lewy Bodies." *Journal of Alzheimer's Disease* 42(4):1407–13.
- Gravina, Stephen A., Libin Ho, Christopher B. Eckman, Kristin E. Long, Laszlo Otvos, L. H. Younkin, Nobuhiro Suzuki, and Steven G. Younkin. 1995. "Amyloid  $\beta$  Protein ( $A\beta$ ) in Alzheimer's Disease Brain. Biochemical and Immunocytochemical Analysis with Antibodies Specific for Forms Ending at  $A\beta_{40}$  or  $A\beta_{42(43)}$ ." *Journal of Biological Chemistry* 270(13):7013–16.
- Gucký, Adrián, and Slávka Hamuláková. 2024. "Targeting Biometals in Alzheimer's Disease with Metal Chelating Agents Including Coumarin Derivatives." *CNS Drugs* 38(7):507–32.
- Guimerà, Arantxa, Xavier Gironès, and Félix F. Cruz-sánchez. 2002. "Actualización Sobre La Patología de La Enfermedad de Alzheimer." *Revista Española de Patología* 35(October):21–48.
- Guo, Chuang, Tao Wang, Wei Zheng, Zhong Yan Shan, Wei Ping Teng, and Zhan You Wang. 2013. "Intranasal Deferoxamine Reverses Iron-Induced Memory Deficits and Inhibits Amyloidogenic APP Processing in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease." *Neurobiology of Aging* 34(2):562–75.
- Ha, Chanki, Jungki Ryu, and Beum Park Chan. 2007. "Metal Ions Differentially Influence the Aggregation and Deposition of Alzheimer's  $\beta$ -Amyloid on a Solid Template." *Biochemistry* 46(20):6118–25.
- Hadziahmetovic, Majda, Ying Song, Padmavathi Ponnuru, Jared Iacovelli, Allan Hunter, Nadine Haddad, John Beard, James R. Connor, Sophie Vaulont, and Joshua L. Dunaief. 2011. "Age-Dependent Retinal Iron Accumulation and Degeneration in Hepcidin Knockout Mice." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 52(1):109–18.
- Hardy, John A., and Gerald A. Higgins. 1992. "Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis." *Science* 256(5054):184–85.
- Hardy, John, and David Allsop. 1991. "Amyloid Deposition as the Central Event in the Aetiology of Alzheimer's Disease." *TIPS* 12.
- Hare, Dominic, Scott Ayton, Ashley Bush, and Peng Lei. 2013. "A Delicate Balance: Iron Metabolism and Diseases of the Brain." *Frontiers in Aging Neuroscience* 5(JUL).

- Hare, Dominic J., Erika P. Raven, Blaine R. Roberts, Mirjana Bogeski, Stuart D. Portbury, Catriona A. McLean, Colin L. Masters, James R. Connor, Ashley I. Bush, Peter J. Crouch, and Philip A. Doble. 2016. "Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry Imaging of White and Gray Matter Iron Distribution in Alzheimer's Disease Frontal Cortex." *NeuroImage* 137:124–31.
- Hofer, Tim, and George Perry. 2016. "Nucleic Acid Oxidative Damage in Alzheimer's Disease—Explained by the Hecpidin-Ferroportin Neuronal Iron Overload Hypothesis?" *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 38:1–9.
- Hyman, Bradley T., Creighton H. Phelps, Thomas G. Beach, Eileen H. Bigio, Nigel J. Cairns, Maria C. Carrillo, Dennis W. Dickson, Charles Duyckaerts, Matthew P. Frosch, Eliezer Masliah, Suzanne S. Mirra, Peter T. Nelson, Julie A. Schneider, Dietmar Rudolf Thal, Bill Thies, John Q. Trojanowski, Harry V. Vinters, and Thomas J. Montine. 2012. "National Institute on Aging-Alzheimer's Association Guidelines for the Neuropathologic Assessment of Alzheimer's Disease." *Alzheimer's and Dementia* 8(1):1–13.
- Iloff, Jeffrey J., Minghuan Wang, Yonghong Liao, Benjamin A. Plogg, Weiguo Peng, Georg A. Gundersen, Helene Benveniste, G. Edward Vates, Rashid Deane, Steven A. Goldman, Erlend A. Nagelhus, and Maiken Nedergaard. 2012. "A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid  $\beta$ ." *Science Translational Medicine* 4(147):147–111.
- Iloff, JJ, and M. Nedergaard. 2008. "Is There a Cerebral Lymphatic System?" *Stroke* 44(6):S93–95.
- Iov, Tatiana, Diana Bulgaru-Iliescu, Anton Knieling, Simona Irina Damian, and Laura Rîșcanu. 2019. "Macroscopic and Microscopic Diagnosis in Alzheimer's Disease." *Romanian Journal of Legal Medicine* 27(2):89–94.
- Jack, Clifford R., Marilyn S. Albert, David S. Knopman, Guy M. McKhann, Reisa A. Sperling, Maria C. Carrillo, Bill Thies, and Creighton H. Phelps. 2011. "Introduction to the Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association Workgroups on Diagnostic Guidelines for Alzheimer's Disease." *Alzheimer's and Dementia* 7(3):257–62.
- Jack, Clifford R., David A. Bennett, Kaj Blennow, Maria C. Carrillo, Billy Dunn, Samantha Budd Haeberlein, David M. Holtzman, William Jagust, Frank Jessen, Jason Karlawish, Enchi Liu, Jose Luis Molinuevo, Thomas Montine, Creighton Phelps, Katherine P. Rankin, Christopher C. Rowe, Philip Scheltens, Eric Siemers, Heather M. Snyder, Reisa Sperling, Cerise Elliott, Eliezer Masliah, Laurie Ryan, and Nina Silverberg. 2018. "NIA-AA Research Framework: Toward a Biological Definition of Alzheimer's Disease." *Alzheimer's and Dementia* 14(4):535–62.
- Jakaria, Md, Abdel Ali Belaidi, Ashley I. Bush, and Scott Ayton. 2021. "Ferroptosis as a Mechanism of Neurodegeneration in Alzheimer's Disease." *Journal of Neurochemistry* 159(5):804–25.
- Janeiro, MH, Carlos G. Ardanaz, Noemí Sola-Sevilla, JD Dong, M. Cortes-Erice, M. Solas, E. Puerta, and MJ Ramirez. 2021. "Biomarcadores En La Enfermedad de Alzheimer y Otras Demencias." *Advanced Lab Med* 2(1):39–50.
- Johansson, Pia A., Katarzyna M. Dziegielewska, Shane A. Liddelow, and Norman R. Saunders. 2008. "The Blood-CSF Barrier Explained: When Development Is Not Immaturity." *BioEssays* 30(3):237–48.
- Khachaturian, Zaven S. 2011. "Revised Criteria for Diagnosis of Alzheimer's Disease: National Institute on Aging-Alzheimer's Association Diagnostic Guidelines for Alzheimer's Disease." *Alzheimer's and Dementia* 7(3):253–56.
- Kiernan, J. A. 2008. *Histological and Histochemical Methods : Theory and Practice*. 4th ed. Oxfordshire: Scion.
- Kim, Airie, Eileen Fung, Sona G. Parikh, Erika V. Valore, Victoria Gabayan, Elizabeta Nemeth, and Tomas Ganz. 2014. "A Mouse Model of Anemia of Inflammation: Complex Pathogenesis with Partial Dependence on Hecpidin." *Blood* 123(8):1129–36.
- Klopstock, Thomas, Fernando Tricta, Lynne Neumayr, Ivan Karin, Giovanna Zorzi, Caroline Fradette, Tomasz

- Kmieć, Boriana Büchner, Hannah E. Steele, Rita Horvath, Patrick F. Chinnery, Anna Basu, Clemens Küpper, Christiane Neuhofer, Bernadette Kálmán, Petr Dušek, Zuhail Yapici, Ian Wilson, Feng Zhao, Federica Zibordi, Nardo Nardocci, Christine Aguilar, Susan J. Hayflick, Michael Spino, Andrew M. Blamire, Penelope Hogarth, and Elliott Vichinsky. 2019. "Safety and Efficacy of Deferiprone for Pantothenate Kinase-Associated Neurodegeneration: A Randomised, Double-Blind, Controlled Trial and an Open-Label Extension Study." *The Lancet Neurology* 18(7):631–42.
- Kulaszyńska, Monika, Sebastian Kwiatkowski, and Karolina Skonieczna-Żydecka. 2024. "The Iron Metabolism with a Specific Focus on the Functioning of the Nervous System." *Biomedicines* 12(3):1–17.
- De la Torre, J. C. 2002. "Vascular Basis of Alzheimer's Pathogenesis." Pp. 196–215 in *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol. 977. John Wiley & Sons, Ltd.
- De La Torre, J. C. 1999. "Critical Threshold Cerebral Hypoperfusion Causes Alzheimer's Disease?" *Acta Neuropathologica* 98(1):1–8.
- Lee, Seojin, and Gabor G. Kovacs. 2024. "The Irony of Iron: The Element with Diverse Influence on Neurodegenerative Diseases." *International Journal of Molecular Sciences* 25(8):4269.
- Lei, Peng, Scott Ayton, and Ashley I. Bush. 2021. "The Essential Elements of Alzheimer's Disease." *Journal of Biological Chemistry* 296:1–61.
- LeVine, Steven M. 2024. "Exploring Potential Mechanisms Accounting for Iron Accumulation in the Central Nervous System of Patients with Alzheimer's Disease." *Cells* 13(8).
- Li, Lin, C. Holscher, B. B. Chen, Z. F. Zhang, and Yue Ze Liu. 2011. "Hepcidin Treatment Modulates the Expression of Divalent Metal Transporter-1, Ceruloplasmin, and Ferroportin-1 in the Rat Cerebral Cortex and Hippocampus." *Biological Trace Element Research* 143(3):1581–93.
- Li, X., T. Q. Li, N. Andreasen, M. K. Wiberg, E. Westman, and L. O. Wahlund. 2014. "The Association between Biomarkers in Cerebrospinal Fluid and Structural Changes in the Brain in Patients with Alzheimer's Disease." *Journal of Internal Medicine* 275(4):418–27.
- Lin, Qixiang, Salman Shahid, Antoine Hone-Blanchet, Shuai Huang, Junjie Wu, Aditya Bisht, David Loring, Felicia Goldstein, Allan Levey, Bruce Crosson, James Lah, and Deqiang Qiu. 2023. "Magnetic Resonance Evidence of Increased Iron Content in Subcortical Brain Regions in Asymptomatic Alzheimer's Disease." *Human Brain Mapping* 44(8):3072–83.
- Link, Camille, Julia D. Knopf, Oriana Marques, Marius K. Lemberg, and U. Muckenthaler. 2021. "The Role of Cellular Iron Deficiency in Controlling Iron Export." *BBA - General Subjects* 1865(3):129829.
- Liu, B., Aileen Moloney, Sarah Meehan, Kyle Morris, Sally E. Thomas, Louise C. Serpell, Robert Hider, Stefan J. Marciniak, David A. Lomas, and Damian C. Crowther. 2011. "Iron Promotes the Toxicity of Amyloid B Peptide by Impeding Its Ordered Aggregation." *The Journal of Biological Chemistry* 286(6):4248–56.
- Liu, Gang, Ping Men, George Perry, and Mark A. Smith. 2010. "Nanoparticle and Iron Chelators as a Potential Novel Alzheimer Therapy." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 610:123–44.
- Liu, Jun Lin, Yong Gang Fan, Zheng Sheng Yang, Zhan You Wang, and Chuang Guo. 2018. "Iron and Alzheimer's Disease: From Pathogenesis to Therapeutic Implications." *Frontiers in Neuroscience* 12(SEP).
- Liu, Pei Pei, Yi Xie, Xiao Yan Meng, and Jian Sheng Kang. 2019. "History and Progress of Hypotheses and Clinical Trials for Alzheimer's Disease." *Signal Transduction and Targeted Therapy* 4(1).
- Livingston, Gill, Jonathan Huntley, Andrew Sommerlad, David Ames, Clive Ballard, Sube Banerjee, Carol Brayne, Alistair Burns, Jiska Cohen-mansfield, Claudia Cooper, Sergi G. Costafreda, Amit Dias, Nick Fox, Laura N. Gitlin, Robert Howard, Helen C. Kales, Mika Kivimäki, Eric B. Larson, Adesola Ogunniyi, Vasiliki Orgeta, Karen Ritchie, Kenneth Rockwood, Elizabeth L. Sampson, Quincy Samus, and Lon S. Schneider. 2020. "Dementia Prevention, Intervention, and Care: 2020 Report of the Lancet Commission." *The*

*Lancet Commissions* 396:413–46.

- Lu, Li Na, Zhong Ming Qian, Ka Chun Wu, Wing Ho Yung, and Ya Ke. 2017. “Expression of Iron Transporters and Pathological Hallmarks of Parkinson’s and Alzheimer’s Diseases in the Brain of Young, Adult, and Aged Rats.” *Molecular Neurobiology* 54(7):5213–24.
- Lv, Zhong Yue, Chen Chen Tan, Jin Tai Yu, and Lan Tan. 2017. “Spreading of Pathology in Alzheimer’s Disease.” *Neurotoxicity Research* 32(4):707–22.
- Mackenzie, Ian R. A., Manuela Neumann, Eileen H. Bigio, Nigel J. Cairns, Irina Alafuzoff, Jillian Kril, Gabor G. Kovacs, Bernardino Ghetti, Glenda Halliday, Ida E. Holm, Paul G. Ince, Wouter Kamphorst, Tamas Revesz, Annemieke J. M. Rozemuller, Samir Kumar-Singh, Haruhiko Akiyama, Atik Baborie, Salvatore Spina, Dennis W. Dickson, John Q. Trojanowski, and David M. A. Mann. 2010. “Nomenclature and Nosology for Neuropathologic Subtypes of Frontotemporal Lobar Degeneration: An Update.” *Acta Neuropathologica* 119(1):1–4.
- Martín, Francisco Javier, and Pedro Gil. 2006. “Valoración Funcional En La Demencia Grave.” *Revista Espanola de Geriatria y Gerontologia* 41(SPEC. ISS. 1):43–49.
- Martínez-Tapia, Ricardo Jesús, Francisco Estrada-Rojo, Alonso Alejandro, Antonio Barajas-Martínez, Luis Arturo Flores-Avalos, Anahí Chavarría, and Luz Navarro. 2018. “Una Nueva Vía de Drenaje Cerebral: El Sistema Glinfático. Revisión Histórica y Conceptual.” *Revista Mexicana de Neurociencia* 19(1):104–16.
- Mayo Clinic. 2019. “Estadios Del Alzheimer: Cómo Avanza La Enfermedad.” *Mayoclinic*. Retrieved January 29, 2024 (<https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/alzheimers-disease/in-depth/alzheimers-stages/art-20048448>).
- McAllum, Erin J., Dominic J. Hare, Irene Volitakis, Catriona A. McLean, Ashley I. Bush, David I. Finkelstein, and Blaine R. Roberts. 2020. “Regional Iron Distribution and Soluble Ferroprotein Profiles in the Healthy Human Brain.” *Progress in Neurobiology* 186(December):101744.
- McKhann, Guy, David Drachman, Marshall Folstein, Robert Katzman, Donald Price, and Emanuel M. Stadlan. 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):939–44.
- McLachlan, D. R. C., T. P. A. Kruck, W. Kalow, D. F. Andrews, A. J. Dalton, M. Y. Bell, and W. L. Smith. 1991. “Intramuscular Desferrioxamine in Patients with Alzheimer’s Disease.” *The Lancet* 337(8753):1304–8.
- Meguro, Reiko, Yoshiya Asano, Hiroyasu Iwatsuki, and Kazuhiko Shoumura. 2003. “Perfusion-Perls and -Turnbull Methods Supplemented by DAB Intensification for Nonheme Iron Histochemistry: Demonstration of the Superior Sensitivity of the Methods in the Liver, Spleen, and Stomach of the Rat.” *Histochemistry and Cell Biology* 120(1):73–82.
- Meguro, Reiko, Yoshiya Asano, Saori Odagiri, Chengtai Li, Hiroyasu Iwatsuki, and Kazuhiko Shoumura. 2007. “Nonheme-Iron Histochemistry for Light and Electron Microscopy: A Historical, Theoretical and Technical Review.” *Archives of Histology and Cytology* 70(1):1–19.
- Meguro, Reiko, Yoshiya Asano, Saori Odagiri, Chengtai Li, and Kazuhiko Shoumura. 2008. “Cellular and Subcellular Localizations of Nonheme Ferric and Ferrous Iron in the Rat Brain: A Light and Electron Microscopic Study by the Perfusion-Perls and -Turnbull Methods.” *Archives of Histology and Cytology* 71(4):205–22.
- Meyron-Holtz, Esther G., Manik C. Ghosh, Kazuhiro Iwai, Timothy Lavaute, Xavier Brazzolotto, Urs V Berger, William Land, Hayden Ollivierre-Wilson, Alex Grinberg, Paul Love, and Tracey A. Rouault. 2004. “Genetic Ablations of Iron Regulatory Proteins 1 and 2 Reveal Why Iron Regulatory Protein 2 Dominates Iron Homeostasis.” *The EMBO Journal* 23(2):386–95.
- Mirra, SS. 1997. “The CERAD Neuropathology Protocol and Consensus Recommendations for the Postmortem

