

M. EN C. NELLY JOVANA
PASTÉNCASTREJÓN

EFFECTO DEL PIROFOSFATO DE TIAMINA SOBRE LA MICROGLÍA Y LAS
ESPINAS DENDRÍTICAS EN EL MODELO MURINO 3XTG-AD PARA LA
ENFERMEDAD DE TIPO ALZHEIMER

2025



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Medicina

**EFFECTO DEL PIROFOSFATO DE TIAMINA SOBRE LA
MICROGLÍA Y LAS ESPINAS DENDRÍTICAS EN EL MODELO
MURINO 3XTG-AD PARA LA ENFERMEDAD DE TIPO
ALZHEIMER**

Tesis

Que como parte de los requisitos
para obtener el grado del

DOCTORADO EN BIOMEDICINA

Presenta

M. en C. Nelly Jovana Pastén Castrejón

Dirigido por:

Dr. Pablo García Solís

Co-Director:

Dr. Alfredo Varela Echavarría

Querétaro, Qro. Octubre 2025

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

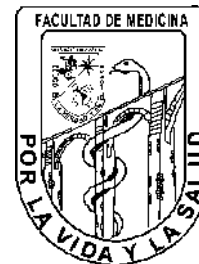
Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE MEDICINA
DOCTORADO EN BIOMEDICINA**



**EFFECTO DEL PIROFOSFATO DE TIAMINA SOBRE LA
MICROGLÍA Y LAS ESPINAS DENDRÍTICAS EN EL
MODELO MURINO 3XTG-AD PARA LA
ENFERMEDAD DE TIPO ALZHEIMER**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA

Presenta

M. en C. Nelly Jovana Pastén Castrejón

Dirigido por:

Dr. Pablo García Solís

Co-dirigido por:

Dr. Alfredo Varela Echavarría

SINODALES

Dr. Pablo García Solís
Presidente

Firma

Dr. Alfredo Varela Echavarría
Secretario

Firma

Dr. Hebert Luis Hernández Montiel
Vocal

Firma

Dra. María Carlota García Gutiérrez
Suplente

Firma

Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda
Suplente

Firma

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Octubre 2025
MÉXICO

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un síndrome neurodegenerativo, progresivo e irreversible resultado de la interacción entre factores genéticos y epigenéticos que, se manifiesta a través de la alteración de la homeostasis del metabolismo energético, la pérdida de espinas dendríticas (ED) y la neuroinflamación mediada por microglía. La evidencia sugiere que, la disfunción microglial, asociada a la pérdida de sus funciones de restauración de la homeostasis, vigilancia y protección del parénquima cerebral, como la fagocitosis y el control de la inflamación, dependientes de su flexibilidad metabólica, ocurre en contexto de la acumulación de péptido β -amilode (β A), un rasgo común en la EA de aparición tardía. En el modelo 3xTg-AD, la disfunción metabólica en la microglía contribuye al ambiente degenerativo caracterizado por inflamación crónica y la sinaptopatía o remodelación anormal de las ED. Por lo que restaurar la aptitud metabólica microglial, mediante estrategias dirigidas a vías dependientes de la tiamina, podría recalibrar sus funciones, preservando la integridad sináptica y rescatando la memoria. El tratamiento y/o suplementación coadyuvante con Pirofosfato de Tiamina (TPP) favorece la eliminación del β A, al regular la función metabólica microglial, pues tiene un papel fundamental en el metabolismo aeróbico intermedio de la glucosa. El TPP actúa específicamente en el complejo enzimático de la Piruvato deshidrogenasa (PDH) donde participa promoviendo la transición de la glucólisis al ciclo de Krebs, permitiendo la síntesis de acetil-CoA a partir del piruvato y la obtención de ATP a partir de la fosforilación oxidativa (OXPHOS). Nuestros resultados mostraron que el tratamiento crónico con TPP indujo modificaciones morfológicas significativas en la microglía de las regiones de CA1 y SUB, en un análisis con MorphoGlia. Simultáneamente, observamos una modulación del estado funcional asociado a un perfil menos reactivo, lo que atenuó la neuroinflamación, mantuvo la función cognitiva y la densidad de las ED de los cerebros del modelo de ratón 3xTg-AD para la enfermedad de tipo Alzheimer. En conclusión, el TPP representa un tratamiento coadyuvante prometedor que nos permite explorar nuevas estrategias de intervención dirigidas a múltiples mecanismos de EA al mismo tiempo, y que podría prevenir el avance de la patología y mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Palabras clave: Pirofosfato de tiamina, modulación de la microglía, MorphoGlia, modelo murino 3xTg-AD, β -amiloide, neuroinflamación, hipocampo, deterioro cognitivo.

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative, progressive, and irreversible syndrome resulting from the interplay between genetic and epigenetic factors, which manifests through the disruption of energy metabolism homeostasis, the loss of dendritic spines (DS), and microglia-mediated neuroinflammation. Evidence suggests that microglial dysfunction, associated with the loss of its homeostatic restoration, surveillance, and brain parenchyma protection functions, such as phagocytosis and inflammation control, dependent on its metabolic flexibility, occurs in the context of β -amyloid peptide ($A\beta$) accumulation, a common feature in late-onset AD. In the 3xTg-AD model, metabolic dysfunction in microglia contributes to the degenerative environment characterized by chronic inflammation and synaptopathy or abnormal DS remodeling. Therefore, restoring microglial metabolic fitness through strategies targeting thiamine-dependent pathways could recalibrate its functions, preserving synaptic integrity and rescuing memory. Adjunctive treatment and/or supplementation with Thiamine Pyrophosphate (TPP) favors $A\beta$ clearance by regulating microglial metabolic function, as it plays a fundamental role in intermediate aerobic glucose metabolism. TPP specifically acts on the Pyruvate dehydrogenase (PDH) enzyme complex, where it participates by promoting the transition from glycolysis to the Krebs cycle, allowing the synthesis of acetyl-CoA from pyruvate and ATP production from oxidative phosphorylation (OXPHOS). Our results showed that chronic treatment with TPP induced significant morphological modifications in the microglia of the CA1 and SUB regions in the MorphoGlia analysis. Simultaneously, we observed a modulation of the functional state associated with a less reactive profile, which attenuated neuroinflammation, maintained cognitive function, and the DS density of the brains of the 3xTg-AD mouse model for Alzheimer's-like disease. In conclusion, TPP represents a promising adjunctive treatment that allows us to explore new intervention strategies targeting multiple AD mechanisms simultaneously and that could prevent the progression of the pathology and improve the quality of life of patients.

Keywords: Thiamine Pyrophosphate, microglial modulation, MorphoGlia, 3xTg-AD model, β -amyloid, neuroinflammation, hippocampus, cognitive impairment.

DEDICATORIAS

A mis padres quienes siempre han creído en mí, me han apoyado a lo largo mi vida, otorgándome un capital cultural, social y económico que me permitió llegar hasta este grado de estudios sin dificultades. Les agradezco profundamente todo el soporte familiar, su cuidado, orientación y el entorno estable que fue indispensable para mi realización académica y personal. Valoro demasiado su visión transdisciplinaria, me ha dado la capacidad de reconocer mi potencial para contribuir a la sociedad resolviendo problemas de salud desde el laboratorio, haciendo que la ciencia sea traslacional.

A mi hermano Alan Pastén, cuya admiración es mi motor para seguir adelante, intentando mostrarle un camino para que crezca aún más que yo, a pesar de ser la mayor. Él ha sido mi fan más incondicional, quien leyó mis tesis y encontró en ellas la inspiración para una tesina que escribió con amor y gran talento, aunque no fuera necesaria, solo para reconocermme. Confieso que es una de mis personas favoritas en el planeta y aunque ya no compartimos tanto tiempo, siempre valoro nuestros momentos en el “KCC”.

A mi esposo Israel Poblano porque sin él a mi lado este viaje no hubiera sido tan entretenido, intenso, retador, divertido, interesante, y aunque a veces lento, ha sido sobre todo exitoso. Lo amo con todo mi corazón y mi sistema límbico. Sin duda he aprendido mucho de él, tanto académicamente, como en su actitud; especialmente aquellas cualidades constructivas que con cariño me ha compartido, como la resiliencia, la paciencia, la humildad y la flexibilidad.

A mis compañeros Víctor (Rafa) y Cinthia, lamento que la pandemia por COVID-19 nos haya convertido en “zoomers”, impidiéndonos compartir más tiempo juntos. Sin embargo, agradezco enormemente que sus críticas, preguntas y reflexiones fueran la base para el desarrollo de mi proyecto y la mejora de mi idea inicial. Gracias, siempre los tendré en alta estima.

A mis profesores, Dra. Sofía, Dr. Pablo, Dr. Varela, Dra. Ana Gaby, Dra. Ana, Dra. Liceth, Dra. Villagrán, Dra. Haydé, Dra. Carlota, Dra. Jheny, Dr. Juan Carlos, Dr. Hebert, Dra. Carmen, Dr. Rubén, Dra. Rosita, entre otros, porque me facilitaron el conocimiento y me brindaron toda su experiencia a lo largo de mi formación, les estaré eternamente agradecida.

A mis amigos y a mis estudiantes porque, aunque no dimensionaban la importancia de lo que este trabajo significaba para mí, siempre me escuchaban hablar de la microglía, de mis ratones y el maravillosísimo, único e inigualable “TPP”. Se interesaban por si avanzaba, me salían mis experimentos o no y me daban toda su comprensión y afecto. Gracias a Gloria, Steph, Kevin, Andrés, Isaac, Gaby, Daniela, Brenda, Anallely, Humberto, Paco y Esau.

A mis ratones, cuyo sistema nervioso central ha sido un modelo invaluable para esta investigación. Sin su participación, este trabajo y los descubrimientos que lo precedieron no habrían sido posibles.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro mi *Alma Mater*, la universidad que no sólo me formó como un ser humano integral y un honesto ciudadano, bajo el lema "Educo en la Verdad y en el Honor", valores de suma importancia, que asumo para reproducirlos a lo largo de mi vida. También apoyó mi crecimiento como investigadora brindándome experiencias académicas de calidad y la interacción con profesores ampliamente preparados con líneas de investigación sólidas que tienen una gran capacidad para transmitir el conocimiento.

Al Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México y al apoyo del Centro de Investigación Biomédica Avanzada (CIBA) de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro, por brindarme las instalaciones donde llevé a cabo el desarrollo y los experimentos de esta investigación.

Al apoyo económico brindado por CONACYT 764489 de becas nacionales para posgrado.

A los apoyos económicos del Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría (FOPER) 2021-FME02355 y 2022-FME02688.

Al apoyo del Fondo para el Fortalecimiento de la Investigación, Vinculación y Extensión (FONFIVE-UAQ-2024).

A la Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda por ser mi mentora y profesora más cercana, por siempre estar al pendiente de mi trabajo, mis resultados y mis necesidades, por todo su apoyo y sus valiosas recomendaciones académicas y por ser parte importante de mi comité tutor.

Al Dr. Pablo García Solís por su dirección, sus importantes aportaciones a mi desarrollo como persona y doctorante, así como su guía en el desarrollo de este trabajo y todas sus atenciones. Agradezco profundamente la libertad e independencia que me concedió desde el inicio para plantear este proyecto y aun así acompañarme en su estudio y entendimiento profundo.

Al Dr. Alfredo Varela Echavarría por su co-dirección y por aceptarme como su alumna, por permitirme un lugar en su laboratorio y brindarme su tiempo para resolver dudas y discutir resultados, gracias por formar parte significativa de mi aprendizaje y crecimiento.

Al Dr. Hebert Luis Hernández Montiel por su asesoría, mentoría y ayuda en el desarrollo de este proyecto y todo su apoyo en mi formación dentro y fuera de la investigación. Gracias por compartir su conocimiento, su visión crítica y su experiencia.

A la Dra. María Carlota García Gutiérrez por su asesoría y por fungir como parte de comité tutorial a lo largo de mi formación.

A la Dra. Gloria Yareli Gutiérrez Silerio por su asesoría y su apoyo en al aprendizaje de técnicas moleculares, así como la revisión de mi trabajo. Su apoyo ha sido fundamental no solo en el ámbito académico y de investigación, sino también en lo personal. Gracias por confiar en mí, por compartir su conocimiento con tanta dedicación y por inspirarme a crecer con ética, rigor y pasión por la ciencia.

Al Dr. Isaac Vargas Rodríguez por su asesoría y apoyo en el procesamiento de imágenes y en la discusión de resultados preliminares.

A los Técnicos Académicos Azucena Ruth Aguilar Vázquez y Carlos Lozano Flores por su asesoría y apoyo técnico en el desarrollo de este proyecto y por contribuir a resolver todos los problemas técnicos que surgieron.

A la M. en C. Adriana González Gallardo por su asesoría y apoyo en técnicas moleculares y por concederme siempre un espacio cómodo y tranquilo para trabajar.

A la Dra. Ana Gabriela Hernández Puga por ser mi tutora de seguimiento y estar al pendiente de mis necesidades académicas y personales. Además de ser mi jefa directa cuando tuve la oportunidad de trabajar como auxiliar administrativo para la Maestría en Ciencias en Neurometabolismo de la cual es coordinadora.

A la Dra. Ana Alicia Sánchez Tusie por sus comentarios y revisiones a cerca de mi trabajo. Por compartir la emoción de lo obtenido con mis datos y su escucha activa y atención al revisar mis figuras.

A la Dra. Ma. Elena Villagrán por sus comentarios sobre mi trabajo y por brindarme la oportunidad de acceder a un ingreso económico a partir del trabajo administrativo dentro de la FM-UAQ mientras culminaba mi proceso de titulación. Gracias por confiar en mí.

Al Dr. Humberto Martínez Orozco por su apoyo en el desarrollo de la publicación, experimentos y por sus comentarios y correcciones. Por su paciencia y confianza.

Al M. en C. Juan Pablo Maya Arteaga por su asesoría y apoyo en el procesamiento de datos e imágenes de la microglía y por el desarrollo del software MorphoGlia. Gracias por apoyarme con la discusión y ser crítico con los datos.

A la Dra. Karla Carmina Rojas Saavedra por su asesoría y comentarios sobre mi trabajo, por compartir conmigo su *expertise* sobre la Enfermedad de Alzheimer y el tratamiento en pacientes. Gracias delegarme actividades que me permitieran salir de mi zona de confort y aplicar mis conocimientos en un contexto real.

Al M.V.Z. José Martín García Servín y a la Dra. María A. Carbajo Mata por su asesoría y apoyo técnico en el cuidado, mantenimiento, crianza y cirugía de los animales del bioterio aprovechados en este proyecto.

A la Dra. Alejandra Castilla León por su especial ayuda en la manipulación de mis animales experimentales y por estar siempre atenta de mis necesidades dentro y fuera del bioterio. Gracias por confiar en mí y por enseñarme lo importante de seguir las reglas al tener ética y rigor en el trato con los animales de este y todos los proyectos.

A la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos de la Unidad de Microscopia por su apoyo técnico en la captura de imágenes y asesoría en microscopía confocal. Gracias por tenerme paciencia, capacitarme, resolver todas mis dudas y confiar en mí.

A la Dra. Ericka A. de los Ríos Arellano por su asesoría y apoyo en materia de histología y microscopía de campo claro. Gracias por ayudarme con la estandarización de la técnica de Golgi.

Al M. en C. Oscar Leonardo Ruíz Hernández jefe del departamento de compras al extranjero por estar siempre al pendiente y acelerar los procesos de mis peticiones. Gracias por tu amistad, por escucharme y por confiar en mí.

A mis compañeros de trabajo en la UAQ, Daiyé Molinet, Adela Vélez, Yair Ugalde, Benito Quintero, María Antonieta, Jorge, así como en el Tec de Monterrey, Karla Rojas, Gloria Gutiérrez, Diana Romano, Jorge Vázquez, Ana Sibaja, y muchos otros por aconsejarme, ayudarme a ser mejor persona, más resiliente, más empática y superarme académicamente.

A mis compañeros de laboratorio Sergio de Anda, Erika Orta, Humberto Martínez, Isaac Vargas, Laura Pinedo, Jesús Mancilla, Zyanya Mena, Esau Urbina, Anallely Pantoja, Jesús Andrade, Fausto Sanabria, Paola Bello, Ana María, Alex, Yolis, Luz, Agnes, Valeria, Paco, a quienes están y a quienes han pasado por el C-02: Gracias por ser parte de un espacio tan desafiante como formativo. Con cada conversación, desacuerdo, risa compartida o tensión cotidiana, me enseñaron que los seres humanos somos profundamente complejos, y que convivir en comunidad —incluso en medio del caos— requiere empatía, resiliencia y una voluntad constante de ver más allá de uno mismo. Aprendí que la ciencia no solo se construye con datos y ensayos, sino también con vínculos humanos, a veces incómodos, pero siempre reveladores. Agradezco lo que cada uno aportó a mi experiencia, me ayudaron a crecer, a fortalecer mi carácter y a reafirmar mi compromiso con un quehacer científico más humano, más ético y más colaborativo.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	13
II. ANTECEDENTES	14
<i>Epidemiología de la Enfermedad de Alzheimer</i>	14
<i>Descubrimiento de la Enfermedad de Alzheimer</i>	16
<i>Fisiopatología</i>	18
Péptido β -amiloide	18
Proteína tau	20
Neuroinflamación y microglía	21
Metabolismo de la microglía en la neurodegeneración	23
<i>Microglía asociada a la degeneración o DAM</i>	26
<i>Morfología y fenotipo microglial</i>	27
<i>Fagocitosis microglial y sinaptopatía</i>	30
<i>Espinas dendríticas y memoria</i>	32
<i>Modelo 3xTg-AD</i>	35
<i>Pirofosfato de Tiamina</i>	37
Tiamina	37
Metabolismo de la Tiamina	37
Benfotiamina	41
<i>TPP y neurodegeneración</i>	42
<i>Puente entre la investigación y la atención clínica</i>	45
III. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	48
<i>Justificación</i>	48
<i>Pregunta de investigación</i>	50
IV. HIPÓTESIS	51
V. OBJETIVOS	51
<i>General</i>	51
<i>Particulares</i>	51
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	52
<i>Tipo de Investigación</i>	52
Animales	52

Implantación de bombas osmóticas y grupos experimentales	53
<i>Conducta</i>	53
Construcción del nido.....	53
Laberinto Acuático de Morris	54
<i>Punto final humanitario</i>	54
<i>Procesamiento del tejido</i>	55
Inmunohistoquímica.....	55
Tinción Golgi-Cox	56
Microscopía y análisis de imagen	57
Obtención de ARN para RT- qPCR	57
Síntesis de ADNc y condiciones de RT-qPCR	57
<i>Análisis estadístico</i>	58
VII. CONSIDERACIONES BIOÉTICAS	58
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
El TPP mejora el desempeño cognitivo del modelo 3xTg-AD.....	60
El TPP tiene un efecto sobre la morfología microglial del hipocampo	63
Remodelación microglial específica por región en ratones 3xTg-TPP	66
El TPP modula la morfología y la complejidad de la microglía en el hipocampo.....	67
Los clústeres morfológicos microgliales revelan efectos región-dependientes del tratamiento con TPP	69
El tratamiento con TPP modula la expresión génica proinflamatoria y metabólica en el hipocampo	72
Efecto del TPP sobre las espinas dendríticas del hipocampo.....	77
IX. CONCLUSIONES	81
X. BIBLIOGRAFÍA	82
XI. ANEXOS.....	88
1. Secuencias de oligonucleótidos estandarizados utilizados en el proyecto de investigación.....	88
2. Estandarización y validación de oligonucleótidos por RT-qPCR	89
3. Artículo científico publicado derivado del trabajo de tesis	89

ABREVIATURAS

PPT, TPP	Pirofosfato de Tiamina, Thiamine Pyrophosphate
TG TPP	Transgénico tratado con pirofosfato de tiamina
TG SS	Transgénico tratado con solución salina
NoTG TPP	No Transgénico tratado con pirofosfato de tiamina
NoTG SS	No Transgénico tratado con solución salina
μm	micrómetros
3xTg-AD	Modelo Triple Transgénico para la Enfermedad de Alzheimer
A+B	Sistema de amplificación de avidina y biotina
ACL	Alteración Cognitiva Leve
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico de doble cadena
AICD	Dominio intracelular de la proteína precursora amiloide (siglas en inglés)
APOE	Apolipoproteína E
APP	Proteína Precursora Amiloide (siglas en inglés)
APP695-SWE	APP con mutación sueca humana
APPsα	Forma secretada de la proteína precursora amiloide
ARN	Ácido ribonucleico
ATN	Sistema diagnóstico Amiloidosis, Taupatía, Neurodegeneración
ATP	Adenosin Trifosfato
BAM-10	Anticuerpo contra β-amiloide total
BCKDC	Complejo deshidrogenasa de alfa-cetoácidos de cadena ramificada (siglas en inglés)
BHE	Barrera Hematoencefálica
C1q, C3	Componente del complemento 1q, 3
CA	Cornus de Amonis
CAT	Enzima catalasa
CD	Clúster de Diferenciación
Cdk5/p25	asociación entre la quinasa dependiente de ciclina 5 (Cdk5) y la proteína p25
CoA	Coenzima-A
Cx3cr1	Receptor de fractalquina
DAM	Microglía Asociada a Degeneración (siglas en inglés)
DAP/TYROBP	proteína adaptadora en la señalización de los receptores de las células Natural Killer (NK) y células mieloides
DCL	Deterioro Cognitivo Leve

DDR	Receptor del dominio de discoidina
EA, AD	Enfermedad de Alzheimer, Alzheimer Disease
ED	Espinas Dendríticas
EROs, ERNs	Especies Reactivas de Oxígeno, y de Nitrógeno
FcR	Receptor de Fragmento cristalizable (siglas en inglés)
GSH	Tripéptido de glutatión
GSK-3β	Glucógeno Sintasa Quinasa 3 beta
h	horas
HACL1	2-Hydroxyacyl-CoA Liasa 1
Iba-1	Anticuerpo contra proteína adaptadora de unión a calcio ionizado 1
INFγ	Interferón gamma
iNOS, NOSII	Óxido Nítrico Sintasa inducible, II
Itgax	gen que codifica para la integrina alfa X, también conocida como CD11c
KO	Knock Out, eliminación de un gen específico
LAM	Laberinto acuático de Morris
LCR	Líquido cefalorraquídeo
Lgals3	gen humano que codifica la proteína galectina-3 (Gal-3)
LPS	Lipopolisacárido
M	molar
m.d.e.	Meses de edad
MAPk	cinasas activadoras de mitógenos (siglas en inglés)
MBS	Marcadores sanguíneos (siglas en inglés)
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos 1
MEC	Matriz extracelular
mg	miligramos
Mg, Ca	Magnesio, Calcio
MNFs	Marañas Neurofibrilares
mTOR	receptor de la rapamicina mamífera (siglas en inglés)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NFκB	factor nuclear kappa B
NLR, TLR	Receptor tipo NOD, TOLL
NO	Óxido Nítrico
OXPHOS	Fosforilación oxidativa (siglas en inglés)
P2ry12	Quimiorreceptor purinérgico, específicamente para Adenosín Difosfato (ADP)

P3	Fragmento péptido β -amiloide (A β) 17–40/42
PAMPs, DAMPs	Patrón Molecular Asociado a Patógenos, y Daño (siglas en inglés)
PBS, PBS-T	Buffer de fosfatos de sodio, con detergente (siglas en inglés)
PDH	Piruvato Deshidrogenasa
PDK1	piruvato deshidrogenasa quinasa 1
PFA	Paraformaldehído
pH	Potencial de hidrógeno
PHF	Filamento Helicoidal Emparejado (siglas en inglés)
PI3k	fosfatidilinositol 3-quinasa (siglas en inglés)
PKB/Akt	serina/treonina quinasa de la vía PI3K/AKT
PRR	Receptor de Reconocimiento de Patrones
PS1-M146V	Transgén que codifica el gen PSEN1 humano, mutación M146V
px	pixel
SLC	Gen de la familia de los portadores de soluto (siglas en inglés)
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD	Enzima superóxido dismutasa
Sub	<i>Subiculum</i> , subículo
TauP301L	P301L es una de las variantes de MAPT más comunes
TGFβ	Factor de Crecimiento Transformante Beta
ThTR	Transportador de Tiamina (siglas en inglés)
TMEM119	Proteína transmembrana 119
TMP	Monofosfato de tiamina (siglas en inglés)
TPK1	Tiamina pirofosfato quinasa 1
TPPT	Transportador de Pirofosfato de Tiamina
TPT	Trifosfato de Tiamina (siglas en inglés)
TREM2	Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2
α, β, γ secretasas	Enzimas cortadoras de APP
α-CTF	Fragmento α -C terminal
α-KGDH	Alfa cetoglutarato deshidrogenasa
βA	Péptido β -amiloide