- Diagnosis of Alzheimer's Disease: A Commentary." *Neurobiology of Aging* 18(4 SUPPL.).
- Mirra, SS, A. Heyman, D. McKeel, S. M. Sumi, B. J. Crain, L. M. Brownlee, F. S. Vogel, J. P. Hughes, G. van Belle, L. Berg, Melvyn J. Ball, Linda M. Bierer, Diana Claasen, Law Rence Hansen, Michael Hart, John Hedreen, B. Baltimore, Victor Hen Derson, Bradley T. Hyman, Catharine Joachim, William Mark-Esbery, A. Julio Mar Tinez, Ann McKee, Carol Miller, John Moossy, David Nochlin, Daniel Perl, Carol Petito, Gutti R. Rao, Robert L. Schelper, Ursula Slager, and Robert D. Terry. 1991. "The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the Neuropathologic Assessment of Alzheimer's Disease." *Neurology* 41(4):479–86.
- Miyajima, Hiroaki. 2015. "Aceruloplasminemia." *Neuropathology* 35(1):83–90.
- Mleczko-Sanecka, Katarzyna, and Laura Silvestri. 2021. "Cell-Type-Specific Insights into Iron Regulatory Processes." *American Journal of Hematology* 96(1):110–27.
- Moloney, Christina M., Sydney A. Labuzan, Julia E. Crook, Habeeba Siddiqui, Monica Castanedes-Casey, Christian Lachner, Ronald C. Petersen, Ranjan Duara, Neill R. Graff-Radford, Dennis W. Dickson, Michelle M. Mielke, and Melissa E. Murray. 2023. "Phosphorylated Tau Sites That Are Elevated in Alzheimer's Disease Fluid Biomarkers Are Visualized in Early Neurofibrillary Tangle Maturity Levels in the Post Mortem Brain." *Alzheimer's and Dementia* 19(3):1029–40.
- Moloney, Christina M., Val J. Lowe, and Melissa E. Murray. 2021. "Visualization of Neurofibrillary Tangle Maturity in Alzheimer's Disease: A Clinicopathologic Perspective for Biomarker Research." *Alzheimer's and Dementia* 17(9):1554–74.
- Montagne, Axel, Zhen Zhao, and Berislav V. Zlokovic. 2017. "Alzheimer's Disease: A Matter of Blood-Brain Barrier Dysfunction?" *Journal of Experimental Medicine* 214(11):3151–69.
- Montine, Thomas J., Creighton H. Phelps, Thomas G. Beach, Eileen H. Bigio, Nigel J. Cairns, Dennis W. Dickson, Charles Duyckaerts, Matthew P. Frosch, Eliezer Masliah, Suzanne S. Mirra, Peter T. Nelson, Julie A. Schneider, Dietmar Rudolf Thal, John Q. Trojanowski, Harry V. Vinters, and Bradley T. Hyman. 2012. "National Institute on Aging-Alzheimer's Association Guidelines for the Neuropathologic Assessment of Alzheimer's Disease: A Practical Approach." *Acta Neuropathologica* 123(1):1–11.
- Moos, Torben, and Thomas R. Nielsen. 2006. "Ferroportin in the Postnatal Rat Brain: Implications for Axonal Transport and Neuronal Export of Iron." *Seminars in Pediatric Neurology* 13(3):149–57.
- Muralidar, Shibi, Senthil Visaga Ambi, Saravanan Sekaran, Diraviyam Thirumalai, and Balamurugan Palaniappan. 2020. "Role of Tau Protein in Alzheimer's Disease: The Prime Pathological Player." *International Journal of Biological Macromolecules* 163:1599–1617.
- Navarro, A., E. Del Valle, E. Martínez, C. Ordóñez, C. Pérez, and J. Tolia. 2013. "Highly Selective and Fast Diagnosis of Alzheimer's Disease Hallmark Lesions Using Congo Red in Isopropyl Alcoholic Solution." *Journal of Alzheimer's Disease* 35(3).
- Navarro, Ana, Jorge Tolia, and Eva Del Valle. 1999. "Congo Red Method for Demonstrating Amyloid in Paraffin Sections." *Journal of Histotechnology* 22(4):305–8.
- Navarro, Ana, Eva Del Valle, Eva Martínez, Cristina Ordóñez, Cristina Pérez, and Jorge Tolia. 2013. "Highly Selective and Fast Diagnosis of Alzheimer's Disease Hallmark Lesions Using Congo Red in Isopropyl Alcoholic Solution." *Journal of Alzheimer's Disease* 35(3):589–97.
- Nemeth, Elizabeta, and Tomas Ganz. 2021. "Hepcidin-Ferroportin Interaction Controls Systemic Iron Homeostasis." *International Journal of Molecular Sciences* 22(12).
- Nemeth, Elizabeta, and Tomas Ganz. 2023. "Hepcidin and Iron in Health and Disease." *Annual Review of Medicine* 74:261–77.
- Nemeth, Elizabeta, Marie S. Tuttle, Julie Powelson, Michael D. Vaughn, Adriana Donovan, Diane Mc Vey Ward,

- Tomas Ganz, and Jerry Kaplan. 2004. "Hepcidin Regulates Cellular Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization." *Science* 306(5704):2090–93.
- Nikparast, Farzaneh, Zohreh Ganji, Mohammad Danesh Doust, Reyhane Faraji, and Hoda Zare. 2022. "Brain Pathological Changes during Neurodegenerative Diseases and Their Identification Methods: How Does QSM Perform in Detecting This Process?" *Insights into Imaging* 13(1):74.
- van Oostveen, Wieke M., Elizabeth C. M. M. de Lange, and Arkadiusz Orzechowski. 2021. "Imaging Techniques in Alzheimer's Disease: A Review of Applications in Early Diagnosis and Longitudinal Monitoring." *International Journal of Molecular Sciences* 22(4):1–34.
- Pérez, Mar, José M. Valpuesta, Esteban Montejo De Garcini, Carmen Quintana, Montserrat Arrasate, José L. López-Carrascosa, Alberto Rábano, Justo García De Yébenes, and Jesús Avila. 1998. "Ferritin Is Associated with the Aberrant Tau Filaments Present in Progressive Supranuclear Palsy." *American Journal of Pathology* 152(6):1531–39.
- Peters, Alan, and Douglas L. Rosene. 2003. "In Aging, Is It Gray or White?" *Journal of Comparative Neurology* 462(2):139–43.
- Petrushanko, Irina Yu, Vladimir A. Mitkevich, and Alexander A. Makarov. 2023. "Effect of  $\beta$ -Amyloid on Blood-Brain Barrier Properties and Function." *Biophysical Reviews* 15(2):183–97.
- Pettersen, RC. 2016. "Mild Cognitive Impairment." *Continuum (Minneapolis)* 22(2):404–18.
- Plascencia-Villa, Germán, Arturo Ponce, Joanna F. Collingwood, M. Josefina Arellano-Jiménez, Xiongwei Zhu, Jack T. Rogers, Israel Betancourt, Miguel José-Yacamán, and George Perry. 2016. "High-Resolution Analytical Imaging and Electron Holography of Magnetite Particles in Amyloid Cores of Alzheimer's Disease." *Scientific Reports* 6(March):1–12.
- Proaño, Jefferson, and Franciso Aguilar. 2004. "Enfermedad de Alzheimer. Clínica, Diagnóstico y Neuropatología." *Plast & Rest Neurol* 3(1–2):95–105.
- Qian, Zhong-Ming, and Ya Ke. 2020. "Hepcidin and Its Therapeutic Potential in Neurodegenerative Disorders." *Medicinal Research Reviews* 40(2):633–53.
- Qian, Zhong Ming, and Ya Ke. 2019. "Brain Iron Transport." *Biological Reviews* 94(5):1672–84.
- Qian, Zhong Ming, Wei Li, and Qian Guo. 2023. "Ferroportin1 in the Brain." *Ageing Research Reviews* 88(May):101961.
- Quintana, C., S. Bellefqih, J. Y. Laval, J. L. Guerquin-Kern, T. D. Wu, J. Avila, I. Ferrer, R. Arranz, and C. Patiño. 2006. "Study of the Localization of Iron, Ferritin, and Hemosiderin in Alzheimer's Disease Hippocampus by Analytical Microscopy at the Subcellular Level." *Journal of Structural Biology* 153(1):42–54.
- Quintana, Carmen, and Lucía Gutiérrez. 2010. "Could a Dysfunction of Ferritin Be a Determinant Factor in the Aetiology of Some Neurodegenerative Diseases?" *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1800(8):770–82.
- Raha-Chowdhury, Ruma;, Animesh Alexander; Raha, Serhiy; Forostyak, Jing-Wei Wei; Zhao, Simon Russell William; Stott, Adrian; Bomford, Animesh; Alexander Raha, Serhiy; Forostyak, Jing-Wei Wei; Zhao, Simon; Russell William Stott, and Adrian; Bomford. 2015. "Expression and Cellular Localization of Hepcidin mRNA and Protein in Normal Rat Brain." *BMC Neuroscience* 16(1):24.
- Raha-Chowdhury, Ruma, Animesh Alexander Raha, Serhiy Forostyak, Jing Wei Zhao, Simon Russell William Stott, and Adrian Bomford. 2015. "Expression and Cellular Localization of Hepcidin mRNA and Protein in Normal Rat Brain." *BMC Neuroscience* 16(1):24.
- Raha, Animesh Alexander, Anwesha Biswas, James Henderson, Subhojit Chakraborty, Anthony Holland, Robert P. Friedland, Elizabeta Mukaetova-Ladinska, Shahid Zaman, and Ruma Raha-Chowdhury. 2022. "Interplay of Ferritin Accumulation and Ferroportin Loss in Ageing Brain: Implication for Protein Aggregation in

- Down Syndrome Dementia, Alzheimer's, and Parkinson's Diseases." *International Journal of Molecular Sciences* 23(3).
- Raha, Animesh Alexander, Seyedeh Deniz Ghaffari, James Henderson, Subhojit Chakraborty, Kieren Allinson, Robert P. Friedland, Anthony Holland, Shahid H. Zaman, Elizabeta B. Mukaetova-Ladinska, and Ruma Raha-Chowdhury. 2021. "Hepcidin Increases Cytokines in Alzheimer's Disease and Down's Syndrome Dementia: Implication of Impaired Iron Homeostasis in Neuroinflammation." *Frontiers in Aging Neuroscience* 13(April):1–17.
- Raha, Animesh Alexander, Radhika Anand Vaishnav, Robert Paul Friedland, Adrian Bomford, and Ruma Raha-Chowdhury. 2013. "The Systemic Iron-Regulatory Proteins Hepcidin and Ferroportin Are Reduced in the Brain in Alzheimer's Disease." *Acta Neuropathologica Communications* 1(55).
- Ramos, Patrícia, Agostinho Santos, Nair Rosas Pinto, Ricardo Mendes, Teresa Magalhães, and Agostinho Almeida. 2014. "Iron Levels in the Human Brain: A Post-Mortem Study of Anatomical Region Differences and Age-Related Changes." *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 28(1):13–17.
- Rasmussen, MK, H. Mestre, and M. Nedergaard. 2018. "The Glymphatic Pathway in Neurological Disorders." *Lancet Neurology* 17(11):1016–24.
- Reusche, E. 1991. "Silver Staining of Senile Plaques and Neurofibrillary Tangles in Paraffin Sections: A Simple and Effective Method." *Pathology - Research and Practice* 187(8):1045–49.
- Rius-Pérez, S., A. M. Tormos, S. Pérez, and R. Taléns-Visconti. 2018. "Vascular Pathology: Cause or Effect in Alzheimer Disease?" *Neurologia* 33(2):121–28.
- Rogers, Jack T., Vivek Venkataramani, Cecilia Washburn, Yanyan Liu, Vinusha Tummala, Hong Jiang, Ann Smith, and Catherine M. Cahill. 2016. "A Role for Amyloid Precursor Protein Translation to Restore Iron Homeostasis and Ameliorate Lead (Pb) Neurotoxicity." *Journal of Neurochemistry* 479–94.
- Rojo, E. 2014. "Enfermedad de Alzheimer. Nuevos Criterios Diagnósticos e Implicaciones En La Practica Clínica." *Anales de La Real Academia de Medicina y Cirugia de Valladolid* 51:67–75.
- Sacuiu, S. F. 2016. "Dementias." Pp. 123–51 in *Handbook of Clinical Neurology*. Vol. 138, edited by E. C. Rosano, M.A. Ikram, and M. Ganguli.
- Sayre, Lawrence M., George Perry, Peggy L. R. Harris, Yahua Liu, Kathryn A. Schubert, and Mark A. Smith. 2000. "In Situ Oxidative Catalysis by Neurofibrillary Tangles and Senile Plaques in Alzheimer's Disease." *Journal of Neurochemistry* 74(1):270–79.
- Schiavolin, Silvia, Giorgia Camarda, Alessia Mazzucchelli, Arianna Mariniello, and Giulia Marinoni. 2024. "Cognitive and Psychological Characteristics in Patients with Cerebral Amyloid Angiopathy : A Literature Review." *Neurological Sciences* 45(7):3031–49.
- Seo, Seung Jun, Won Seok Chang, Jae Geun Jeon, Younshick Choi, Eun Ho Kim, and Jong Ki Kim. 2021. "Proton Stimulation Targeting Plaque Magnetite Reduces Amyloid- $\beta$  Plaque and Iron Redox Toxicity and Improves Memory in an Alzheimer's Disease Mouse Model." *Journal of Alzheimer's Disease* 84(1):377–92.
- Shen, Zhiwei, Jianfeng Lei, Xueyuan Li, Zhanjing Wang, Xinjie Bao, and Renzhi Wang. 2018. "Multifaceted Assessment of the APP/PS1 Mouse Model for Alzheimer's Disease: Applying MRS, DTI, and ASL." *Brain Research* 1698(July):114–20.
- Singh, Neena, Swati Haldar, Ajai K. Tripathi, Katharine Horback, Joseph Wong, Deepak Sharma, Amber Beserra, Srinivas Suda, Charumathi Anbalagan, Som Dev, Chinmay K. Mukhopadhyay, and Ajay Singh. 2014. "Brain Iron Homeostasis: From Molecular Mechanisms to Clinical Significance and Therapeutic Opportunities." *Antioxidants and Redox Signaling* 20(8):1324–63.
- Smith, Mark A., Peggy L. R. Harris, Lawrence M. Sayre, and George Perry. 1997. "Iron Accumulation in Alzheimer Disease Is a Source of Redox-Generated Free Radicals." *Proceedings of the National Academy*

*of Sciences of the United States of America* 94(18):9866–68.