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo progresivo e irreversible que afecta a millones de personas en todo el mundo, constituyendo la principal causa de demencia en adultos mayores (OMS, 2025). Esta patología se caracteriza por alteraciones neuropatológicas características, como la acumulación extracelular de placas de péptido β -amiloide (β A), la hiperfosforilación de la proteína tau, y una neuroinflamación sostenida que contribuye a la pérdida de sinapsis y funciones cognitivas (Blurton-Jones & LaFerla, 2006; Cole et al., 2010; Wu et al., 2020). En este contexto, la microglía, como principal célula inmunitaria del sistema nervioso central, desempeña un papel crucial en la vigilancia, respuesta inflamatoria y mantenimiento de la homeostasis neuronal (Calsolaro & Edison, 2016; Song & Colonna, 2018). Sin embargo, la disfunción metabólica de la microglía, en particular la alteración en su capacidad para adaptarse metabólicamente al entorno neurodegenerativo, ha emergido como un factor relevante que exacerba el deterioro neuronal en la EA (Baik et al., 2019b; Keren-Shaul, Spinrad, Weiner, Matcovitch-Natan, Dvir-Szternfeld, Ulland, David, Baruch, Lara-Astaiso, Toth, Itzkovitz, et al., 2017).

Diversas investigaciones han mostrado que modificaciones en el metabolismo microglial relacionadas con vías dependientes de la tiamina modulan su función y capacidad fagocítica frente al β A, destacando el receptor TREM2 y la señalización mediada por la ruta mTOR como elementos clave en este proceso (Ulland et al., 2017). No obstante, persisten debates respecto al modelo de activación microglial predominante en distintas etapas de la EA y cómo estas variaciones afectan la progresión de la enfermedad. El tratamiento con pirofosfato de tiamina (TPP), una forma bioactiva de tiamina que actúa sobre el complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDH), que hemos propuesto, como una terapia coadyuvante capaz de restaurar el metabolismo aeróbico microglial, promover la eficiencia energética y reducir la neuroinflamación.

El modelo murino triple transgénico 3xTg-AD, que presenta características patológicas similares a las humanas, incluyendo la acumulación de β A y alteraciones en la proteína tau, permite el estudio integral de los efectos del TPP

sobre la microglía, la morfología sináptica y el comportamiento cognitivo (Bilkei-Gorzo, 2014; Oddo et al., 2003). Estudios realizados por nuestro grupo de trabajo han demostrado que el tratamiento crónico con TPP en este modelo mejora la conducta de anidación y aprendizaje en laberinto. También, modula positivamente la morfología y función microglial, disminuyendo su estado reactivo y preservando la función y la densidad de espinas dendríticas en regiones hipocampales clave (Pastén-Castrejón, 2019; Poblano-Paez, 2024).

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar el efecto neuroprotector del TPP en el modelo 3xTg-AD, integrando análisis conductuales, morfológicos y funcionales de la microglía, así como de las espinas dendríticas (ED). Los resultados obtenidos sugieren que la modulación del metabolismo microglial mediante TPP constituye una estrategia prometedora para la prevención del deterioro cognitivo asociado a la EA, abriendo nuevas vías para el desarrollo de intervenciones terapéuticas multifactoriales que puedan mejorar la calidad de vida de los pacientes.

II. ANTECEDENTES

Epidemiología de la Enfermedad de Alzheimer

La EA es una condición neurodegenerativa que se caracteriza tener un origen multifactorial, es progresiva e irreversible, por lo que hasta el momento no tiene cura. Por sus síntomas, se clasifica como una forma de demencia relacionada con la edad y afecta principalmente a personas que se encuentran entre los 65 y 85 años (Masters et al., 2015; De Strooper y Karran, 2016). Los signos y síntomas de la EA, ocurren en un continuo biológico en donde se tienen fases preclínicas y prodrómicas de larga duración, seguidas de una etapa clínica que suele durar entre 8 y 10 años. (Cole et al., 2010; Masters et al., 2015; De Strooper y Karran, 2016). Los síntomas de EA incluyen una marcada pérdida de memoria y habilidades cognitivas, dificultades en el lenguaje, desorientación y cambios impredecibles en el comportamiento, lo que afecta negativamente las actividades cotidianas de los pacientes (Prince, 2015).

Debido al aumento en la esperanza de vida de la población, los casos de Alzheimer están en constante aumento tanto en México como en todo el mundo (Swomley et al., 2014). A nivel mundial en 2014, se estimaba que alrededor de 47.5 millones de

adultos mayores, eran pacientes con demencia, y la Organización Mundial de la Salud (OMS) registra aproximadamente 7.7 millones de nuevos casos cada año. (Prince, Albanese, Guerchet y Prina, 2014). En México y América Latina se reporta que la prevalencia de demencia varía entre 6.7% y 12.6%, y que esta es mayor en mujeres (9.1%), que en hombres (6.9%), en personas con menor nivel educativo y/o que viven en áreas rurales (9.4%), más que las que en zonas urbanas (7.7%), según estudios consistentes (Manrique-Espinoza et al., 2013). En cuanto a la incidencia, en México, se calcula que, cada año se presentan aproximadamente 27 casos nuevos de demencia por cada mil personas de 60 años y más (Agudelo-Botero et al., 2023; Robledo et al., 2017). En el año 2015, el Instituto Nacional de Geriátrica estimó en 2015 que 800,000 personas eran afectadas por algún tipo de demencia, siendo la EA la causa más común, con un rango de entre 60% y 70% del total de los casos de demencia (Gutiérrez-Robledo y Arrieta-Cruz, 2015). Lo anterior aunado a las proyecciones demográficas de nuestro país indican que, en menos de 30 años, 2 de cada 10 mexicanos serán personas adultas mayores (CONAPO, 2021). Además, conforme nuestra población envejece aumentan los factores de riesgo y la prevalencia de enfermedades crónicas como obesidad y diabetes que ocasionan incapacidad y contribuyen a un escenario más complejo, en el que la demencia gana terreno y se convierte en la principal causa de discapacidad y dependencia en adultos mayores (OMS, 2025), lo que en nuestro país contribuye de forma significativa a la mortalidad prematura y los años vividos con discapacidad en adultos mayores (Parra-Rodríguez et al., 2020).

Actualmente se estima que alrededor de 1.3 millones de personas viven con demencia en México (Secretaría de Salud, 2021) y que esta cifra se multiplicará a 3.5 millones para el 2050 (Gutiérrez-Robledo & Arrieta-Cruz, 2015). Esto se traduce no solo en presión económica sobre el sistema de salud, sino que vuelve obligatoria la participación de la sociedad en general (Gutiérrez-Robledo et al., 2022). Asimismo, ya que las personas cuidadoras son mayormente mujeres, está implícita una pérdida de ingresos por la necesidad de reducir las horas de trabajo o dejar la vida productiva definitivamente, contribuyendo en gran medida a la inequidad de género (Gutiérrez-Robledo et al., 2022; Mattap et al., 2022).

Dado el alarmante aumento proyectado de casos y el profundo impacto económico, social y de género que conlleva, el estudio de la demencia y principalmente la EA se vuelve no solo relevante, sino prioritario en el ámbito de la salud pública (INGER, 2024). Podemos comprender el trasfondo de la EA y su impacto en la actualidad, si estudiamos su origen biológico, clínico e histórico.

Descubrimiento de la Enfermedad de Alzheimer

En 1906, el psiquiatra Aloisius Alzheimer proporcionó la primera descripción clínica de la EA, basada en el caso de su paciente August Deter, de 51 años de edad. Deter mostraba señales de deterioro cognitivo y dificultad para recordar información recientemente aprendida. Después de su muerte, el Dr. Alzheimer realizó un análisis *post-mortem* de su cerebro, lo que le permitió describir por primera vez las características histopatológicas clásicas de la enfermedad (**Figuras 1 y 2**).

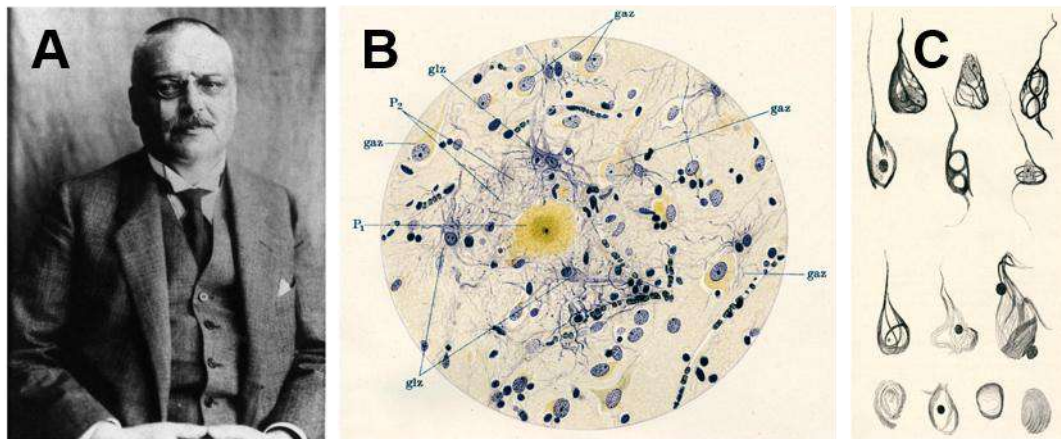


Figura 1. Descubrimiento de la Enfermedad de Alzheimer. (A) El Dr. Aloisius Alzheimer a la izquierda y sus descubrimientos mostrados en sus propias ilustraciones donde muestra en (B) las placas amiloides en el centro y en (C) las marañas neurofibrilares a la derecha. Tomado de Dahm, 2006.

Estas características incluyen las placas β -amiloide (β A) y las marañas neurofibrilares (MNFs) compuestas por la proteína tau (Goedert y Spillantini, 2006). Tanto β A como tau, están implicadas en otros trastornos en los que su expresión genética se ve alterada, lo que resulta en su sobreproducción, acumulación o desorganización. Estas alteraciones pueden dar lugar al déficit y deterioro de diferentes capacidades cognitivas o una enfermedad similar a la EA (Goate et al., 1989; Cole et al., 2010).

Además, en los cerebros con EA se observa también una retracción o encogimiento de diversas áreas, debido a la pérdida de neuronas, a la angiopatía amiloide y otras lesiones moleculares relacionadas al daño oxidativo. Se produce una activación inflamatoria de las células gliales (microglía y astrocitos), así como una pérdida de la homeostasis en el metabolismo de la glucosa y la insulina (Mosconi et al., 2008; Gabbouj et al., 2019). Todas estas alteraciones, conducen a la disfunción sináptica en áreas cerebrales relacionadas con el aprendizaje y la memoria como la corteza

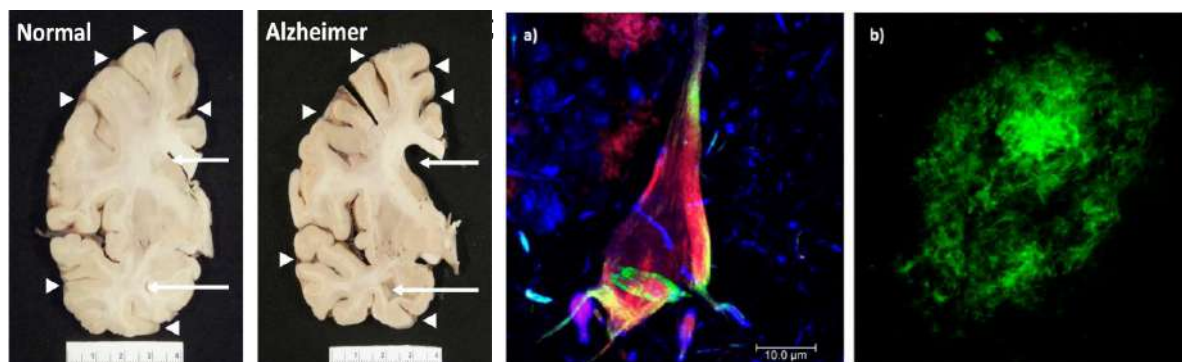


Figura 2. Anatomía macroscópica de un cerebro Alzheimer, se muestra señalado con flechas y cabezas de flecha la ampliación de los espacios de los surcos y el estrechamiento de las circunvoluciones de las astas frontal y lateral de los ventrículos en comparación con el cerebro normal. Modificado de DeTure & Dickson, 2019. Marcas histopatológicas de la EA. En A, una triple inmunofluorescencia que muestra una maraña neurofibrilar (cambios conformacionales de la proteína tau: verde; C-terminal: rojo; N-terminal de la proteína tau intacta: azul). En B, se observa una inmunofluorescencia de una placa amiloide (βA 1-40: verde). Fotomicrografías a 100x, barra de calibración =10 μ m. Tomado de Andrade-Guerrero et al., 2023.

Por otro lado, la importancia del proceso inflamatorio en la EA se ha revelado en los últimos años y podemos encontrar evidencia que sugiere que la inflamación no diagnosticada o no valorada puede contribuir al desarrollo de la enfermedad (Cuello, 2017). Además, genes que se consideran factores de riesgo para la EA se expresan en la microglía como el *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2*, (*TREM2*, por sus siglas en inglés) y el de la apolipoproteína E o APOE (Wang et al., 2015; Krasemann et al., 2017; Andrade-Guerrero et al., 2023).

Otros genes que también se han reportado son *SPI1*, implicado en la expresión de aquellos relacionados con el sistema inmunitario en células mieloides, que podría contribuir a la EA regulando vías clave asociadas con la respuesta inmunitaria y

alterando el panorama epigenético (Cao et al., 2022). Además, el antígeno de superficie de células mieloides CD33, expresado en la superficie de las células microgliales, está implicado en la regulación negativa de la producción de citocinas y, por lo tanto, podría desempeñar un papel en la EA modulando la activación microglial (Wissfeld et al., 2021; Marcé-Grau et al., 2019). Las caracterizaciones recientes que incluyen la expresión génica, la funcional y la morfológica de las poblaciones de microglía, han permitido la identificación de un fenotipo distinto al proinflamatorio al que por su relación con la EA y otros procesos neurodegenerativos se le identifica como microglía asociada a la degeneración y/o a la enfermedad o DAM (por sus siglas en inglés) (Krasemann et al., 2017; Keren-Shaul et al., 2017).

Asimismo, algunos autores sugieren que la microglía participa en los procesos de eliminación descontrolada de sinapsis por trogocitosis durante la EA a partir de mecanismos relacionados con la señalización del sistema del complemento (C) inmunológico (termolábil), los C1q (fragmento Fc de los anticuerpos) y C3 (convertasa) (Colonna y Butovsky, 2017; Weinhard et al., 2018).

En conclusión, la fisiopatología de la EA es compleja y la afectación cognoscitiva resulta de múltiples factores que inciden directamente en la plasticidad sináptica y estructural, junto con la respuesta del sistema inmune, que puede modular el desarrollo de placas amiloides afectando la transmisión sináptica, ocasionando el deterioro subyacente a la enfermedad (Bello-Medina et al., 2019).

Fisiopatología

Péptido β -amiloide

A partir de múltiples estudios realizados para descubrir la problemática central de la EA, Hardy y Higgins en 1992 propusieron “la hipótesis de la cascada amiloide” en la que se asume que la deposición del péptido β A en forma de placas, es el agente etiológico y principal disparador de otros elementos de la patología como la pérdida neuronal, el daño vascular y las alteraciones de la proteína tau que promueven la neurodegeneración (Hardy y Higgins, 1992; Hardy y Selkoe, 2002).

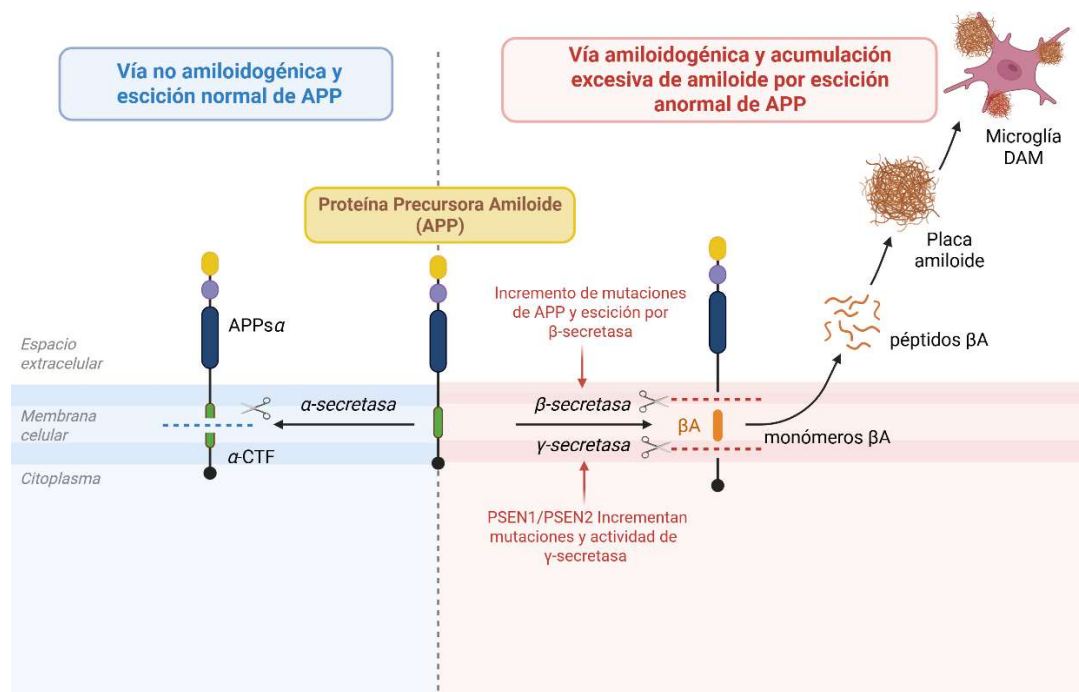


Figura 3. Escisión y procesamiento enzimático de la proteína precursora amiloide (APP). A la izquierda la vía no amiloidogénica, la escisión de α -secretasa en APP inicia el procesamiento no amiloide que impide la generación del péptido βA y forma el fragmento soluble de la proteína (APPs α) y el fragmento C-terminal (α -CTF), el cual posteriormente da lugar a p3 N-terminal (p3) y al dominio amiloide intracelular (AICD) luego del corte de la por la γ -secretasa. A la derecha la vía amiloidogénica, donde el procesamiento amiloidogénico de APP que implica el incremento de mutaciones de APP por la escisión de la β -secretasa, seguido por la escisión de γ -secretasa que lleva a la formación de monómeros, péptidos de βA y posteriormente placas amiloides que pueden acumularse y dar origen a la inflamación crónica y la microglía asociada a la degeneración (DAM). Ilustración creada con Biorender.com, Autoría de Nelly Jovana Pastén Castrejón. Creado a partir de (Patterson et al., 2008).

En el organismo, el péptido βA se expresa en todos los tejidos y fluidos biológicos (Glabe y Bush, 2007) como producto de la proteína precursora amiloide (APP), la cual es una proteína transmembranal que se procesa de manera enzimática por 3 secretasas, la α , β y γ , que generan dos fragmentos de βA (vía amiloidogénica en el cerebro) (**Figura 3**). El fragmento de βA -42 representa del 5 al 10% de la cantidad total de proteína generada y está mayormente relacionado con la EA por su capacidad de agregarse en fibrillas amiloides que más tarde se acumulan en placas (Gouras et al., 2000). La agregación de βA depende de varias fases, entre las cuales se encuentran la nucleación y la elongación que conllevan a la formación de diferentes especies amiloides como monómeros, oligómeros, protofibrillas y fibrillas insolubles (Mohamed, Cortez, y de Chaves, 2011).

Por otro lado, en muestras de cerebros de pacientes con EA, se ha demostrado que el β A se encuentra asociada a elementos macromoleculares como glucosaminoglucanos, lípidos de la membrana celular, otras proteínas y de manera importante a iones metálicos que pueden influir en la agregación amiloide y provocar efectos tóxicos (Thinakaran y Koo, 2008; Cole et al., 2010).

Proteína tau

La proteína tau se aisló por primera vez del cerebro de un porcino y se le identificó como un factor asociado a microtúbulos (Weingarten et al., 1975). Es una proteína del citoesqueleto, formada por un filamento helicoidal emparejado (PHF), que en su forma hiperfosforilada da lugar a las marañas neurofibrilares en los cerebros de personas con la EA (Friedhoff et al., 2000; Cole et al., 2010). Se ha observado que las formas hiperfosforiladas de tau, inhiben *in vitro* el conjunto de microtúbulos asociados a otros filamentos que dan estructura a las células, afectando sus funciones. Se han encontrado alrededor de 80 secuencias exónicas causantes de enfermedades y mutaciones silenciosas en el gen que codifica para la proteína tau en otras demencias como la frontotemporal, pero a la fecha, no se ha encontrado una mutación específica para la EA (Iqbal et al., 2016).

Como la proteína tau forma parte del citoesqueleto y está asociada a los microtúbulos, su función primordial es mantener la estabilidad morfológica de las neuronas. No obstante, las modificaciones postraduccionales de tau pueden alterar dicha función, los supuestos cambios incluyen; hiperfosforilación, glicosilación, ubiquitinación, glicación, poliaminación, nitración y proteólisis. Lo anterior, se traduce en mecanismos fallidos para que las neuronas eliminen proteínas dañadas, mal plegadas o agregadas (Spillantini y Goedert, 2013). Sin embargo, las más importantes son la hiperfosforilación y la glicosilación, ya que son cruciales para la degeneración neurofibrilar en la EA (Gong et al., 2005).

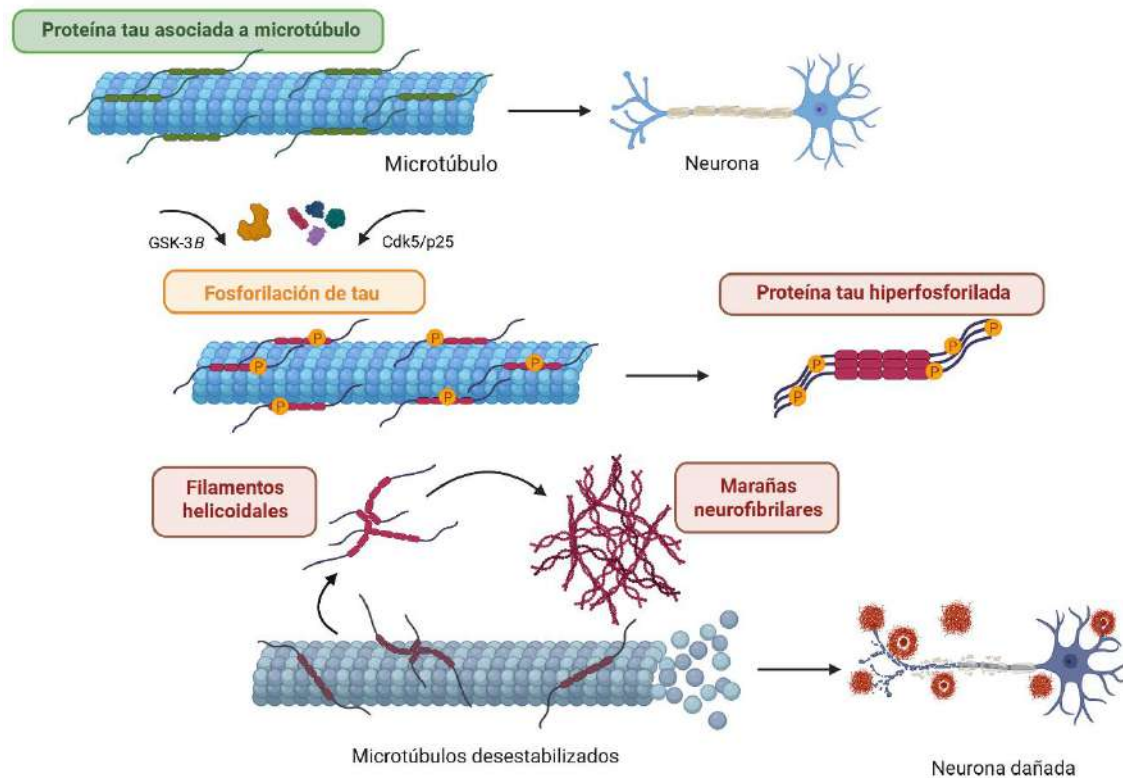


Figura 4. Representación de la hiperfosforilación de la proteína tau y formación de marañas neurofibrilares a partir de su desestabilización por las cinasas (GSK-3 β ; glicógeno sintasa 3 y Cdk5/p25; dependiente de ciclase 5 y su subunidad). Ilustración creada con Biorender.com, Autoría de Nelly Jovana Pastén Castrejón. Creado a partir de Querthfurth y La Ferla, 2010.