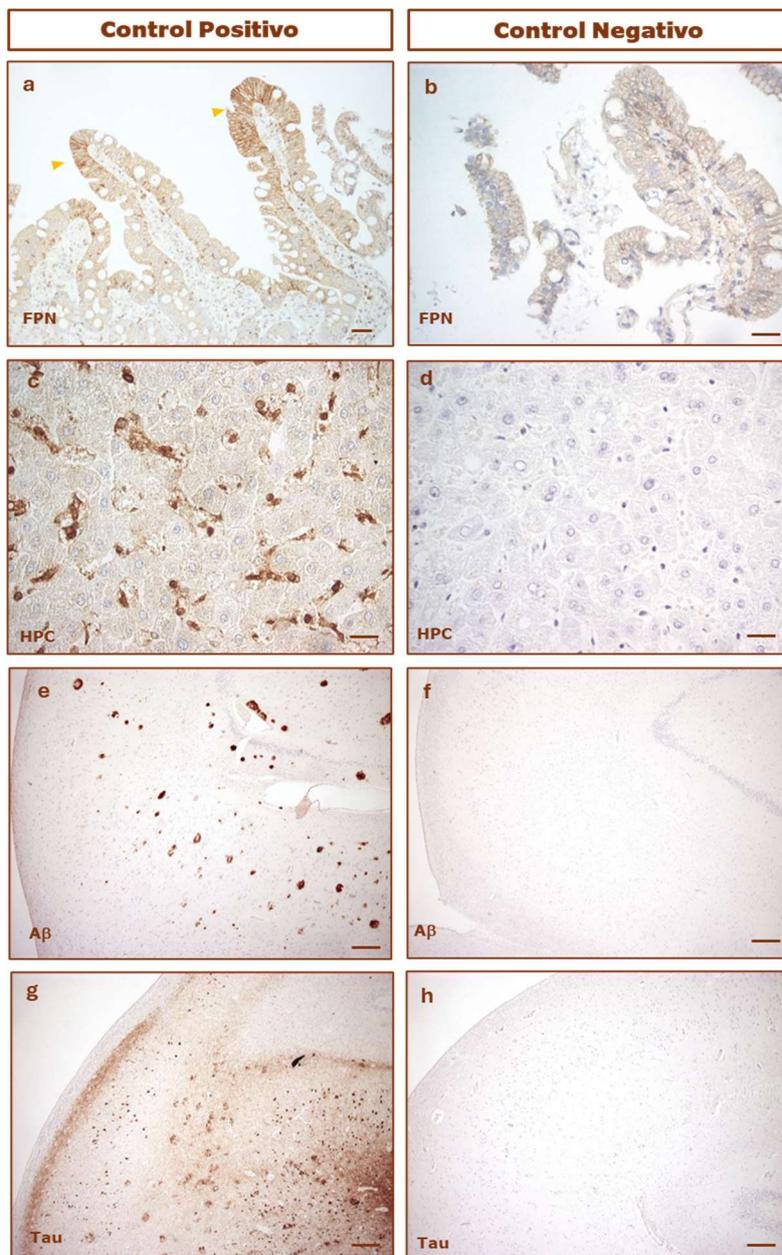
- Solis, E., KN Hascup, and ER Hascup. 2020. “Alzheimer’s Disease: The Link Between Amyloid- $\beta$  and Neurovascular Dysfunction.” *J Alzheimers Dis.* 76(4):1179–98.
- Spotorno, Nicola, Julio Acosta-Cabrero, Erik Stomrud, Björn Lampinen, Olof T. Strandberg, Danielle van Westen, and Oskar Hansson. 2020. “Relationship between Cortical Iron and Tau Aggregation in Alzheimer’s Disease.” *Brain* 143(5):1341–49.
- Sternberg, Zohara, Zihua Hu, Daniel Sternberg, Shayan Waseh, Joseph F. Quinn, Katharine Wild, Jeffrey Kaye, Lin Zhao, and Michael Garrick. 2017. “Serum Hepcidin Levels, Iron Dyshomeostasis and Cognitive Loss in Alzheimer’S Disease.” *Aging and Disease* 8(2):215–27.
- Sugawara, Etsuko, and Hiroshi Nikaido. 2014. “Properties of AdeABC and AdelJK Efflux Systems of Acinetobacter Baumannii Compared with Those of the AcrAB-TolC System of Escherichia Coli.” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58(12):7250–57.
- Tahami-Monfared, Amir Abbas, Michael J. Byrnes, Leigh Ann White, and Quanwu Zhang. 2022. “Alzheimer’s Disease: Epidemiology and Clinical Progression.” *Neurology and Therapy* 11(2):553–69.
- Tang, Yu, and Weidong Le. 2016. “Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases.” *Molecular Neurobiology* 53(2):1181–94.
- Telling, Neil D., James Everett, Joanna F. Collingwood, Jon Dobson, Gerrit van der Laan, Joseph J. Gallagher, Jian Wang, and Adam P. Hitchcock. 2017. “Iron Biochemistry Is Correlated with Amyloid Plaque Morphology in an Established Mouse Model of Alzheimer’s Disease.” *Cell Chemical Biology* 24(10):1205-1215.e3.
- Tolivia, Jorge, Ana Navarro, Eva Del Valle, Cristina Perez, Cristina Ordoñez, and Eva Martínez. 2006. “Application of Photoshop and Scion Image Analysis to Quantification.” *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* 28(1):43–53.
- Toriello, María, Vicente González-Quintanilla, and Julio Pascual. 2021. “The Glymphatic System and Its Involvement in Disorders of the Nervous System.” *Medicina Clinica* 156(7):339–43.
- Tsatsanis, Andrew, Bruce X. Wong, Adam P. Gunn, Scott Ayton, Ashley I. Bush, David Devos, and James A. Duce. 2020. “Amyloidogenic Processing of Alzheimer’s Disease  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein Induces Cellular Iron Retention.” *Molecular Psychiatry* 25(9):1958–66.
- Tsatsanis, Andrew, Bruce X. Wong, Adam P. Gunn, Scott Ayton, Ashley I. Bush, and James A. Duce. 2020. “Amyloidogenic Processing of Alzheimer’ s Disease  $\beta$  -Amyloid Precursor Protein Induces Cellular Iron Retention.” *Molecular Psychiatry*.
- Uchida, Kazuhiko. 2022. “Waste Clearance in the Brain and Neuroinflammation: A Novel Perspective on Biomarker and Drug Target Discovery in Alzheimer’s Disease.” *Cells* 11(5):919.
- Uchida, Yuto, Hirohito Kan, Keita Sakurai, Yoshihiko Horimoto, Emi Hayashi, Akihiko Iida, Nobuyuki Okamura, Kenichi Oishi, and Noriyuki Matsukawa. 2022. “APOE E4 Dose Associates with Increased Brain Iron and  $\beta$ -Amyloid via Blood-Brain Barrier Dysfunction.” *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 93(7):772–78.
- Uchida, Yuto, Hirohito Kan, Keita Sakurai, Kenichi Oishi, and Noriyuki Matsukawa. 2022. “Quantitative Susceptibility Mapping as an Imaging Biomarker for Alzheimer’s Disease: The Expectations and Limitations.” *Frontiers in Neuroscience* 16(August):1–17.
- Uddin, Md Sahab, Md Tanvir Kabir, Md Sohanur Rahman, Tapan Behl, Philippe Jeandet, Ghulam Md Ashraf, Agnieszka Najda, May N. Bin-Jumah, Hesham R. El-Seedi, and Mohamed M. Abdel-Daim. 2020. “Revisiting the Amyloid Cascade Hypothesis: From Anti-A $\beta$  Therapeutics to Auspicious New Ways for Alzheimer’s Disease.” *International Journal of Molecular Sciences* 21(16):1–33.

- Urrutia, Pamela, Pabla Aguirre, Andrés Esparza, Victoria Tapia, Natalia P. Mena, Miguel Arredondo, Christian González-Billault, and Marco T. Núñez. 2013. "Inflammation Alters the Expression of DMT1, FPN1 and Hcpidin, and It Causes Iron Accumulation in Central Nervous System Cells." *Journal of Neurochemistry* 126(4):541–49.
- Urrutia, Pamela J., Etienne C. Hirsch, Christian González-Billault, and Marco T. Núñez. 2017. "Hcpidin Attenuates Amyloid Beta-Induced Inflammatory and pro-Oxidant Responses in Astrocytes and Microglia." *Journal of Neurochemistry* 142(1):140–52.
- Valensin, Daniela, Chiara Gabbiani, and Luigi Messori. 2012. "Metal Compounds as Inhibitors of  $\beta$ -Amyloid Aggregation. Perspectives for an Innovative Metallotherapeutics on Alzheimer's Disease." *Coordination Chemistry Reviews* 256(19–20):2357–66.
- Vela, Driton. 2018. "Hcpidin, an Emerging and Important Player in Brain Iron Homeostasis." *Journal of Translational Medicine* 16(1).
- Verheggen, Inge C. M., Whitney M. Freeze, Joost J. A. de Jong, Jacobus F. A. Jansen, Alida A. Postma, Martin P. J. van Boxtel, Frans R. J. Verhey, and Walter H. Backes. 2021. "Application of Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging in the Assessment of Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier Integrity." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 127:171–83.
- Verheggen, Inge C. M., Joost J. A. de Jong, Martin P. J. van Boxtel, Ed H. B. M. Gronenschild, Walter M. Palm, Alida A. Postma, Jacobus F. A. Jansen, Frans R. J. Verhey, and Walter H. Backes. 2020. "Increase in Blood-Brain Barrier Leakage in Healthy, Older Adults." *GeroScience* 42(4):1183–93.
- Villarejo, A., and V. Puertas-Martín. 2011. "Utilidad de Los Test Breves En El Cribado de Demencia." *Neurología* 26(7):425–33.
- Wakasaya, Yasuhito, Takeshi Kawarabayashi, Mitsunori Watanabe, Yukiko Yamamoto-Watanabe, Ayumi Takamura, Tomoko Kurata, Tetsuro Murakami, Koji Abe, Kiyofumi Yamada, Koichi Wakabayashi, Atsushi Sasaki, David Westaway, Peter St George Hyslop, Etsuro Matsubara, and Mikio Shoji. 2011. "Factors Responsible for Neurofibrillary Tangles and Neuronal Cell Losses in Tauopathy." *Journal of Neuroscience Research* 89(4):576–84.
- Wan, Wenbin, Lan Cao, Bill Kalionis, Padma Murthi, Shijin Xia, and Yangtai Guan. 2019. "Iron Deposition Leads to Hyperphosphorylation of Tau and Disruption of Insulin Signaling." *Frontiers in Neurology* 10(JUN):1–13.
- Wang, Dan, Yan Ying Li, Jian Hua Luo, and Yue Hua Li. 2014. "Age-Related Iron Deposition in the Basal Ganglia of Controls and Alzheimer Disease Patients Quantified Using Susceptibility Weighted Imaging." *Archives of Gerontology and Geriatrics* 59(2):439–49.
- Wang, Feixue, Jiandong Wang, Ying Shen, Hao Li, Wolf Dieter Rausch, and Xiaobo Huang. 2022. "Iron Dyshomeostasis and Ferroptosis: A New Alzheimer's Disease Hypothesis?" *Frontiers in Aging Neuroscience* 14(March):1–14.
- Wang, Jian, Jiaying Fu, Yuanxin Zhao, Qingqing Liu, Xiaoyu Yan, and Jing Su. 2023. "Iron and Targeted Iron Therapy in Alzheimer's Disease." *International Journal of Molecular Sciences* 24(22).
- Wang, Tao, Shuang Feng Xu, Yong Gang Fan, Lin Bo Li, and Chuang Guo. 2019. "Iron Pathophysiology in Alzheimer's Diseases." Pp. 67–104 in *Brain Iron Metabolism and CNS Diseases*. Vol. 1173. Springer, Singapore.
- Weisman, David, Edwin Hakimian, and Gilbert J. Ho. 2006. "Interleukins, Inflammation, and Mechanisms of Alzheimer's Disease." Pp. 505–30 in *Vitamins and Hormones*. Vol. 74. Vitam Horm.
- Wilson, David M., Mark R. Cookson, Ludo Van Den Bosch, Henrik Zetterberg, David M. Holtzman, and Ilse Dewachter. 2023. "Hallmarks of Neurodegenerative Diseases." *Cell* 186(4):693–714.

- Wu, L., A. G. Miria. Leenders, Sharon Cooperman, Esther Meyron-Holtz, Sophia Smith, William Land, Robert Y. L. Tsai, Urs V. Berger, Zu Hang Sheng, and Tracey A. Rouault. 2004. "Expression of the Iron Transporter Ferroportin in Synaptic Vesicles and the Blood-Brain Barrier." *Brain Research* 1001(1–2):108–17.
- Wu, Wenda, Xuezhen Xue, Yan Chen, Ning Zheng, and Jichuang Wang. 2022. "Targeting Prolyl Isomerase Pin1 as a Promising Strategy to Overcome Resistance to Cancer Therapies." *Pharmacological Research* 184(September):106456.
- Xian-Hui, Dong, Gao Wei-Juan, Shao Tie-Mei, Xie Hong-Lin, Bai Jiang-Tao, Zhao Jing-Yi, and Chai Xi-Qing. 2015. "Age-Related Changes of Brain Iron Load Changes in the Frontal Cortex in APPswe/PS1 $\delta$ E9 Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease." *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 30:118–23.
- Xu, He, David I. Finkelstein, and Paul A. Adlard. 2014. "Interactions of Metals and Apolipoprotein e in Alzheimer's Disease." *Frontiers in Aging Neuroscience* 6(JUN):1–7.
- Xu, Yong, Yating Zhang, Jian Hua Zhang, Kang Han, Xinwei Zhang, Xue Bai, Lin Hao You, Peng Yu, Zhenhua Shi, Yan Zhong Chang, and Guofen Gao. 2020. "Astrocyte Heparin Ameliorates Neuronal Loss through Attenuating Brain Iron Deposition and Oxidative Stress in APP/PS1 Mice." *Free Radical Biology and Medicine* 158:84–95.
- Yamamoto, Akira, Ryong Woon Shin, Kazuhiro Hasegawa, Hironobu Naiki, Hiroyuki Sato, Fumio Yoshimasu, and Tetsuyuki Kitamoto. 2002. "Iron (III) Induces Aggregation of Hyperphosphorylated  $\tau$  and Its Reduction to Iron (II) Reverses the Aggregation: Implications in the Formation of Neurofibrillary Tangles of Alzheimer's Disease." *Journal of Neurochemistry* 82(5):1137–47.
- Yanase, Ken, Naoya Uemura, Yoichi Chiba, Ryuta Murakami, Ryuji Fujihara, Koichi Matsumoto, Gotaro Shirakami, Nobukazu Araki, and Masaki Ueno. 2020. "Immunoreactivities for Heparin, Ferroportin, and Heparanase in Astrocytes and Choroid Plexus Epithelium of Human Brains." *Neuropathology* 40(1):75–83.
- Yanatori, Izumi, and Fumio Kishi. 2019. "DMT1 and Iron Transport." *Free Radical Biology and Medicine* 133:55–63.
- Zecca, Luigi, Moussa B. H. Youdim, Peter Riederer, James R. Connor, and Robert R. Crichton. 2004. "Iron, Brain Ageing and Neurodegenerative Disorders." *Nature Reviews Neuroscience* 5(11):863–73.
- Zechel, S., and K. Huber-Wittmer. 2006. "Distribution of the Iron-Regulating Protein Heparin in the Murine Central Nervous System." *Journal of Neuroscience Research* 84:790–800.
- Zhang, Chao, Christopher Qian, Guang Yang, Yu Xin Bao, and Zhong Ming Qian. 2021. "Heparin Inhibits Autophagy in Intracerebral Hemorrhage Models in Vitro and in Vivo." *Molecular and Cellular Neuroscience* 111(January):103589.
- Zhang, Shuting, Chunyan Lei, Peng Liu, Mingming Zhang, Wendan Tao, Hua Liu, and Ming Liu. 2015. "Association between Variant Amyloid Deposits and Motor Deficits in FAD-Associated Presenilin-1 Mutations: A Systematic Review." *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 56:180–92.
- Zhao, Zhen, Amy R. Nelson, Christer Betsholtz, and Berislav V. Zlokovic. 2015. "Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier." *Cell* 163(5):1064–78.
- Zlokovic, Berislav V. 2011. "Neurovascular Pathways to Neurodegeneration in Alzheimer's Disease and Other Disorders." *Nature Reviews Neuroscience* 12(12).
- Zou, Zhenyou, Fengyao Wu, Liguang Chen, Hua Yao, Zengxian Wang, Yongfeng Chen, Ming Qi, Yang Jiang, Longhua Tang, Xinying Gan, Lingjia Kong, Zhicheng Yang, Xiaolan Huang, Wei Shu, Bixue Li, Xinyu Tan, Liwen Huang, Shi Bai, Lijuan Wu, Jinping Mo, Huilin Hu, Huihua Liu, Ruyi Zou, and Yuhua Wei. 2024. "The J Bs-5YP Peptide Can Alleviate Dementia in Senile Mice by Restoring the Transcription of Slc40a1 to Secrete the Excessive Iron from Brain." *Journal of Advanced Research* (xxxx).

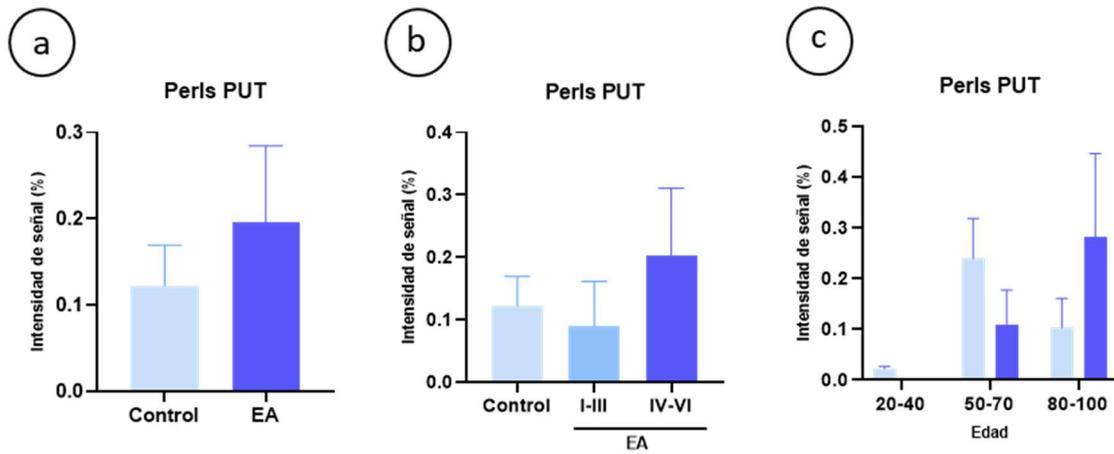
## 8.-ANEXOS

Figura suplementaria S1



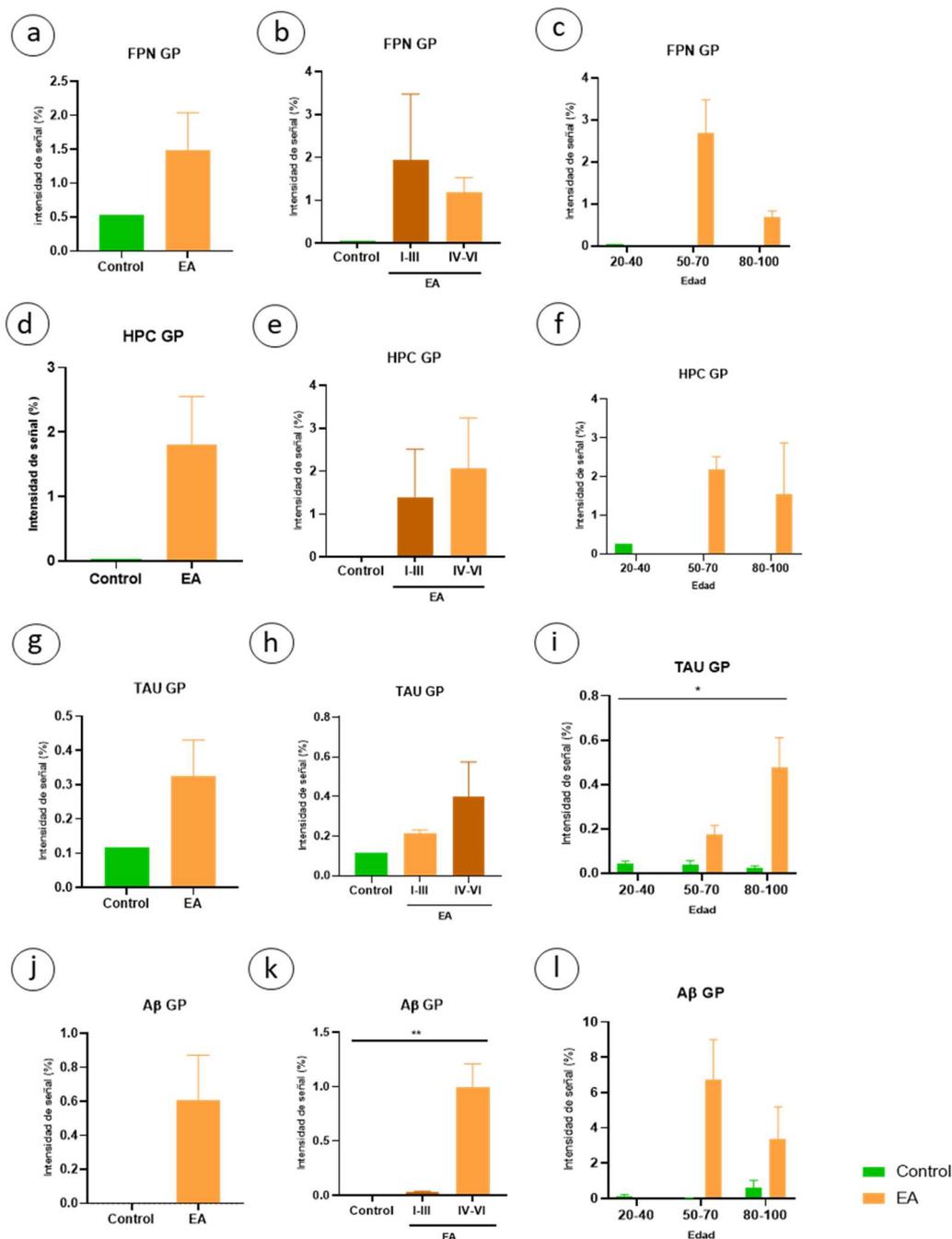
**Figura S1.-** Controles inmunohistoquímicos para los anticuerpos utilizados en el estudio. A la izquierda el control positivo revelado con DAB (marrón) y con tinción de contraste azul para los núcleos de las células. A la derecha el control negativo, se han realizado los mismos pasos excepto incubación con el anticuerpo primario. **(a)** Control positivo para el anticuerpo de ferroportina (FPN) en intestino de un paciente control de 41 años. Nótese el marcaje marrón de la membrana de los enterocitos (cabeza de flecha). Aumento de 20x. Barra 20  $\mu\text{m}$ . **(b)** Control negativo para el anticuerpo FPN en el mismo intestino humano. Aumento de 40x. Barra 30  $\mu\text{m}$ . **(c)** Control positivo para el anticuerpo de hepcidina (HPC) en hígado humano. Existe señal positiva en las células esperadas, células endoteliales y células de Kuffer. Aumento de 40x. Barra 20  $\mu\text{m}$ . **(d)** Control negativo para el anticuerpo HPC, donde no se ha incubado con el anticuerpo primario. Aumento de 20x. Barra 20  $\mu\text{m}$ . **(e)** Control positivo para el anticuerpo para beta amiloide ( $A\beta$ ) en el hipocampo de un hombre de 77 con EA Braak IV. Aumento de 4x. Barra 200  $\mu\text{m}$ . **(f)** Control negativo sin anticuerpo para  $A\beta$  en el hipocampo de una mujer control de 100 años. Aumento de 4x. Barra 200  $\mu\text{m}$  **(g)** Control positiva para Tau en el hipocampo de un hombre de 68 con EA Braak VI. Aumento de 4x. Barra 200  $\mu\text{m}$  **(h)** Control negativo para Tau en el hipocampo de una mujer de 61 años con EA Braak VI. Aumento de 4x. Barra 200  $\mu\text{m}$ .

Figura suplementaria S2



**Figura S2.-** Representación gráfica de la intensidad de marcaje para Azul de Prusia tras la reacción de Perls en el putamen (PUT). Las gráficas **a**, **b** y **c** muestran el porcentaje de intensidad de marcaje medio  $\pm$  SEM de pacientes EA respecto a los controles.

## Figura suplementaria S3



**Figura S3-** Representación gráfica de la intensidad de marcaje para FPN, HPC, Tau y A $\beta$  en el globo pálido (GP). Las gráficas **a, d, g, j** muestran el porcentaje de intensidad de marcaje medio  $\pm$  SEM de FPN, HPC, Tau y A $\beta$  de pacientes EA respecto a los controles. En las gráficas **b, e, h, k** se representa el porcentaje de intensidad de marcaje medio  $\pm$  SEM de FPN, HPC, Tau y A $\beta$  de pacientes EA separados en dos grupos, EA leve (Braak del I-III) y grave (Braak del IV-VI), respecto a los controles. En ambos casos el análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de un factor seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. \* = diferencias estadísticamente significativas versus control \*  $p < 0,05$ . Las gráficas **c, f, i, l** muestran el porcentaje de intensidad de marcaje medio  $\pm$  SEM de FPN, HPC, Tau y A $\beta$  de pacientes EA respecto a los controles separados por grupos de edad, jóvenes (20-40), adultos (50-70) y ancianos (80-100). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante un test ANOVA de dos factores seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. \* = diferencias estadísticamente significativas entre grupos de edad \*  $p < 0,05$ ; \*\* = diferencias estadísticamente significativas entre grupos de EA \*\*  $p < 0,05$ ;

**Figuras suplementarias S4**

Tabla S5.- Coeficiente de correlación de la prueba  $\rho$  de Spearman entre los marcadores patológicos de la patología, Tau y A $\beta$  y las proteínas del transporte del hierro, ferroportina (FPN) y hepcidina (HPC) en CA1 del hipocampo.

R de Spearman	Edad-CTRL	Edad-EA	Estadio Braak
<b>FPN</b>	0,6147	<b>0,8858</b>	<b>0,4665</b>
<b>HPC</b>	0,3742	<b>0,7800</b>	0,1071
<b>Tau</b>	<b>0,7483</b>	<b>0,7902</b>	<b>0,8125</b>
<b>A<math>\beta</math></b>	0,4543	<b>0,6591</b>	<b>0,6694</b>

Tabla S6.- Coeficiente de correlación de la prueba  $\rho$  de Spearman entre los marcadores patológicos de la patología, Tau y A $\beta$  y las proteínas del transporte del hierro, FPN y HPC en la corteza entorrinal (CENT).

R de Spearman	Edad-CTRL	Edad-EA	Estadio Braak
<b>FPN</b>	<b>0,8463</b>	<b>0,7223</b>	0,4368
<b>HPC</b>	0,4722	<b>0,8427</b>	0,1199
<b>Tau</b>	<b>0,8107</b>	<b>0,6621</b>	<b>0,8557</b>
<b>A<math>\beta</math></b>	0,6441	0,5718	<b>0,8004</b>

Tabla S7.- Coeficiente de correlación de la prueba  $\rho$  de Spearman entre los marcadores patológicos de la patología, Tau y A $\beta$  y las proteínas del transporte del hierro, FPN y HPC en el putamen (PUT) de los ganglios basales.

R de Spearman	Edad-CTRL	Edad-EA	Estadio Braak
<b>FPN</b>	0,4900	<b>0,8340</b>	0,2469
<b>HPC</b>	0,4900	<b>0,8131</b>	-0,2899
<b>Tau</b>	-0,3207	<b>0,9163</b>	<b>0,8180</b>
<b>A<math>\beta</math></b>	0,3936	<b>0,739</b>	<b>0,5855</b>

## Article

# Iron Dysregulation in Alzheimer's Disease: LA-ICP-MS Bioimaging of the Distribution of Iron and Ferroportin in the CA1 Region of the Human Hippocampus

Susana Junceda <sup>1,2,3,†</sup>, María Cruz-Alonso <sup>4,†</sup>, Beatriz Fernandez <sup>4</sup> , Rosario Pereiro <sup>4</sup>, Eva Martínez-Pinilla <sup>2,3,5</sup> and Ana Navarro <sup>2,3,5,\*</sup> 

<sup>1</sup> Servicio de Anatómo-Patología, Hospital Universitario Central de Asturias–HUCA, Av Roma s/n, 33011 Oviedo, Spain; susanajunceda@gmail.com

<sup>2</sup> Instituto de Neurociencias del Principado de Asturias (INEUROPA), 33006 Oviedo, Spain

<sup>3</sup> Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), 33011 Oviedo, Spain

<sup>4</sup> Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Julian Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain; cruz.alonso.maria@gmail.com (M.C.-A.); fernandezbeatriz@uniovi.es (B.F.); mrpereiro@uniovi.es (R.P.)