Se ha sugerido que el papel de la proteína tau en el desarrollo de la EA depende de al menos dos mecanismos (**Figura 4**); en primera instancia, el desprendimiento de tau de los microtúbulos después de ser hiperfosforilada por las cinasas GSK-3 β y Cdk5 con su subunidad p25, provoca su desarreglo y acumulación en MNFs (Cole et al., 2010). En segundo lugar, la presencia de mutaciones o cambios postraduccionales de la proteína tau ocasionan el deterioro en su función microtubular y del transporte axonal (Jaworski, 2010; Medina y Ávila, 2014).

Neuroinflamación y microglía

La neuroinflamación en la EA se puede definir como un cambio en la morfología y el número de células microgliales debido a factores como el estrés oxidativo causado por especies reactivas de nitrógeno (ERNs) y de oxígeno (EROs), citocinas pro-inflamatorias y prostaglandinas que promueven la neurodegeneración (**Figura 5**), (Mangialasche et al., 2010; Akiyama et al., 2000; Kitazawa et al., 2004).

La microglía regula la respuesta inmune y su homeostasis en el sistema nervioso central (SNC) (Streit, 2002; Hanisch y Kettenmann, 2007). Cuando ésta se pierde por una lesión o enfermedad, la microglía adquiere un estado “activo” y una morfología “ameboide” acompañada de cambios en la expresión génica y, por tanto, cambios funcionales (Hanisch y Kettenmann, 2007; Huh et al., 2003; Kreutzberg, 1996). El proceso de activación de la microglía le permite adquirir diversos fenotipos asociados a la protección o a la citotoxicidad (Schwartz, Butovsky, Brück y Hanisch, 2006).

La diversidad de fenotipos de la microglía aún sigue siendo controversial. Sin embargo, hasta 2018 existían dos postulados aceptados: el estado de activación alternativo (M2) y el clásico (M1). El primero se ha asociado a la neuroprotección del SNC ya que induce la liberación de citocinas anti-inflamatorias como IL-4 e IL-10 que inhiben la inflamación y promueven la capacidad fagocítica de la microglía (Cherry, Olschowka, y O'Banion, 2014). Mientras que el segundo tipo por actividad clásica o M1 responde a LPS, IFN γ , PMAPs y PMADs (patrones moleculares asociados a patógenos y a daño), produciendo una respuesta inflamatoria masiva en la que se liberan las interleucinas IL-1 β , IL-12 y TNF- α que regula la expresión de la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS) (Calsolaro y Edison, 2016; Venegas y Heneka, 2017).

Se sabe también que la microglía responde a moléculas endógenas relacionadas con células necróticas y moléculas derivadas de mecanismos protectores patogénicos por medio de receptores tipo NOD (NLR) y TOLL (TLR). Los TLR6, TLR4 y TLR2 reconocen al péptido β A (Akira, 2003; Glass, Saijo, Winner, Marchetto y Gage, 2010) y activan vías del factor nuclear kappa B (NF κ B) y cinasas activadoras de mitógenos (MAPK).

La activación de NF κ B y las MAPK da lugar a dos eventos fundamentales: la síntesis de diversas citocinas pro y anti-inflamatorias, además de factores de transcripción, incluidos IL-1, TNF- α , IL-6, IL8 e IFN- γ y como segundo evento la activación de la proteína quimio atrayente de los monocitos-1 (MCP-1) que recluta a otras células gliales como los astrocitos. Como parte del proceso se transcribe y se sintetiza iNOS que produce óxido nítrico (NO) e influye en la motilidad celular, fagocitosis, muerte

celular, presentación antigénica y en el daño nitro-oxidativo (Akiyama et al., 2000). Asimismo, se ha reportado que la neuroinflamación y la síntesis crónica de citocinas pro-inflamatorias y otras moléculas derivadas de la activación microglial pueden contribuir a la neurodegeneración e incluso participar en la agregación de β A en placas (Zilka, Ferencik y Hulin, 2005). Esto sugiere que la neuroinflamación es un proceso importante (**Figura 5**) dentro del círculo vicioso de la agregación de péptido β A, el daño neuronal, el estrés nitro-oxidativo y la muerte celular en las enfermedades neurodegenerativas y específicamente en la EA (Calsolaro y Edison, 2016).

Sumado a lo anterior, diversos trabajos experimentales realizados con el modelo de ratón transgénico para la enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD), reportan un aumento significativo en la cantidad de células microgliales a los 12 y 18 meses de edad en comparación con los no transgénicos y los transgénicos de menor edad. Estas investigaciones relacionan el aumento de células microgliales con la formación de placas de β A y concluyen que durante la EA se desencadena una reacción microglial compleja. De manera que, en etapas iniciales de la EA, se puede observar el aumento de células ramificadas que con el envejecimiento y avance de la enfermedad tienen una función inmune disminuida (Rodríguez et al., 2010; 2013; Fernández-Arjona et al., 2017).

Metabolismo de la microglía en la neurodegeneración

El mecanismo de inducción de DAM está relacionado con TREM2 y podemos encontrar dos paradigmas principales propuestos. Se plantea que TREM2 emerge como un receptor inmune innato que afecta el metabolismo de la microglía en la EA. Primero, a través de un mecanismo que consiste en la activación básica de la señalización del *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR) que permite el trofismo celular a largo plazo, la supervivencia, el crecimiento y la proliferación mediante la producción de energía en la microglía sin una reprogramación metabólica drástica. Posteriormente la señalización de mTOR se vuelve tónica a través de activadores río arriba, como el fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), la cinasa dependiente de fosfatidilinositol 3-cinasa 1 (PDK1) y la proteína-cinasa B (PKB/Akt) que son reclutadas por subunidades asociadas a los motivos DAP12 y DAP10 de la proteína

de unión a la tirosina-cinasa (TYROBP) (Ulland et al., 2017). El segundo modelo propone que señales de TREM2 en respuesta al medio inician directamente el programa para activar DAM dependiendo de la expresión “inmediata” de TREM2 ante lesiones agudas en axones o exposición a neuronas apoptóticas (Krasemann et al., 2017).

Una vez que se activa DAM, ciertas moléculas con regulación positiva pueden formar un bucle autocrino o paracrino que sostiene la activación. APOE se encuentra entre los genes asociados a DAM con mayor expresión y se ha visto que su deficiencia disminuye la expresión de DAM, podría ser uno de los principales ligandos de TREM2 durante la neurodegeneración (Krasemann et al., 2017; Song y Colonna, 2018). Aunado a lo anterior, Baik y cols. (2019) reportaron que β -amiloide puede inducir la reprogramación metabólica microglial, donde se obtiene energía a partir del metabolismo glucolítico no oxidativo, reduciendo la energía celular y adoptando un mecanismo energético “hipometabólico”. Este cambio es dependiente de la vía de mTOR en la microglía puede alcanzar una fase de tolerancia, debida a la exposición crónica de factores activadores de DAM.

Estos defectos del metabolismo sumados a la pérdida del fenotipo homeostático de la microglía conducen a la disminución de la función de la respuesta inmune (**Figura 5**), incluyendo la secreción de citocinas y la fagocitosis, lo que deja al cerebro expuesto y altamente susceptible a la neurodegeneración (Baik et al., 2019).

La importancia de estos estudios radica en comprender que la microglía recibe señales del entorno neurodegenerativo a nivel integral y que estos cambios metabólicos y la pérdida de la homeostasis pueden ser más bien un estado disfuncional de hipometabolismo inducido por la enfermedad. Por lo tanto, en la medida que se logre modular la alteración metabólica microglial se podría proteger al SNC del daño que ocasiona la neurodegeneración (Ulland et al., 2017; Baik et al., 2019).

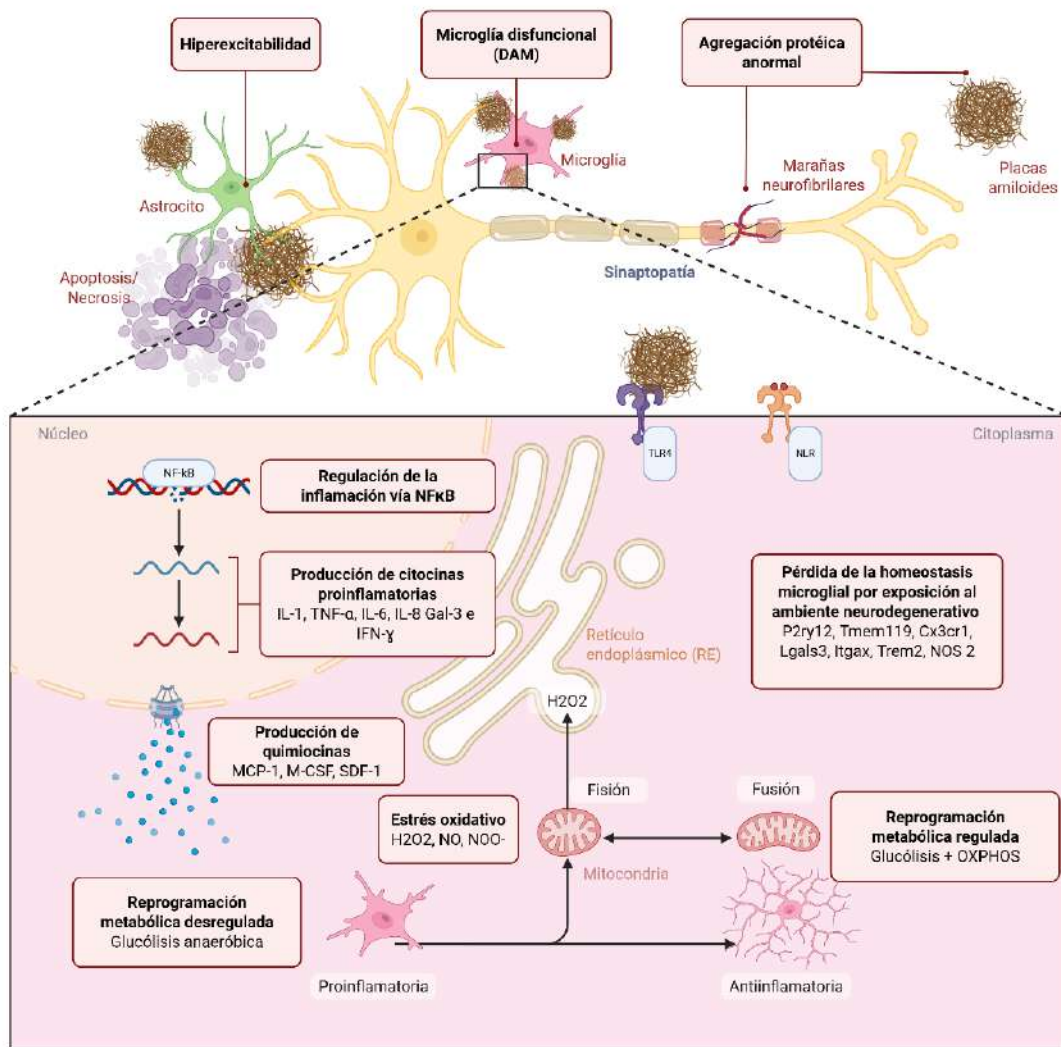


Figura 5. Neuroinflamación crónica y reprogramación metabólica microglial desregulada. La microglía, encargada de la inmunidad innata en el sistema nervioso central, reconoce las placas amiloides a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) como los tipo Toll (TLR4) y tipo NOD (NLR). Esta interacción conduce a la activación sostenida de la vía de NF-κB debido a la exposición constante al ambiente neurodegenerativo, promoviendo la liberación de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α e IL-6), quimiocinas (MCP-1, M-CSF, SDF-1) y especies reactivas de oxígeno (EROs) y nitrógeno (ERNs), lo que desencadena un daño neuronal progresivo. Los cambios en la expresión génica, con una disminución de los marcadores homeostáticos como P2ry12, Tmem119 y Cx3cr1, y un aumento de marcadores reactivos como Lgals3, Itgax, Trem2 y Nos2, reflejan una reprogramación metabólica desregulada de la microglía. Este desequilibrio contribuye significativamente a la disfunción sináptica, la sinaptopatía y el deterioro cognitivo. Ilustración creada con Biorender.com, Autoría de Nelly Jovana Pastén Castrejón. Creado a partir de (Baik et al., 2019; Glass et al., 2010).