<sup>5</sup> Department of Morphology and Cell Biology, Faculty of Medicine, University of Oviedo, Julian Clavería 6, 33006 Oviedo, Spain; martinezeva@uniovi.es (E.M.-P.); anavarro@uniovi.es (A.N.)

\* Correspondence: anavarro@uniovi.es; Tel.: +34-985-102773

† These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** Alzheimer's disease (AD) is a prevalent neurodegenerative disorder characterized by cognitive decline and neuropathological hallmarks, including  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) plaques, Tau tangles, synaptic dysfunction and neurodegeneration. Emerging evidence suggests that abnormal iron (Fe) metabolism plays a role in AD pathogenesis, but the precise spatial distribution of the Fe and its transporters, such as ferroportin (FPN), within affected brain regions remains poorly understood. This study investigates the distribution of Fe and FPN in the CA1 region of the human hippocampus in AD patients with a micrometer lateral resolution using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). For this purpose, we visualized and quantified Fe and FPN in three separated CA1 layers: stratum molecular–radial (SMR), stratum pyramidal (SP) and stratum oriens (SO). Additionally, chromogenic immunohistochemistry was used to examine the distribution and colocalization with Tau and  $A\beta$  proteins. The results show that Fe accumulation was significantly higher in AD brains, particularly in SMR and SO. However, FPN did not present significant changes in AD, although it showed a non-uniform distribution across CA1 layers, with elevated levels in SP and SO. Interestingly, minimal overlap was observed between Fe and FPN signals, and none between Fe and areas rich in neurofibrillary tangles (NFTs) or neuritic plaques (NP). In conclusion, the lack of correlation between Fe and FPN signals suggests complex regulatory mechanisms in AD Fe metabolism and deposition. These findings highlight the complexity of Fe dysregulation in AD and its potential role in disease progression.

**Keywords:** Alzheimer's disease; iron transport proteins; ferroportin; iron homeostasis;  $\beta$ -amyloid; Tau; immunohistochemistry; LA-ICP-MS



**Citation:** Junceda, S.; Cruz-Alonso, M.; Fernandez, B.; Pereiro, R.; Martínez-Pinilla, E.; Navarro, A. Iron Dysregulation in Alzheimer's Disease: LA-ICP-MS Bioimaging of the Distribution of Iron and Ferroportin in the CA1 Region of the Human Hippocampus. *Biomolecules* **2024**, *14*, 295. <https://doi.org/10.3390/biom14030295>

Academic Editor: Fabio Di Domenico

Received: 29 December 2023

Revised: 31 January 2024

Accepted: 1 February 2024

Published: 1 March 2024



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia, affecting approximately 5–10% of the population over 65 years of age. The pathology involves gliosis as well as synaptic and neuronal loss, leading to the typical symptoms of the disease [1]. Classically, the pathological markers of AD include intraneuronal aggregates of microtubule-associated protein Tau, called neurofibrillary tangles, and insoluble extracellular deposition of  $\beta$ -amyloid peptide ( $A\beta$ ), which, together with Tau, form neuritic plaques (NP) [1]. In addition, emerging evidence has demonstrated a dysregulation of metal ions (iron, copper

and zinc) in the vulnerable brain regions of AD patients [2]. This alteration in the ion content at the tissue level is strongly linked to A $\beta$  deposition, Tau hyperphosphorylation, neuronal loss and neuroinflammation [3]. However, it is not known whether it contributes to the pathogenesis of the disease or is a consequence of it.

Iron (Fe) is a chemical compound necessary for the transport of oxygen in hemoglobin, being part of a significant number of enzymes of the body's cells. In the central nervous system (CNS), Fe crosses the blood–brain barrier bound to transferrin and accumulates intracellularly thanks to ferritin. In physiological conditions, the excessive amount of intracellular Fe is eliminated by ferroportin (FPN), a transmembrane protein that releases it to the extracellular medium. The quantity of this protein is regulated in turn by hepcidin (HEP) that binds to FPN for cell recycling [4]. Nevertheless, in some pathological situations, the amount of Fe in the brain is altered, which can affect the synthesis of neurotransmitters, the energy balance at the mitochondrial level and the myelination performed by oligodendrocytes [4,5]. The presence of Fe has also been linked to the generation of harmful hydroxyl radicals via Fenton reaction, contributing to increased oxidative stress and neuronal damage [6].

In recent years, an increase in Fe in AD brains has been described, mainly in the cerebral cortex, hippocampus and basal ganglia, but also in other areas, such as the cerebellum or brainstem [7]. Notably, Fe accumulation also appears in NP and neurofibrillary tangles in greater quantities than in normal neuropils [8]. Although it is not clear, the increase in Fe amount in the brain of AD patients may be due to the breakdown of the blood–brain barrier or to a deregulation of the proteins related to its accumulation and transport, both intra- and extracellularly. Furthermore, the places where Fe is deposited and the proteins responsible for its transport are still unknown [9]. Since the pioneering work of Bandyopadhyay et al. (2014) introduced the fact that a chelating Fe treatment can prevent the aggregation of misfolded proteins and slow down or reverse the disease process [5], the interest in determining the role of this ion in AD and in the formation of NP and tangles has gained momentum in recent years, even more so when an altered Fe distribution has shown promise as a potential biomarker for early diagnosis in vivo using modern ultra-detection magnetic resonance techniques [10,11].

To obtain detailed information about how Fe behaves in situ in samples of human tissues, animal models, or cell cultures, various techniques have been employed to quantify and visualize Fe distribution, ranging from conventional histochemical methods to new bioimaging techniques. Classical histochemical techniques that include staining Fe with Prussian blue or the modifications used by Meguro et al. with DAB [12,13] allow us to obtain spatial images, but they only work for unbound metal ions and do not contribute to a fine quantification. Among new technical approximations, laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) stands out for its high sensitivity and cellular resolution [14,15]. LA-ICP-MS uses a focused laser beam to atomize part of a sample. Then, the laser-generated aerosol with the sample extracted using a laser is sent through an ICP, which allows for atomization and ionization of the sample. Subsequently, the ions are separated by their mass–charge ratio in a mass analyzer and finally detected. In this way, isotopic information can be achieved, as well as elemental analysis. Since the laser removes only one area at a time, this technique generates a spatial image of the scanned area with resolution in the low micrometer range.

Given the observed dysregulation of Fe distribution in AD brains, the aim of this work was to quantify and characterize the microscopic distribution of Fe and FPN within the distinct layers of the hippocampal CA1 region of AD patients via LA-ICP-MS. Additionally, this paper also assessed, using chromogenic immunohistochemistry (IHC), the association between Fe and FPN in relation with Tau pathology and local deposits of A $\beta$ .

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Subjects of Study

The Brain Bank of the Principado of Asturias provided brain tissue samples of patients with AD ( $n = 4$ ) and of healthy humans of various ages (CTRL) ( $n = 4$ ). Table 1 contains the details of the different donors. Patients were clinically diagnosed with AD and the pathology was confirmed post mortem. The different cases were classified based on their AD neuropathological stage, according to Braak's criteria [16]. The tissue was obtained from necropsies within 6–12 h after death. All grossly visualized and suspected macroscopic or microscopic infarcts were dissected for histologic confirmation by means of Perl's reaction, and then rejected.

**Table 1.** Details of AD and CTRL human brain tissues from postmortem donors (#).

Donor	Age	Sex	Cause of Death	Break Scale	Other Brain Pathology
#1	57	Male	Cardiogenic shock	--	No
#2	71	Female	Cardiorespiratory arrest	--	No
#3	82	Male	Cardiorespiratory arrest	--	No
#4	100	Female	Multi-organic failure	--	No
#5	84	Female	Multi-organic failure	II–III	No
#6	77	Male	Cardiorespiratory arrest	VI	No
#7	91	Female	Acute myocardial infarction	V–VI	No
#8	62	Male	Cardiorespiratory arrest	VI	No

The present study was carried out in accordance with the Helsinki Declaration and approved by the "Regional Clinical Research Ethics Committee of the Principado of Asturias". These studies received consent on the following bases: (i) samples were collected retrospectively from pathology files of necropsies performed for diagnostic purposes, (ii) patient identities were completely anonymized and unlinked from unique identifiers (1–8#) and (iii) there was no risk to the participants (only anonymized tissues were used).

### 2.2. Tissue Processing

Human hippocampal pieces were fixed by immersion in 10% formaldehyde in 0.1 phosphate buffer (pH 7.4). After fixation, they were washed, dehydrated and embedded in paraffin. Hippocampus cross sections of 5  $\mu\text{m}$  thickness were cut and stretched on slides coated with FLEX (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). To avoid formalin-induced artifacts, only material fixed for a period of less than six months was selected. Consecutive sections of each sample were subjected to a corresponding protocol depending on the study, i.e., histochemistry or IHC. Specifically, the CA1 region of the hypothalamus was selected because we had previously reported changes in AD [17], and it is an easily recognizable area in the LA-ICP-MS visor.

### 2.3. Neurons, Senile Plaques, Neurofibrillary Tangles and Amyloid-Beta Staining

In order to carry out a cytoarchitectonic study of the samples, they were stained using a Nissl-type staining procedure [18]. For the diagnosis and analysis of the histological changes in AD brain tissues, routine procedures such as the silver technique [19] or a Congo red method, developed in our laboratory [20,21], were used to visualize the typical cerebral markers of the neuropathology.

### 2.4. Chromogenic Immunohistochemistry

For conventional chromogenic IHC, human brain sections were deparaffinized, incubated for 60 min at 56 °C and immersed in an antigen retrieval solution (pH 9 at 95 °C for 20 min). Then, tissues were washed three times (10 min) with PBS (10 mM; pH 7.4) and subsequently incubated with 0.1% triton X-100 in PBS (5 min). Next, another sequence of washing steps was performed with PBS (10 min, three times), and the slides were incubated with the blocking agent solution (0.1% BSA and 10% goat serum solution in PBS;

10 mM; pH 7.4) at room temperature for 30 min. Then, consecutive sections were incubated with a rabbit antibody against A $\beta$  (Novocastra NCL- $\beta$ -amyloid; dilution 1:100) or Tau (Novocastra NCL-Tau-2; dilution 1:500) overnight at 4 °C (Leica Biosystems, Novocastra, St. Gallen, Switzerland). After several washes in PBS, sections were incubated with universal biotinylated horse antibody (Vector, PK-8800; 1:50 dilution; 30 min) (Vector Laboratories Inc., Newark, NJ, USA). Subsequently, sections were incubated with extravidin (Sigma Extra-3, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and peroxidase activity was visualized by incubation with Sigma Fast DAB (Sigma D4168, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at room temperature for 30 min. Finally, sections were counterstained using a modified formaldehyde method with thionin [18], dehydrated, clarified in eucalyptol and mounted with Eukitt. Appropriate negative control assays were carried out to ensure that there was a lack of non-specific labeling and amplification. Thus, similar sections were processed in the same way with a non-immune serum or specifically absorbed serum in place of the primary antibody. Under these conditions, no specific immunostaining was observed.

### 2.5. Immunohistochemistry with Gold Nanocluster (AuNC) for LA-ICP-MS

In gold nanocluster (AuNC) IHC, for the study of the amount of FPN with LA-ICP-MS, the FPN antibody was first bound to an AuNC according to a procedure described in a previous work [15]. After blocking, AuNC-labeled anti-FPN antibody (5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) was added to the sections and incubated overnight at 4 °C. After incubation, a final washing step was performed with PBS, and the slides were stored at  $-20$  °C until LA-ICP-MS analysis.

### 2.6. Registration of LA-ICP-MS

LA-ICP-MS analyses were performed with a commercial LA system (LSX-213 from Teledyne Cetac Technologies, Omaha, NE, USA) coupled to a dual-focus sector ICP-MS field (Item 2, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) working in medium-mass resolution mode to remove polyatomic interferences from the searched isotopes (particularly important for  $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$  interference from  $^{56}\text{Fe}$ ). The commercial ablation cell of the LSX-213 system was replaced with an in-house-built Peltier-cooled ablation chamber with a reduced internal volume that allowed the sample's temperature to be kept constant at  $-20$  °C. LA-ICP-MS coupling was optimized daily using the SRM NIST 612 glass standard for high sensibility and background intensity, as well as the  $^{238}\text{U}/^{232}\text{Th}$  signal ratio, which should be close to 1. The  $^{248}\text{ThO}/^{232}\text{Th}$  signal ratio was also measured to control the formation of rust, and was always below 0.5% in the selected optimized conditions.

Sections of brain tissue were ablated in scanning mode using a laser beam diameter of 10  $\mu\text{m}$ . The overlapping laser points and high repetition rates (20 Hz) resulted in a differential scanning mode, so that better lateral resolution than the selected laser point diameter was achieved (around 5  $\mu\text{m}$ ). Samples were ablated line by line under optimized LA-ICP-MS conditions. In all cases, sections of the human hippocampus were scanned with a laser beam using an average of 70 to 80 individual lines. The experimental conditions were optimized in terms of maximum sensitivity and lateral resolution. For image data processing, the contribution of the gas target was removed from the raw intensity signals to work with net intensities. Two-dimensional images obtained by LA-ICP-MS were created using ImageJ 1.49p software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). A magnification of the image by a factor of six with respect to the actual size of the image (dimensions  $\mu\text{m}$ ) was applied and a bicubic interpolation was made to eliminate pixel aspects.

### 2.7. Preparation of Laboratory Gelatin Standards for Quantitative LA-ICP-MS Measurements

Laboratory gelatin standards were employed to quantitatively analyze the distributions of Fe and FPN (antibody labeled with gold nanoclusters, AuNCs) in sections from human brains. Calibration curves for Au and Fe were created using gelatin standards with concentrations ranging from 0 to 60  $\mu\text{g Au mL}^{-1}$  and from 0 to 52  $\mu\text{g Fe mL}^{-1}$ , respectively. These standards were prepared by mixing 15% gelatin (*w/w*) with  $\text{Na}\cdot\text{AuCl}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  solutions for Au and Fe calibrations, respectively. The mixture was ho-

mogenized by heating and stirring at 60 °C and then frozen at −20 °C. The frozen gelatin standard was cut into 5 µm thick sections and mounted on microscope glass slides, and their Au and Fe concentrations were determined using conventional nebulization ICP-MS after acidic digestion with HNO<sub>3</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [15].

### 2.8. Statistical Analyses

The data were extracted and transferred to SPSS software version 23 (SPSS, Chicago, IL, USA) for the relevant calculations and statistical analysis. Data were tested for normality of populations and homogeneity of variances. Subsequently, Student's two-tailed *t*-tests for mean comparison or one- or two-way analysis of variance (ANOVA) tests were employed, followed by Bonferroni's multiple comparisons test. Differences were considered significant when  $p < 0.05$ . Data in the graphs are presented as means ± SEM.