Microglía asociada a la degeneración o DAM

Las alteraciones en el rendimiento cognitivo y la demencia pueden ser causadas por la neurodegeneración, un proceso progresivo de pérdida de la homeostasis relacionado con la edad y la muerte de estructuras y funciones de las células que conforman el SNC (Ramanan y Saykin, 2013). En la EA la inflamación fue observada y descrita por primera vez por Oskar Fischer a inicios del siglo XX, de manera simultánea a la descripción de las placas amiloides en el cerebro. Hasta los años 80, sin embargo, se retomó el estudio de este factor como característica importante para el estudio de las patologías neurodegenerativas (Cuello, 2017).

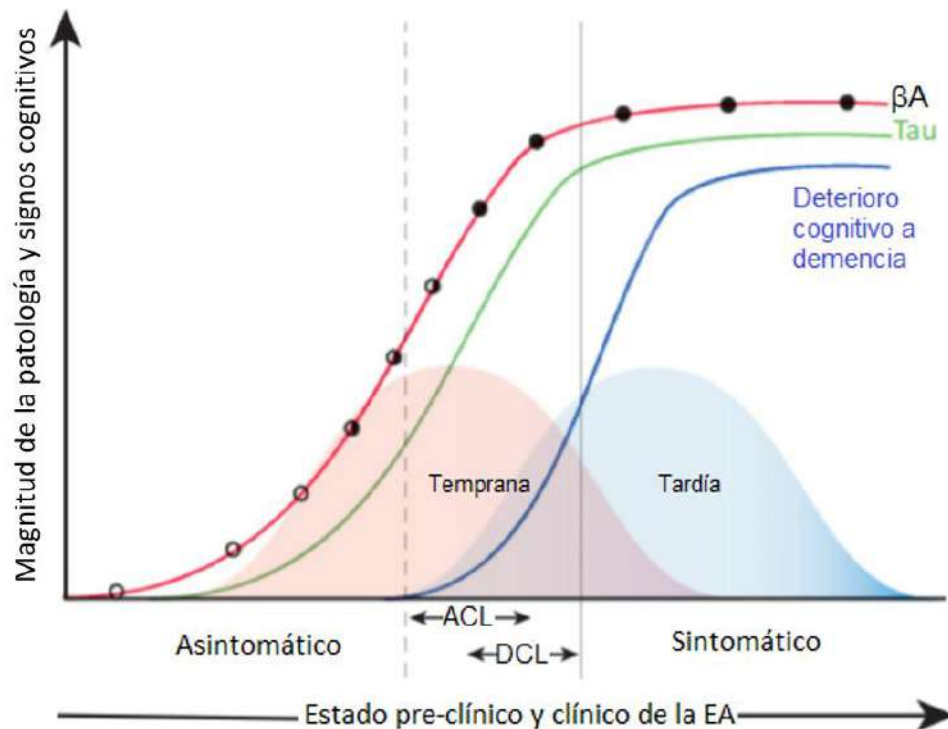


Figura 6. Representación gráfica de la inflamación temprana y tardía del SNC que ocurren en el continuo de la EA. Es probable que la inflamación temprana comience tan pronto como haya una acumulación de βA en forma de oligómeros, antes de la presencia de placas amiloides. Los dos procesos inflamatorios deben superponerse en un punto cercano al final de la etapa preclínica, donde se observan los primeros signos de alteraciones conductuales leves (ACL) y deterioro cognitivo leve (DCL), mientras que en la etapa clínica predomina la inmunidad inflamatoria adaptativa tardía. Modificado de Cuello 2017, basado en Jackson Jr. Et al., 2018.

Como se mencionó, durante la neurodegeneración la microglía adquiere un tipo único asociado con el desarrollo de la EA que fue descubierto gracias a la

aplicación de tecnologías genómicas unicelulares las cuales permiten la caracterización de los tipos y estados de las células inmunes a lo largo de la transición del proceso salud-enfermedad (Cuello, 2017).

Una de las piezas que ha demostrado tener una relación directa con el cambio en la expresión génica para la activación de DAM es TREM2, que funciona como receptor específico de macrófagos con un dominio de inmunoglobulina (Ig) único (Song y Colonna, 2018). El receptor TREM2 detecta patrones lipídicos asociados a neurodegeneración como fosfolípidos, células apoptóticas y lipoproteínas, además de mantener la respuesta microglial a la amiloidosis en la EA (Wang et al., 2015; Ulland et al., 2017). Se ha observado que, a nivel de una sola célula, las células *knock out* para TREM2, presentan limitaciones en su capacidad de activación del fenotipo DAM al ser sometidas a un medio con neuronas apoptóticas o en caso de una señalización anómala del factor de crecimiento transformante β (TGF β) (Butovsky et al., 2014). Lo anterior está relacionado con la pérdida de la firma homeostática microglial y la inflamación crónica en el tejido cerebral (Perry y Holmes, 2014). En algunos otros estudios se ha reportado que la deficiencia de TREM2 provoca autofagia aumentada en algunos modelos de ratón para la EA y deteriora la activación y el metabolismo microglial (Ulland et al., 2017).

Morfología y fenotipo microglial

El cambio morfológico de la microglía está íntimamente relacionado con su función y algunos autores han recurrido a su estudio para resolver paradigmas acerca del estado en que se encuentra el sistema inmune del SNC durante la salud, la enfermedad, los traumas o eventos cerebrovasculares (Fernández-Arjona et al., 2017; Morrison et al., 2017; Streit et al., 2020). Se ha observado también que tanto la distribución de la microglía como su morfología difieren a lo largo del tejido cerebral, lo que demuestra su capacidad para censar el microambiente circundante. Según su forma, la microglía se ha dividido en ramificada asociada al reposo y la vigilancia activa con perfil antiinflamatorio y en desramificada o ameboide relacionada con la activación inmune y un perfil proinflamatorio (Cherry, Olschowka, y O'Banion, 2014; Reddaway et al., 2023).

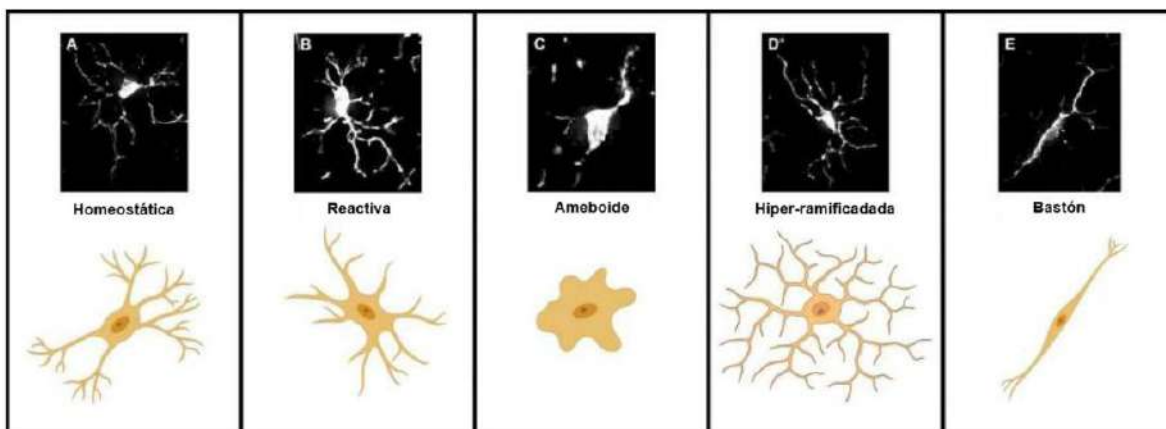


Figura 7. Representaciones de las cinco morfologías microgliales. (A) Microglía homeostática, caracterizada por sus procesos largos y complejos y somas pequeños. (B) Los procesos microgliales reactivos se han retraído y disminuido en número; los somas también se ven más grandes y redondeados. (C) La microglía ameboide carece de procesos y es morfológicamente indistinguible de los macrófagos hemáticos. (D) Microglía hiper-ramificada y "tupida", una morfología intermedia entre la homeostática y la reactiva, en la que la microglía se ha retraído y ha comenzado a engrosar sus procesos. (E) La microglía en forma de bastón adopta una morfología altamente polarizada, caracterizada por sus somas largos y delgados y procesos largos y extendidos. Modificado de Reddaway et al., 2023.

Sin embargo, los fenotipos microgliales no son absolutos, sino un continuo con morfologías intermedias (**Figura 7**). Los cambios sutiles a lo largo de sus proyecciones y el tamaño y circularidad del soma dan lugar a subtipos ampliamente distintos entre los que podemos encontrar morfologías compactas y redondeadas o ramificadas longitudinal y radialmente (Fernández-Arjona et al., 2019; Green & Rowe, 2024). El cerebro sano y no inflamado tiene mayoritariamente células en reposo, ramificadas, con un cuerpo pequeño y estático y con procesos altamente dinámicos que realizan funciones que van desde el mantenimiento homeostático hasta la poda sináptica (Hanisch y Kattenmann 2007; Paliocelli et al., 2011).

En pacientes con la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío, se ha descrito un aumento de células microgliales y la distrofia microglial asociada a las MNF, la agregación de βA y la senescencia de estas células (Boche et al., 2012; Streit et al., 2020). La microglía distrófica muestra una morfología con anomalías en la estructura citoplasmática caracterizada por procesos que se retuercen, forman esferoides y se acortan. Observaciones *in vitro* relacionan este tipo microglial con el aumento de la edad y enfermedades neurodegenerativas dependientes de este factor como la EA. Por otro lado, la microglía hipertrófica que se relaciona más a un estado inflamatorio producido después de un cambio patológico agudo o lesiones

en el SNC adquiere una morfología con procesos citoplasmáticos muy agrandados y ramificados (Streit et al. 2002; Streit et al., 2004).