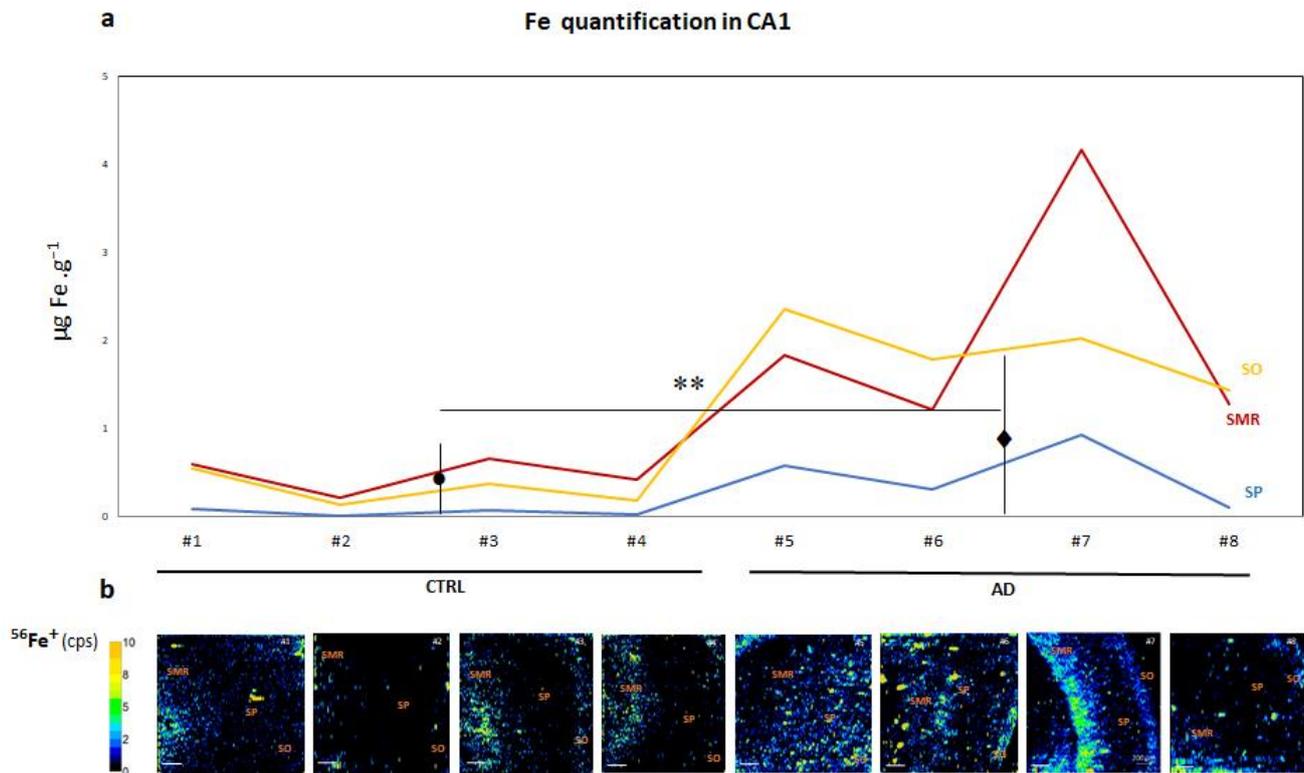
## 3. Results

The technique applied here allowed us to visualize and compare two-dimensional images obtained for FPN (<sup>197</sup>Au<sup>+</sup> signal from Ab-AuNCs) and Fe (<sup>56</sup>Fe<sup>+</sup>) in the CA1 region of the human hippocampus using LA-ICP-MS, under previously reported experimental conditions [11]. This technique provides enough sensitivity to study the distribution pattern of Fe and FPN and to obtain information about its average content in the ablated areas of brain tissue sections of both AD and CTRL. Furthermore, this methodology also enabled us to achieve the mean concentration in selected areas of the two-dimensional images obtained, such as the different layers that form the hippocampus-ablated CA1 region (stratum molecular–radial, SMR; stratum pyramidale, SP; and stratum oriens, SO).

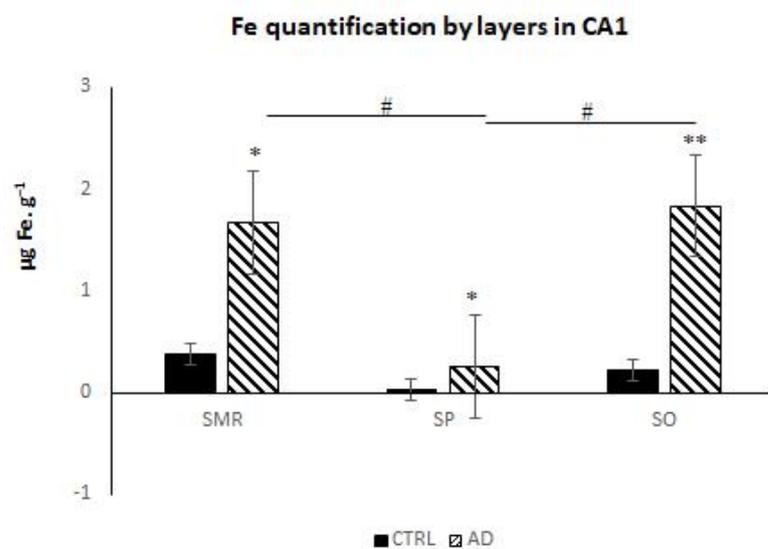
In Figure 1, qualitative images of Fe distribution in the CA1 region of human hippocampus (AD and CTRL) can be observed, as well as the absolute quantification of the Fe concentration (expressed in µg Fe·g<sup>−1</sup>) obtained using LA-ICP-MS in this area. The results demonstrate that human brain tissues exhibited Fe concentrations in the range of 0.3–1.2 µg Fe·g<sup>−1</sup> for CTRL and 2.8–7.1 µg Fe·g<sup>−1</sup> for AD patients. Remarkably, as expected, a statistically significant increase in Fe levels in AD patients ( $1.09 \pm 1.08$ ) was detected compared to CTRL ( $0.2 \pm 0.02$  µg g<sup>−1</sup>) (Figure 1a). A detailed analysis of the qualitative images showed that Fe ions appeared heterogeneously distributed across the layers of the CA1 region of the hippocampus in both CTRL and AD samples.

The Fe concentration, expressed in µg Fe·g<sup>−1</sup>, was calculated for the square-marked area in the qualitative LA-ICP-MS images (see Supplementary Figure S1). In fact, higher Fe levels were observed in fibers and interneuron areas rather than in pyramidal neurons, which is a novel and important observation (Figures 1b and 2). To assess the value of these differences, we quantified the Fe signal in three areas of the CA1, i.e., SMR, SP and SO. The highest concentrations of Fe generally occurred in the SMR and SO regions of AD brains with statistical significance (Figure 2). It can also be observed that the Fe content was higher in the white matter underlying the layers of gray matter. However, quantification was not feasible, as it exceeded the area ablated by the instrument in the CTRL specimens.

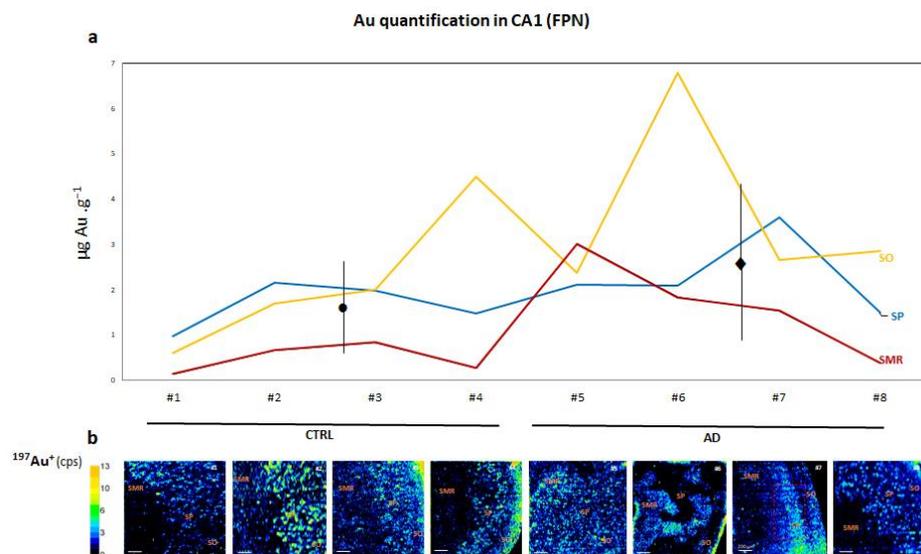
Regarding FPN, we employed an anti-FPN antibody labeled with gold nanoclusters (Au NCs) to obtain information about the average amount in the SMR, SP and SO layers of the hippocampus CA1 region both in CTRL and AD patients. Protein concentration, expressed in µg Au·g<sup>−1</sup>, was calculated for the square-marked area using qualitative LA-ICP-MS images (see Supplementary Figure S1). In this case, values ranged from 0.6 to 4.5 µg Au·g<sup>−1</sup> in CTRL and from 2.3 to 6.8 µg Au·g<sup>−1</sup> in AD patients. Like the Fe data, there seemed to be a slightly trend of FPN increasing in AD (Figure 3a). Moreover, FPN exhibited non-uniform distribution across the different layers of CA1 (see Figure 3a,b). The highest amount of FPN was observed in SO and SP compared with SMR (Figure 4).



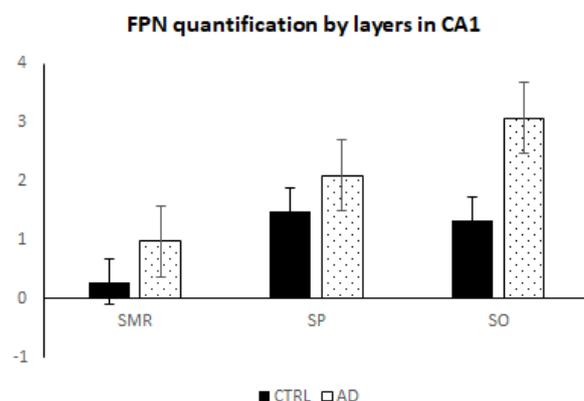
**Figure 1.** (a) Line graph corresponds to average  $^{56}\text{Fe}^+$  concentration obtained in three regions of CA1, stratum molecular–radial (SMR) in red, stratum pyramidale (SP) in blue and stratum oriens (SO) in yellow, from the human hippocampus CA1 region in CTRL (donors #1, #2, #3 and #4) and AD (donors #5, #6, #7 and #8) using LA-ICP-MS (expressed as  $\mu\text{g Fe per g}^{-1}$  of tissue). The average mean values  $\pm$  SEM for the CTRL and AD cases are depicted with black dots and diamonds in the image, respectively. Significant differences were analyzed using Student’s *t*-tests.  $** p < 0.001$  compared to control. (b) The qualitative images obtained for the Fe signal in each CA1 hippocampal sample can be seen below the graph. The color scale refers to the amount of Fe in the image, with the greatest amount in orange-yellow and the lowest amount in black-dark blue. Cps: counts per second. Bars represent 200  $\mu\text{m}$ .



**Figure 2.** Fe quantification (Fe micrograms per gram) via LA-ICP-MS in the different layers of human hippocampus CA1 in AD and CTRL samples: stratum molecular–radial (SMR), stratum pyramidale (SP) and stratum oriens (SO). Bars represent average mean  $\pm$  SEM. Significant differences were analyzed using two-way ANOVA followed by Bonferroni’s post hoc test. #  $p < 0.05$ ,  $** p < 0.001$ ,  $* p < 0.05$ .

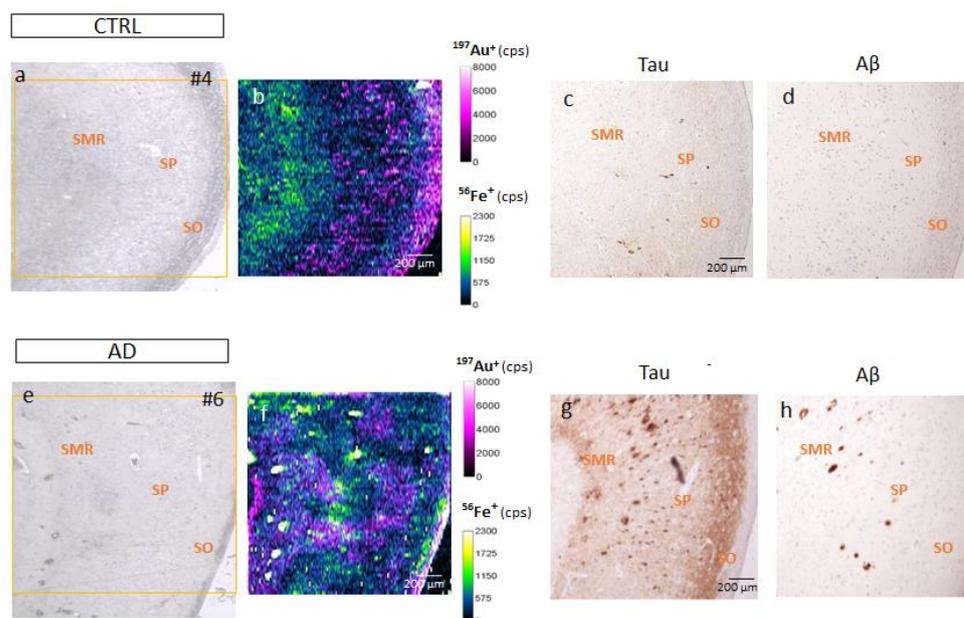


**Figure 3.** (a) Line graph corresponds to average  $^{197}\text{Au}^+$  concentration (FPN) obtained in three regions of CA1: stratum molecular–radial (SMR), stratum pyramidale (SP) and stratum oriens (SO) of human hippocampus CA1 in CTRL (donors #1, #2, #3 and #4) and AD (donors #5, #6, #7 and #8) using LA-ICP-MS (expressed as  $\mu\text{g FPN per g}^{-1}$  of tissue). The average mean values  $\pm$  SEM for the CTRL and AD cases are depicted with black dots and diamonds in the image, respectively. (b) Qualitative images obtained by LA-ICP-MS for  $^{197}\text{Au}^+$  distribution using AuNCs bioconjugated with FPN antibody at  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  concentration can be seen below the graph. The color scale refers to the amount of Au in the image, with the greatest amount in orange-yellow and the lowest amount in black-dark blue. Cps: counts per second. Bars represent 200  $\mu\text{m}$ .



**Figure 4.** FPN quantification (Au micrograms per gram) by LA-ICP-MS in the different layers of human hippocampus CA1 of AD and CTRL samples: stratum molecular–radial (SMR), stratum pyramidale (SP) and stratum oriens (SO). Bars represent average mean  $\pm$  SEM. Significant differences were analyzed using two-way ANOVA followed by Bonferroni’s post hoc test.

To correlate Fe and FPN localization at the CA1 region,  $^{56}\text{Fe}^+$  and  $^{197}\text{Au}^+$  signals were overlapped in the same image (Figure 5); the Fe distribution can be seen in a green-yellow scale, while the FPN distribution is shown in a purple scale (Figure 5b,f). Images show the qualitative 2D images obtained for the distribution of FPN and Fe in the CA1 region after LA-ICP-MS analysis of an AD (#6) and a CTRL (#4) brain tissue section. Upon observation, it became apparent that there was minimal superposition between the signals of Fe and FPN.

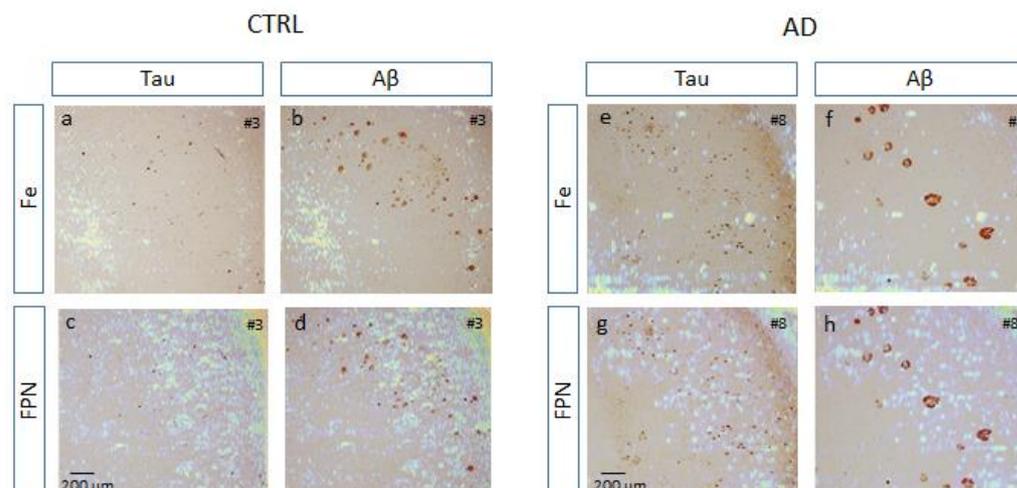


**Figure 5.** Comparison of LA-ICP-MS and IHC images of amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) and Tau in consecutive sections in selected samples of CTRL (#4) and AD (#6). (a,e) Transmission image obtained for selected region (yellow box) in the section of hippocampus CA1 with camera of the laser system after an IHC with FPN-AuNCs. (b,f) Qualitative image obtained using LA-ICP-MS for  $^{56}\text{Fe}^+$  and  $^{197}\text{Au}^+$  (FPN). Distributions of both elements were overlapped for comparison. (c,g) IHC for Tau revealed with DAB chromogen in consecutive section. (d–h) IHC for A $\beta$  revealed with DAB chromogen in consecutive section. Bars represent 200  $\mu\text{m}$ .

In addition, consecutive sections, comparable to those employed for quantifying Fe and FPN, underwent IHC to assess the presence of the two primary markers associated with AD progression, Tau and A $\beta$  proteins (Figure 5). Our examination revealed minimal staining for Tau and A $\beta$  in the CTRL cases. In contrast, the AD cases exhibited pronounced staining for both proteins, albeit with a more irregular pattern observed for A $\beta$ . This approach aimed to investigate the distribution patterns and establish a comparative analysis of the values of Fe and FPN with respect to Tau and A $\beta$  (Figure 5).

Afterwards, the chromogenic images from IHC were superimposed with those obtained from LA-ICP-MS (Figure 6). In this context, Tau exhibited the highest expression in the SP layer of the hippocampus, forming characteristic NFTs within neurons, both in CTRL brains and, to a greater extent, in AD brains. As shown in the merged image (IHC for Tau and LA-ICP-MS for Fe), no significant amount of Fe was seen in areas with A $\beta$  or a large amount of NFTs (Figure 6e,f). However, a substantial overlap of platelets and NFTs with FPN was found in the pyramidal neuron layer (Figure 6g,h). In the SMR layer with a substantial presence of projections, minimal or no staining for Tau or A $\beta$  was observed, but it was characterized by significant Fe accumulation in both CTRL and AD cases (Figure 6a–f). As mentioned above, gray–white matter boundaries were aligned with elevated Fe levels, but reduced FPN levels.

It is noteworthy that, occasionally, large Fe-filled structures corresponding to large blood vessels could be observed in the bioimage when compared with the instrument camera image; it is advisable to take this into consideration (see Supplementary Figure S1 for details).



**Figure 6.** Superposition of images between those obtained by classic IHC for Tau and  $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) and those by LA-ICP-MS in one control (CTRL) (#3) and other Alzheimer's disease (AD) sample (#8). (a) Tau + Fe; (b)  $A\beta$  + Fe; (c) Tau + FPN; (d)  $A\beta$  + FPN of CTRL sample (#3). (e) Tau + Fe; (f)  $A\beta$  + Fe; (g) Tau + FPN; (h)  $A\beta$  + FPN of AD sample (#8). Cortical gray matter from hippocampal area CA1 shows low staining for  $A\beta$  (b,d), Tau, and iron in the control sample, but high FPN in the SP and SO layers. Gray-white matter boundaries coincide with high iron staining (SMR) but low FPN. In the AD sample, the SO layer in the gray matter has moderate iron staining but low  $A\beta$  and Tau staining. The SMR layer has strong  $A\beta$  and Tau staining corresponding to images with high iron content. The SP layer has the lowest iron levels but the highest FPN concentrations. Bars represent 200  $\mu$ m.

#### 4. Discussion

The present study takes advantage of the LA-ICP-MS technique to visualize and compare two-dimensional images of FPN and Fe locations in the CA1 region of the human hippocampus in AD patients. Notably, this technique proved to be sensitive enough to study the distribution patterns of Fe and FPN, and also to provide information about its concentrations in specific CA1 layers such as SMR, SP and SO, enhancing the understanding of the regional distribution of Fe and its cellular transporter, FPN. The LA-ICP-MS alone allowed us to visualize and quantify tissue metal ions, but with the methodological improvement applied here, we could also obtain images of specific proteins in biological tissues using metal-labeled antibodies (gold in our case). This could even be combined with an ICH protocol, which constitutes (with certain limitations of spatial resolution) an interesting alternative to the detection of fluorescence or chromogenic signals, which are commonly used [14,15].

Classical immunofluorescence histochemistry, employed as a method of detection of molecules in the nervous system, has an important limitation; part of the fluorescent emission observed in the images can be attributed to the presence of lipofuscin in the brain. Lipofuscin is an autofluorescent pigment made up oxidized lipids and proteins that accumulates in postmitotic cells with age. It is especially abundant in neurons, and much more so in humans than in other vertebrates. There are treatments to mask the fluorescent emission of lipofuscin (e.g., Sudan Black B); however, such techniques also block the fluorescence of the IHC signal and can only be used when the antigen is expressed in high concentrations [22,23]. This is not the case with the FPN, so this new bioimaging technique has an additional advantage. As demonstrated in this work, metallic NCs could be used as metal ions for analysis and as fluorescent labels for mapping biomolecules of interest in biological tissues, replacing conventional fluorophores. In our case, NCs allow us to achieve double bioimaging of metals by avoiding the lipofuscin fluorescence [24]. Moreover, the use of different NCs to label different analytes is essential for multiparametric analysis [15,25].

Excessive accumulation of Fe in specific brain regions is increasingly being related to AD [7]. In recent decades, many techniques have been used to assess the amount of Fe in the AD brain, and each of these can give rise to biases [26,27]. For example, post mortem Fe testing has the advantage of providing direct measurements of this ion in the brain, which is currently not possible in living people despite the improvements in magnetic resonance imaging (MRI) measurements [26,28]. Quantitative studies based on histological staining (Perl's and Turnbull stain) are imprecise, but offer the possibility of visually evaluating sections at cellular resolution. Specifically, Fe staining allows users to selectively dye non-heme Fe<sup>3+</sup>, Fe<sup>2+</sup> or both [12,13]. By contrast, most physical techniques quantify all the different forms of Fe without distinction [29]. Despite some limitations, such as a reduced spatial resolution that may hinder detailed examination of microstructural features, or the lack of molecular information about the chemical forms of Fe present in the tissue, our post mortem approach offers valuable quantitative insights into nervous tissue, providing marker distribution maps for bioimaging which can be complemented with other techniques to ensure a better understanding of the role of Fe in AD. Notably, with the technique used here, we lost precision iron ionic, but gained quantitative and cytoarchitectonic ones.

The presence of Fe both in lower and upper nervous centers during aging and AD is undeniable, albeit at varying levels [7]. There is also evidence demonstrating the association between Fe accumulation in the brain and cognitive deficits in AD [30]. Previous studies have linked Fe enrichment to the progression of AD and the increasing presence of Tau and A $\beta$  deposits in the cortex [31,32]. In our samples, no significant changes in Fe concentration were observed in the pyramidal stratum despite the presence of NP and numerous NFTs in the CA1 layers of AD brains. The evidence regarding the association between Fe and AD's pathology remains inconclusive for amyloid plaques [12,31,33,34], with only a limited association found with tangles [35,36]. It must be added that, in several reports, the images were undetermined, possibly due to the relatively low Fe content in these specific areas [36,37]. Currently, it is challenging to determine whether elevated levels of Fe and other metals are related to the formation and progression of these aggregates or whether it is a consequence of the Fe increase within the brain parenchyma. It is important to consider that Fe deposition in these pathological features may represent only a small part of the total accumulated Fe load.

Although most studies have focused on the relationship between Fe and pathology-associated proteins in gray matter, both in vivo and post mortem images have demonstrated that the amount of deposited Fe is higher in white matter than in gray matter in both control and AD subjects, at least in the neocortex [11,12,38]. We found that the gray–white matter boundary in SMR coincides with elevated Fe levels in the hippocampus of AD patients. But we have not observed a relationship between layers with a high Fe content and those where the formation of NFT and amyloid plaques is concentrated. Therefore, the role of this ion in the formation of these characteristic features of Alzheimer's disease remains difficult to determine. Perhaps these small amounts of intra- or extracellular Fe may be capable of causing significant cellular damage due to reduced capacity in these areas to combat free radicals.

In the AD research field, it remains unclear whether increases in Fe are due to a failure of its usage (excessive Fe storage), an alteration of the clearance processes (transporter defect) or both. The study of expression of proteins that maintain systemic Fe balance could help in this way. Transferrin (Tf) is the mayor Fe transporter across the blood–brain barrier by Tf receptors (TfR1) that mediates Tf-Fe endocytosis of the endothelium [39]. Another membrane Fe transporter found at the systemic level is divalent metal transporter 1 (DMT1). The presence of TfR1 and DMT1 on the membranes of neurons, astrocytes, oligodendrocytes and microglia suggests that all these brain cells have the capacity to absorb Fe [39]. Furthermore, accumulated evidence demonstrates that Fe efflux from them occurs through a pathway involving FPN. It has been described that the dysregulation of Fe homeostasis in neurodegenerative diseases may depend on the absence of or reduction

in expression of Fe exporters, which could increase the amount of accumulated Fe in the brain [39,40]. We investigated FPN expression and found a slight increasing trend in AD cases, but this increase was not statistically significant. This could be due to the small number of cases, so a more extensive study would be necessary, with the difficulty of finding homogenized processing samples that this entails. However, we observed that FPN is not distributed homogeneously in the CA1 layers, with higher values in the SO and SP layers and lower values in SMR, which corresponds to the areas in which there are a greater number of nerve cells. Some reports have investigated FPN using classical IHC in the human hippocampus, entorhinal cortex and superior frontal gyrus and found reduced labeling assessed using densitometric analysis, which is a less accurate method [4,41]. The same results were found in steady-state protein levels measured by Western blotting using brain tissue (cortex including hippocampus and dentate gyrus) from an animal model of AD (APP-tg mice) [4,41]. The authors showed that FPN is present in normal neurons and astrocytes and could be reduced with age and AD, but more studies are needed to obtain more reliable results [41,42].

It has been suggested that deregulation of FPN could lead to an abnormal accumulation of intracellular Fe, exacerbating oxidative stress and accelerating the neurotoxicity and neurodegeneration associated with AD, but with our results, we cannot corroborate this hypothesis. To gain insight into the correlation between Fe and FPN, signals were overlapped in the same image within the CA1 region. The analysis revealed minimal superposition between them, suggesting an independent distribution. In fact, our data demonstrate that the quantity of FPN in pyramidal cells and interneuron layers does not significantly vary with the disease, suggesting that this protein may still be playing a role in maintaining Fe release, attempting to keep both intra- and extracellular levels low in the region. In contrast, Fe levels increase in AD, particularly in SMR and SO, where there is quantitatively less FPN. This is somehow associated with elevated Fe levels in the tissue parenchyma surrounding projection zones and both myelinated and non-myelinated axons. The excess Fe could be compromising communication and myelination in the area, as is suggested to occur in the white matter.

Beyond the involvement of Fe transporters, recent studies suggest that a breakdown of the blood–brain barrier could be the cause of the progressive accumulation of this ion in the brain parenchyma during aging and AD [43]. On the one hand, dysfunction in blood–brain barrier transport systems lead to the development of A $\beta$  and Tau pathology and neuronal loss. Taking into consideration that the transcellular transport of molecules across endothelial cells may be compromised, it is conceivable that Tf and other Fe-transporting molecules could infiltrate and persist within the neuropil, ready for Fe cellular uptake. On the other hand, this vascular process may be responsible for the progressive reduction in cerebral blood flow, triggering oxidative stress and the subsequent death of astrocytes and neurons, particularly in energy-demanding brain regions like the cortex and hippocampus [43,44]. These changes may be the cause of the increase in Fe that precedes the accumulation and aggregation of A $\beta$  plaques and hyperphosphorylated Tau tangles.

This work also offers a remarkable new perspective on the localization of Fe within the various layers of CA1. While previous attention has been largely directed towards the pyramidal neuron layer, our study did not reveal particularly striking changes in this region. Conversely, the layers containing interneurons and more extensive projections accumulate higher Fe levels in patients with AD. We attempted to elucidate this phenomenon by examining the expression of the cellular Fe exporter FPN, but the data obtained did not provide clear conclusions. It is not possible to determine with this technique whether it is the glial cells or the neurons that maintain FPN levels in the disease. However, what seems clear is that the accumulation of Fe in the hippocampus in AD must have another source or cause besides the dysregulation of the FPN pathway. If it is demonstrated that this ion accumulates pathologically in nervous tissue independently of the failure of the Fe transport/storage system, Fe chelator-based treatments would constitute a promising therapy to combat AD and other related diseases.

These comprehensive results provide valuable insights into the intricate relationships among Fe, FPN and classical markers of AD pathology within the CA1 region of the hippocampus. The non-homogeneous distribution patterns and the minimal correlation between Fe and FPN signals suggest the presence of underlying mechanisms and relatively unexplored regulatory processes governing Fe accumulation and its involvement in the progression of AD. Further research, including the ablation of larger tissue samples, is needed to validate and expand the current findings as well as to fully elucidate the cause and consequences of Fe accumulation as a potential target for therapeutic interventions.

## 5. Future Perspectives

The LA-ICP-MS technique, combined with metal-labeled antibodies, described herein opens new possibilities for improving bioimaging techniques to visualize and quantify not only ions, but also specific proteins in biological tissues. Future research should focus on refining this methodological strategy to obtain more detailed images at the cellular level that provide a better understanding of the distribution and relationship between ion compounds and certain proteins, such as Tau and A $\beta$ , in the context of AD brains. Finally, to obtain a more complete and accurate image of the distribution of Fe and/or other metals in the brain, it would be interesting to validate the results obtained in this study using other diagnostic techniques such as MRI, which would complement the measurements obtained with LA-ICP-MS.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/biom14030295/s1>, Figure S1: Evaluation of Fe distribution in CA1 sections using LA-ICP-MS (laser spot size diameter: 25 mm).