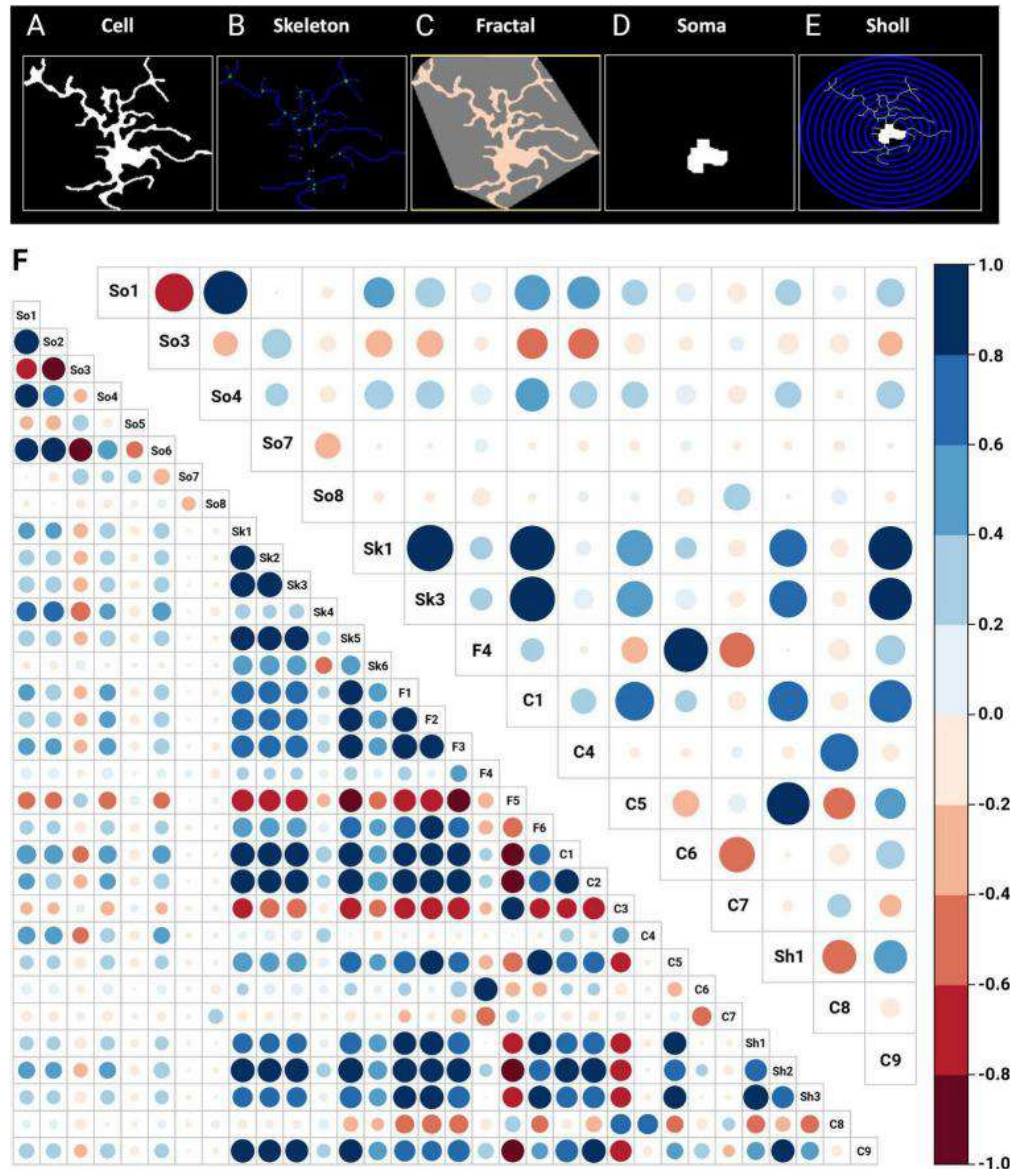


Figura 8. Análisis morfológico y selección de características mediante RFE. En este análisis morfológico, 32 características se extraen inicialmente a través del procesamiento automatizado de datos utilizando (A) célula, (B) esqueleto, (C) fractal (envoltura convexa), (D) soma y (E) características de Sholl. (F) En el proceso de selección de características, RFE con un algoritmo de bosque aleatorio identificó 16 características clave como las más significativas para distinguir entre los grupos estudiados: SS-CA1, SCOP-CA1, SS-Hilus y SCOP-Hilus. Tomado de Maya-Arteaga et al., 2024.

La morfología microglial es esencial para entender el estado en que se encuentra el parénquima cerebral y si se pueden o no identificar patologías del sistema nervioso central como la EA (Maya-Arteaga et al., 2024), aunque la morfología y función no

son sinónimos, el estudio de la forma nos ayuda a realizar inferencias interesantes (Paolicelli et al., 2022). Los cambios morfológicos sutiles pueden ser indicadores de procesos de activación y daño neural, además la combinación de este tipo de análisis morfológico usando herramientas como MorphoGlia (**Figura 8**) en combinación con otras técnicas, como estudios ómicos, aporta una visión integral sobre la función y disfunción microglial y nos ayuda a evaluar sus diferentes perfiles fenotípicos en condiciones específicas (Maya-Arteaga et al., 2024).

Fagocitosis microglial y sinaptopatía

Durante el desarrollo, la microglía participa en el refinamiento de circuitos neuronales eliminando sinapsis excesivas por medio de la vía del complemento a través de la señalización neuronal de C1q (Schafer et al., 2012; Chao Wang et al., 2020). Las sinapsis marcadas de la manera anterior son reconocidas por el receptor C3 (C3R) de la microglía causando su eliminación mediante la fagocitosis parcial de la célula neuronal, que se centra en las espinas dendríticas (Schafer et al., 2012; Weinhard et al., 2018).

La fagocitosis parcial del material sináptico mediada por la microglía, que ocurre a lo largo del desarrollo es mejor conocida como *pruning* o poda sináptica, y se ha propuesto que de este proceso depende la homeostasis sináptica (Paolicelli et al., 2011). Cuando existen alteraciones durante la poda sináptica, éstas pueden contribuir a la susceptibilidad del desarrollo de trastornos asociados con el número de sinapsis como es el caso de la epilepsia, el autismo o la esquizofrenia (Miyaniishi et al., 2021).

Por otro lado, Weinhard et al. (2018) caracterizaron y describieron un proceso similar al *pruning*, denominado trogocitosis, en que no existe evidencia de la fagocitosis de sinapsis completas, sino un “mordisqueo” de las estructuras sinápticas restringido a botones y axones presinápticos. Lo anterior sugiere la participación de la microglía en la remodelación y reorganización sináptica, así como en la disfunción sináptica. Además, la interrupción o pérdida de la función microglial ocurre en diferentes patologías del SNC, incluida la enfermedad de Alzheimer (Keren-Shaul et al., 2017; Baik et al., 2019; Miyaniishi et al., 2021).

La fagocitosis difiere de la trogocitosis principalmente en el tamaño de las partículas

de captación. En el primer caso, las partículas son de 0.5µm de diámetro mientras que en el segundo caso los fragmentos son más pequeños, de alrededor de 250nm de diámetro (Weinhard et al., 2018). Este proceso trogocitario (del griego *trogo*: mordisquear) ha sido descrito previamente en células inmunes diferentes a la microglía (Joly & Hudrisier, 2003; Ahmed et al., 2008) y amebas que ingieren “mordisqueando” pequeñas partes, menores a 1µm, de sus blancos. Sin embargo, la señalización de la trogocitosis aún no es comprendida por completo, pero puede depender de marcadores de la vía del complemento como las proteínas C1q y C3R (Schafer et al., 2012).

También se han sugerido otros reguladores de la trogocitosis como la señal de fagocitosis de la fosfatidilserina, un fosfolípido que cuando modifica su ubicación a la membrana celular externa, promueve la absorción de material celular por los macrófagos (Perry & Ravichandran, 2017). La trogocitosis microglial no implica de manera necesaria la eliminación de estructuras sinápticas funcionales. Sin embargo, Wang et al. (2020), comprobaron que la microglía tiende a eliminar preferentemente a las conexiones de menor fuerza sináptica o menos activas. La fagocitosis microglial del material sináptico podría traducirse en el olvido por la disfunción de circuitos neuronales específicos involucrados en la memoria (Wang et al., 2020).

Asimismo, en modelos de la EA, si se elimina la microglía, se evita la pérdida de espinas dendríticas y la pérdida neuronal, sin que se observen cambios en los niveles de βA o en el tamaño de las placas lo que apoya el papel de la microglía en la disfunción sináptica (Mhatre et al., 2015; Spangenberg & Green, 2017).

Muchos de los hallazgos mencionados resultan de gran importancia, ya que una de las principales características neuropsiquiátricas asociadas a la pérdida de la función en la EA luego de la presencia de placas amiloides y la disfunción de tau, es la sinaptopatía relacionada al deterioro cognitivo, en la que se ha sugerido la participación de la microglía (Bello-Medina et al., 2019; 7). Aunado a esto, se ha propuesto que la microglía contribuye a la eliminación y degradación de βA (Casali et al., 2020) y que esto podría suceder porque βA funciona como un péptido antimicrobiano que protege al cerebro de patógenos al aglutinarse alrededor de

éstos, conteniéndolos (Kumar et al., 2016). Todo esto pone en discusión posibles mecanismos involucrados en la fagocitosis parcial del material sináptico en condiciones de pérdida de la homeostasis multifactorial de estados neurodegenerativos como durante la EA.

Espinas dendríticas y memoria

La memoria se refiere al almacenamiento de la información aprendida en el cerebro y es el fundamento de la conducta y comportamiento adaptativo de los animales y humanos (Poo et al., 2016). La representación de la memoria duradera tiene como sustrato neuronal a las células de engrama, convertidas en una teoría del mecanismo para el almacenamiento de recuerdos, propuesto por primera vez por Richard Semon (1909).

Actualmente, estas células se definen como neuronas que se activan durante una experiencia, que han sufrido cambios físicos o químicos duraderos y que posteriormente pueden reactivarse selectivamente para producir la recuperación de esa experiencia o inhibirse evitando así su recuperación (Tonegawa et al., 2015; Josselyn & Tonegawa, 2020). Dichos cambios son sustentados por el mecanismo de plasticidad sináptica, que involucra el cambio estructural (elongación, contracción y otros cambios de forma) y de composición, además de la distribución y la función de las espinas en las sinapsis relacionadas a la actividad neuronal (Frere & Slutsky, 2018; Reza-Zaldivar et al., 2020). Las espinas dendríticas fueron descritas por el neuroanatomista Santiago Ramón y Cajal en 1888, como estructuras que surgen de prolongaciones citoplasmáticas altamente dinámicas de la membrana dendrítica donde se lleva a cabo la sinapsis (Chidambaram et al., 2019). Estas pequeñas protuberancias delgadas y altamente especializadas, que deben su modificación morfológica al citoesqueleto de actina, contribuyen al aumento de la superficie celular de contacto de las terminales axónicas. Tales espinas se encuentran principalmente en las sinapsis excitadoras, pero también se han reportado en interneuronas inhibitorias.

Las espinas tienen como función primaria la recepción y traducción de la información excitadora aferente de las neuronas y su distribución está directamente relacionada con la integración de los impulsos nerviosos procedentes de sistemas

aferentes específicos (Shepherd et al., 1985). Cajal proponía que las conexiones sinápticas ocurrían directamente en las espinas y en 1959, su teoría fue confirmada por Gray, quien con ayuda de la microscopía electrónica observó los contactos pre- y post-sinápticos (Chidambaram et al., 2019).

Posteriormente, la teoría de Donald Hebb de que el aumento de la fuerza sináptica y la conectividad neuronal son fundamentales para la formación de la memoria, incentivó a muchos investigadores a ahondar en el estudio sobre cómo la fuerza sináptica se correlaciona con la memoria (Josselyn & Tonegawa, 2020). Anatómicamente, las espinas dendríticas consisten en cabezas bulbosas unidas a los ejes dendríticos por cuellos estrechos y su tamaño forma y cantidad varían de forma heterogénea incluso en segmentos dendríticos de una misma neurona. El número de espinas dendríticas varía de 1-10 por μm de longitud dendrítica, según el tipo de dendritas y la etapa del desarrollo (Calabrese et al., 2006). Las espinas dendríticas en un cerebro maduro tienen una longitud menor a $3\mu\text{m}$ con una cabeza esférica de $0.5\text{-}1.5\mu\text{m}$ de diámetro conectada a la dendrita por un cuello delgado de menos de $0.5\mu\text{m}$ de diámetro (Chidambaram et al., 2019).

En la **Figura 9**, se muestra la morfología de las espinas dendríticas que suele ser muy variada, aunque se reconocen 4 grandes tipos: (1) espinas delgadas y alargadas, como filopodio y espinas delgadas con una cabeza más pequeña y un cuello estrecho, ambas asociadas a una sinapsis menos estable, (2) espinas en forma de hongo con una cabeza grande y una unión a la dendrita estrecha que se relaciona con una sinapsis de gran estabilidad, (3) espinas ramificadas o en forma de copa con dos cabezas unidas a un solo cuello estrecho y (4) espinas rechonchas o bulbosas sin constricción obvia entre la cabeza y la unión al eje (Yuste & Bonhoeffer, 2001).