**Author Contributions:** A.N.: conceptualization, data curation, formal analysis, investigation, methodology, validation, writing—review and editing; S.J.: experiments, data visualization and interpretation, writing—original draft preparation; M.C.-A.: experiments, data curation, data visualization and interpretation; E.M.-P.: statistical analysis, writing—review and editing; B.F.: conceptualization, project administration, writing—review and editing; R.P.: funding acquisition, writing—review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Agencia Estatal de Investigación, grant number CTQ2016-79015-R and FEDER, and by FISS Instituto de Salud Carlos III through the project PI15/00601 (co-funded by European Regional Development Fund/European Social Fund “Investing in your future”).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by “Comité Ético de Investigación Clínica Regional del Principado de Asturias” as follows. These studies were granted waivers of consent on the following bases: (i) Samples were gathered retrospectively from pathology archives of necropsies performed for diagnostic purposes; (ii) patient identities were anonymized and completely delinked from unique identifiers; and (iii) there was no risk to the participants.

**Informed Consent Statement:** Written informed consent was obtained from the patient(s) to publish this paper.

**Data Availability Statement:** The datasets generated during and/or analysed during the current study are not publicly available due to privacy/ethical restrictions but are available from the corresponding author on reasonable request.

**Acknowledgments:** Authors thank María Daniela Corte (HUCA) for her support with IHC procedures.

**Conflicts of Interest:** There are no conflicts to declare.

## References

1. Lei, P.; Ayton, S.; Bush, A.I. The Essential Elements of Alzheimer’s Disease. *J. Biol. Chem.* **2021**, *296*, 100105. [[CrossRef](#)]
2. Chen, P.; Miah, M.R.; Aschner, M. Metals and Neurodegeneration. *F1000Research* **2016**, *5*, 1–12. [[CrossRef](#)]
3. Cristóvão, J.S.; Santos, R.; Gomes, C.M. Metals and Neuronal Metal Binding Proteins Implicated in Alzheimer’s Disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 9812178. [[CrossRef](#)]

4. Raha, A.A.; Vaishnav, R.A.; Friedland, R.P.; Bomford, A.; Raha-Chowdhury, R. The Systemic Iron-Regulatory Proteins Hepcidin and Ferroportin Are Reduced in the Brain in Alzheimer's Disease. *Acta Neuropathol. Commun.* **2013**, *1*, 55. [\[CrossRef\]](#)
5. Bandyopadhyay, S.; Rogers, J.T. Alzheimer's Disease Therapeutics Targeted to the Control of Amyloid Precursor Protein Translation: Maintenance of Brain Iron Homeostasis. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *88*, 486–494. [\[CrossRef\]](#)
6. Carocci, A.; Catalano, A.; Sinicropi, M.S.; Genchi, G. Oxidative Stress and Neurodegeneration: The Involvement of Iron. *BioMetals* **2018**, *31*, 715–735. [\[CrossRef\]](#)
7. Connor, J.R.; Snyder, B.S.; Beard, J.L.; Fine, R.E.; Mufson, E.J. Regional Distribution of Iron and Iron-regulatory Proteins in the Brain in Aging and Alzheimer's Disease. *J. Neurosci. Res.* **1992**, *31*, 327–335. [\[CrossRef\]](#)
8. Peters, D.G.; Connor, J.R.; Meadowcroft, M.D. The Relationship between Iron Dyshomeostasis and Amyloidogenesis in Alzheimer's Disease: Two Sides of the Same Coin. *Neurobiol. Dis.* **2015**, *81*, 49–65. [\[CrossRef\]](#)
9. Wang, T.; Xu, S.F.; Fan, Y.G.; Li, L.B.; Guo, C. Iron Pathophysiology in Alzheimer's Diseases. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*; Springer: Singapore, 2019; Volume 1173, pp. 67–104.
10. van Duijn, S.; Nabuurs, R.J.A.; van Duinen, S.G.; Natté, R. Comparison of Histological Techniques to Visualize Iron in Paraffin-Embedded Brain Tissue of Patients with Alzheimer's Disease. *J. Histochem. Cytochem.* **2013**, *61*, 785–792. [\[CrossRef\]](#)
11. van Duijn, S.; Bulk, M.; Van Duinen, S.G.; Nabuurs, R.J.A.; Van Buchem, M.A.; Van Der Weerd, L.; Natté, R. Cortical Iron Reflects Severity of Alzheimer's Disease. *J. Alzheimers Dis.* **2017**, *60*, 1533–1545. [\[CrossRef\]](#)
12. Meguro, R.; Asano, Y.; Odagiri, S.; Li, C.; Iwatsuki, H.; Shoumura, K.; Meguro, R.; Asano, Y.; Odagiri, S.; Li, C.; et al. Nonheme-Iron Histochemistry for Light and Electron Microscopy: A Historical, Theoretical and Technical Review. *Arch. Histol. Cytol.* **2007**, *70*, 1–19. [\[CrossRef\]](#)
13. Meguro, R.; Asano, Y.; Iwatsuki, H.; Shoumura, K. Perfusion-Perls and -Turnbull Methods Supplemented by DAB Intensification for Nonheme Iron Histochemistry: Demonstration of the Superior Sensitivity of the Methods in the Liver, Spleen, and Stomach of the Rat. *Histochem. Cell Biol.* **2003**, *120*, 73–82. [\[CrossRef\]](#)
14. Cruz-Alonso, M.; Fernandez, B.; García, M.; González-Iglesias, H.; Pereiro, R. Quantitative Imaging of Specific Proteins in the Human Retina by Laser Ablation ICPMS Using Bioconjugated Metal Nanoclusters as Labels. *Anal. Chem.* **2018**, *90*, 12145–12151. [\[CrossRef\]](#)
15. Cruz-Alonso, M.; Fernandez, B.; Navarro, A.; Junceda, S.; Astudillo, A.; Pereiro, R. Laser Ablation ICP-MS for Simultaneous Quantitative Imaging of Iron and Ferroportin in Hippocampus of Human Brain Tissues with Alzheimer's Disease. *Talanta* **2019**, *197*, 413–421. [\[CrossRef\]](#)
16. Braak, H.; Braak, E. Neuropathological Stageing of Alzheimer-Related Changes. *Acta Neuropathol.* **1991**, *82*, 239–259. [\[CrossRef\]](#)
17. Martínez-Pinilla, E.; Navarro, A.; Ordóñez, C.; del Valle, E.; Tolivia, J. Apolipoprotein D Subcellular Distribution Pattern in Neuronal Cells during Oxidative Stress. *Acta Histochem.* **2015**, *117*, 536–544. [\[CrossRef\]](#)
18. Tolivia, J.; Navarro, A.; Tolivia, D. Differential Staining of Nerve Cells and Fibres for Sections of Paraffin-Embedded Material in Mammalian Central Nervous System. *Histochemistry* **1994**, *102*, 101–104. [\[CrossRef\]](#)
19. Reusche, E. Silver Staining of Senile Plaques and Neurofibrillary Tangles in Paraffin Sections: A Simple and Effective Method. *Pathol. Res. Pract.* **1991**, *187*, 1045–1049. [\[CrossRef\]](#)
20. Navarro, A.; Tolivia, J.; Del Valle, E. Congo Red Method for Demonstrating Amyloid in Paraffin Sections. *J. Histotechnol.* **1999**, *22*, 305–308. [\[CrossRef\]](#)
21. Navarro, A.; Del Valle, E.; Martínez, E.; Ordóñez, C.; Pérez, C.; Tolivia, J. Highly Selective and Fast Diagnosis of Alzheimer's Disease Hallmark Lesions Using Congo Red in Isopropyl Alcoholic Solution. *J. Alzheimers Dis.* **2013**, *35*, 589–597. [\[CrossRef\]](#)
22. Di Guardo, G. Lipofuscin, Lipofuscin-like Pigments and Autofluorescence. *Eur. J. Histochem.* **2015**, *59*, 2485. [\[CrossRef\]](#)
23. He, D.; Li, T.; Yang, X.; Xu, Y.; Sun, H. Sudan Black B Treatment for Reducing Autofluorescence in Human Glioma Tissue and Improving Fluorescent Signals of Bacterial LPS Staining. *J. Biophotonics* **2023**, *16*, e202200357. [\[CrossRef\]](#)
24. Luo, Z.; Zheng, K.; Xie, J. Engineering Ultrasmall Water-Soluble Gold and Silver Nanoclusters for Biomedical Applications. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 5143–5155. [\[CrossRef\]](#)
25. Khan, I.M.; Niazi, S.; Yue, L.; Zhang, Y.; Pasha, I.; Iqbal Khan, M.K.; Akhtar, W.; Mohsin, A.; Chughati, M.F.J.; Wang, Z. Research Update of Emergent Gold Nanoclusters: A Reinforced Approach towards Evolution, Synthesis Mechanism and Application. *Talanta* **2022**, *241*, 123228. [\[CrossRef\]](#)
26. De Barros, A.; Arribarat, G.; Combis, J.; Chaynes, P.; Péran, P. Matching Ex Vivo MRI with Iron Histology: Pearls and Pitfalls. *Front. Neuroanat.* **2019**, *13*, 68. [\[CrossRef\]](#)
27. Uchida, Y.; Kan, H.; Sakurai, K.; Oishi, K.; Matsukawa, N. Quantitative Susceptibility Mapping as an Imaging Biomarker for Alzheimer's Disease: The Expectations and Limitations. *Front. Neurosci.* **2022**, *16*, 938092. [\[CrossRef\]](#)
28. Van Oostveen, W.M.; de Lange, E.C.M. Imaging Techniques in Alzheimer's Disease: A Review of Applications in Early Diagnosis and Longitudinal Monitoring. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 2110. [\[CrossRef\]](#)
29. Bulk, M.; Abdelmoula, W.M.; Geut, H.; Wiarda, W.; Ronen, I.; Dijkstra, J.; van der Weerd, L.; Breimer, W.; Lebedev, N.; Webb, A.; et al. Quantitative MRI and Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry Imaging of Iron in the Frontal Cortex of Healthy Controls and Alzheimer's Disease Patients. *Neuroimage* **2020**, *215*, 116808. [\[CrossRef\]](#)
30. Ayton, S.; Wang, Y.; Diouf, I.; Schneider, J.A.; Brockman, J.; Morris, M.C.; Bush, A.I. Brain Iron Is Associated with Accelerated Cognitive Decline in People with Alzheimer Pathology. *Mol. Psychiatry* **2020**, *25*, 2932–2941. [\[CrossRef\]](#)

31. Falangola, M.F.; Lee, S.P.; Nixon, R.A.; Duff, K.; Helpert, J.A. Histological Co-Localization of Iron in A $\beta$  Plaques of PS/APP Transgenic Mice. *Neurochem. Res.* **2005**, *30*, 201–205. [[CrossRef](#)]
32. Meguro, R.; Asano, Y.; Odagiri, S.; Li, C.; Shoumura, K. Cellular and Subcellular Localizations of Nonheme Ferric and Ferrous Iron in the Rat Brain: A Light and Electron Microscopic Study by the Perfusion-Perls and -Turnbull Methods. *Arch. Histol. Cytol.* **2008**, *71*, 205–222. [[CrossRef](#)]
33. Nikparast, F.; Ganji, Z.; Danesh Doust, M.; Faraji, R.; Zare, H. Brain Pathological Changes during Neurodegenerative Diseases and Their Identification Methods: How Does QSM Perform in Detecting This Process? *Insights Imaging* **2022**, *13*, 74. [[CrossRef](#)]
34. Ayton, S.; Fazlollahi, A.; Bourgeat, P.; Raniga, P.; Ng, A.; Lim, Y.Y.; Diouf, I.; Farquharson, S.; Fripp, J.; Ames, D.; et al. Cerebral Quantitative Susceptibility Mapping Predicts Amyloid- $\beta$ -Related Cognitive Decline. *Brain* **2017**, *140*, 2112–2119. [[CrossRef](#)]
35. Spotorno, N.; Acosta-Cabronero, J.; Stomrud, E.; Lampinen, B.; Strandberg, O.T.; van Westen, D.; Hansson, O. Relationship between Cortical Iron and Tau Aggregation in Alzheimer’s Disease. *Brain* **2020**, *143*, 1341–1349. [[CrossRef](#)]
36. Cogswell, P.M.; Fan, A.P. Multimodal Comparisons of QSM and PET in Neurodegeneration and Aging. *Neuroimage* **2023**, *273*, 120068. [[CrossRef](#)]
37. Cogswell, P.M.; Wiste, H.J.; Senjem, M.L.; Gunter, J.L.; Weigand, S.D.; Schwarz, C.G.; Arani, A.; Therneau, T.M.; Lowe, V.J.; Knopman, D.S.; et al. Associations of Quantitative Susceptibility Mapping with Alzheimer’s Disease Clinical and Imaging Markers. *Neuroimage* **2021**, *224*, 117433. [[CrossRef](#)]
38. Hare, D.J.; Raven, E.P.; Roberts, B.R.; Bogeski, M.; Portbury, S.D.; McLean, C.A.; Masters, C.L.; Connor, J.R.; Bush, A.I.; Crouch, P.J.; et al. Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry Imaging of White and Gray Matter Iron Distribution in Alzheimer’s Disease Frontal Cortex. *Neuroimage* **2016**, *137*, 124–131. [[CrossRef](#)]
39. Qian, Z.M.; Ke, Y. Brain Iron Transport. *Biol. Rev.* **2019**, *94*, 1672–1684. [[CrossRef](#)]
40. Zhao, Z.; Nelson, A.R.; Betsholtz, C.; Zlokovic, B.V. Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell* **2015**, *163*, 1064–1078. [[CrossRef](#)]
41. Raha, A.A.; Biswas, A.; Henderson, J.; Chakraborty, S.; Holland, A.; Friedland, R.P.; Mukaetova-Ladinska, E.; Zaman, S.; Raha-Chowdhury, R. Interplay of Ferritin Accumulation and Ferroportin Loss in Ageing Brain: Implication for Protein Aggregation in Down Syndrome Dementia, Alzheimer’s, and Parkinson’s Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1060. [[CrossRef](#)]
42. Bao, W.-D.; Pang, P.; Zhou, X.-T.; Hu, F.; Xiong, W.; Chen, K.; Wang, J.; Wang, F.; Xie, D.; Hu, Y.-Z.; et al. Loss of Ferroportin Induces Memory Impairment by Promoting Ferroptosis in Alzheimer’s Disease. *Cell Death Differ.* **2021**, *28*, 1548–1562. [[CrossRef](#)]
43. Zlokovic, B. V Neurovascular Pathways to Neurodegeneration in Alzheimer’s Disease and Other Disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* **2011**, *12*, 723–738. [[CrossRef](#)]
44. Montagne, A.; Zhao, Z.; Zlokovic, B.V. Alzheimer’s Disease: A Matter of Blood-Brain Barrier Dysfunction? *J. Exp. Med.* **2017**, *214*, 3151–3169. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.