El hipocampo es parte de un sistema altamente plástico, la reorganización sináptica y la remodelación de circuitos neuronales son procesos activos a lo largo de toda la vida. La microglía elimina los componentes sinápticos del sistema nervioso en desarrollo, pero también del cerebro maduro por medio de la vía del complemento, lo que se relaciona a la disociación o degradación de ensamblajes neuronales y se traduce en el olvido de memorias (Schafer et al., 2012; Wang et al., 2020). Además,

la disminución de la actividad neuronal aumenta la eliminación de sinapsis, mientras que la depleción de la microglía o su inhibición previenen el olvido (Rice et al., 2015; Krukowski et al., 2018; Wang et al., 2020).

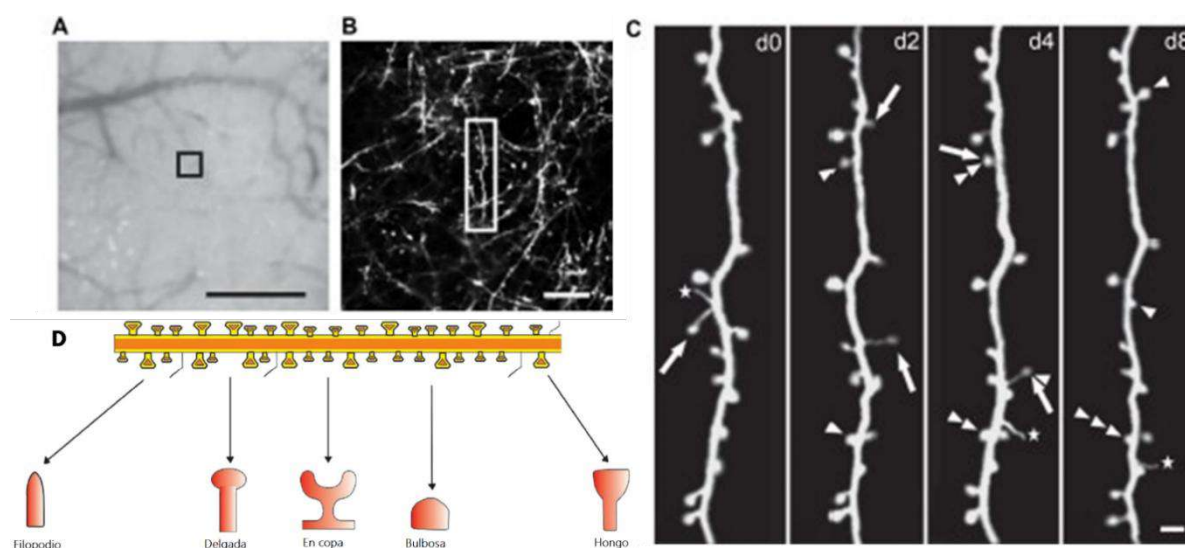


Figura 9. Microscopía de dos fotones de espinas dendríticas. (A) Una imagen de dispositivo de carga acoplada con el cuadro negro que muestra las áreas del fotón donde se tomaron dos imágenes de fotones (barras de escala: 500 μm). (B) Una imagen de bajo aumento de una columna dendrítica en la corteza motora del ratón (barra de escala de 20 μm). (C) Imágenes repetitivas de dendrita con mayor aumento que muestran espinas dendríticas recién formadas con flechas que indican espinas eliminadas y estrellas que muestran filopodios (barra de escala 2 μm). (D) Esquema que ejemplifica las diferentes morfologías de las espinas dendríticas. Modificado de Xinzhu et al., 2014 citado en Chidambaram et al., 2019.

En el hipocampo (regulador de la memoria) es una estructura altamente plástica, cuya reorganización sináptica sufre una continua remodelación de circuitos neuronales y con procesos activos a lo largo de toda la vida. La función hipocampal de la microglía elimina los componentes sinápticos por medio de la vía del complemento, lo que se relaciona a la disociación o degradación de ensamblajes neuronales y se traduce en el olvido de memorias (Schafer et al., 2012; Wang et al., 2020). Además, la disminución de la actividad neuronal aumenta la eliminación de sinapsis, mientras que la depleción de la microglía o su inhibición previenen el olvido (Rice et al., 2015; Krukowski et al., 2018; Wang et al., 2020).

La microglía también se ha relacionado con otros procesos de plasticidad sináptica en los que actúa como mediadora en la recuperación de recuerdos remotos a partir de la respuesta a IL-33 que impulsa la absorción microglial de la matriz extracelular

(MEC) de las neuronas y el aumento de la plasticidad de las espinas dendríticas (Nguyen et al., 2020). Este mecanismo para la remodelación es dependiente de la experiencia y podría optimizar la conectividad del circuito y reducir la interferencia de la memoria como se ha observado en modelos KO para la señalización con esta interleucina. Aunado a esto, se ha demostrado que la microglía contacta con las espinas dendríticas de una manera dependiente de la actividad y la formación de filopodios en la cabeza de las espinas correlaciona con el contacto de la microglía de manera presináptica (Weinhard et al., 2018).

Sin embargo, como se ha explicado a lo largo de los antecedentes, durante el envejecimiento y el proceso de enfermedad hay una marcada pérdida de la homeostasis cerebral que coincide con los defectos en la precisión de la memoria de los pacientes con EA (Nguyen et al., 2020) y la descomposición metabólica asociada a la pérdida y alteración de las funciones biológicas inmunes de la microglía (Keren-Shaul et al., 2017; Baik et al., 2019; Yang et al., 2021).

Durante la EA el olvido es progresivo, inevitable e irreversible, sin embargo, aún no se conocen por completo los mecanismos involucrados en el olvido en estas condiciones patológicas (Wang et al., 2020). Debido a lo anterior nos preguntamos si el deterioro cognitivo observado en el modelo 3xTg-AD estará relacionado a la fagocitosis y cómo esta es mediada, o si podría ser alterada por la descomposición del perfil metabólico homeostático de la microglía y que efecto tendría en estos casos el TPP.

Modelo 3xTg-AD

Los modelos transgénicos relacionados con la fisiopatología de la EA han tenido un papel importante en el entendimiento del desarrollo de su etiología. A la fecha no se ha creado un modelo que recapitule todos los aspectos de la patología (Lee y Han, 2013; Webster et al., 2014). Sin embargo, el modelo 3xTg-AD (**Figura 10**), parece ser hasta ahora el mejor por su validez histopatológica y de constructo biológico. Lo que permite el estudio de los mecanismos patológicos de gran similitud con los mecanismos humanos (Bilkei-Gorzo, 2014; Oddo et al., 2003). Este modelo triple transgénico desarrolla la amiloidosis y taupatía de manera progresiva con un perfil temporal y regional específico, que simula la patología de la EA en el cerebro

humano gracias a que expresa los transgenes humanos PS1-M146V, APP695-Swe y tau-P301L.

En el 3xTg-AD se describió que los depósitos de péptido β A inician en la corteza y progresan al hipocampo con el envejecimiento iniciando las lesiones neuropatológicas que confirman la EA (Oddo et al., 2003). La detección intracelular de β A es clara desde los 3 meses de edad en la neocorteza y a los 6 meses en la región CA1 del hipocampo; a los 9 meses se confirmó que el modelo comienza a tener agregados intracelulares prominentes en el *SUB* y la región de CA1, mientras que agregados extracelulares β A son evidentes alrededor de los 11 a 12 meses en la corteza frontal y otras regiones corticales, así como en el hipocampo.



Figura 10. Modelo de ratón transgénico 3xTg-AD. Ejemplificación del constructo de modelo, a partir de la microinyección de los transgenes humanos APP695-Swe y tau-P301L en el pronúcleo de la célula embrionaria, de ratones knock in para PS1-M146V. Modificado de Oddo et al. 2003.

De forma paralela, las alteraciones en la proteína tau son notorias en las neuronas piramidales de CA1 a partir de los 12 meses y ambas patologías se desarrollan progresivamente de una manera dependiente de la región cerebral y de la edad (Oddo et al., 2003). Asimismo, se observa proliferación de poblaciones de astrocitos

y de microglía en cercanía a los depósitos amiloides conforme la edad y la patología avanzan (Kitazawa et al., 2005; Gimenez-Llort et al., 2007; Mastrangelo y Bowers, 2008).

Pirofosfato de Tiamina

Tiamina

La vitamina B1 o tiamina, también conocida como aneurina, es una vitamina hidrosoluble que se obtiene de la dieta y la microsuplementación, ya que puede ser sintetizada sólo por bacterias (Burkholder y McVeigh, 1942), hongos y plantas, pero no por mamíferos (Goyer, 2010). La tiamina está presente en las plantas en forma libre y en los tejidos animales en sus formas fosforiladas (Marcé-Grau, et. al, 2019).

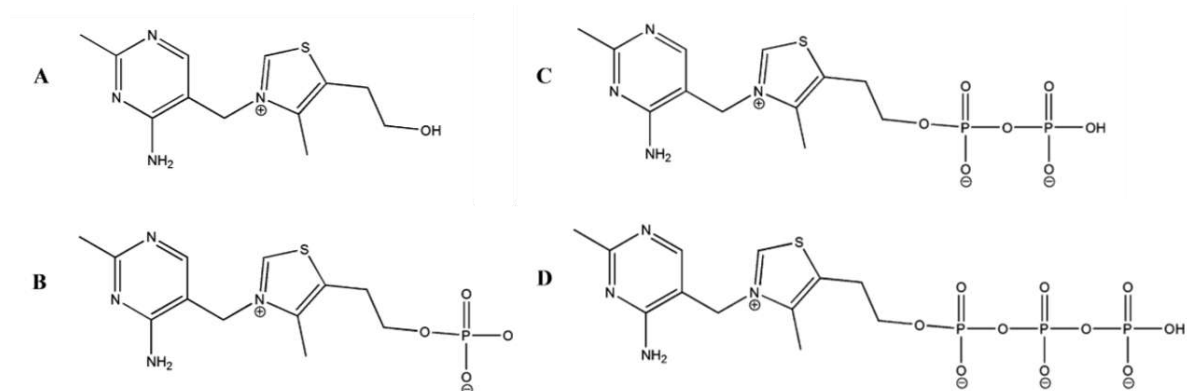


Figura 11. Estructuras químicas de las formas de tiamina. En (A), la representación de la tiamina libre, que se encuentra en diversas fuentes de alimentos y es esencial para todos los animales. Derivados de tiamina: en (B), tiamina monofosfato (TMP), en (C), pirofosfato de tiamina (TPP) y en (D), trifosfato de tiamina (TTP) Tomado de Manzetti et al., 2014.

La tiamina está compuesta por una pirimidina y un anillo de tiazol unidos por un grupo metileno, formando una estructura azufrada. La tiamina en su forma fosforilada (pirofosato de tiamina; TPP) participa en múltiples procesos metabólicos (Manzetti et al., 2014).

Metabolismo de la Tiamina

En la mitocondria el TPP es un grupo prostético de la E₁ de los complejos multienzimáticos, piruvato deshidrogenasa (PDH), α -cetoglutarato deshidrogenasa (α -KGDH) y la descarboxilasa de los α -cetoácidos de cadena ramificada (BCKDC) (Lemos et al., 2012). El TPP participa en la PDH en la descarboxilación del piruvato para sintetizar la acetil-CoA y en el complejo α -KGDH para la descarboxilación del

alfa-cetoglutarato en la síntesis de succinil-CoA en el ciclo de Krebs. Ambos procesos son indispensables en la oxidación aeróbica de la glucosa para la formación de ATP (Manzetti et al., 2014).

Por su parte, BCKDC interviene en la descarboxilación de los α -cetoácidos de cadena ramificada derivados de los aminoácidos (leucina, isoleucina y valina). La función disminuida del complejo de la BCKDC mitocondrial humana ocasiona cetoacidemia de cadena ramificada o la enfermedad conocida como “orina de jarabe de arce” (Danner et al., 1985).

En los peroxisomas, el TPP participa junto con un ion magnesio (Mg^{+2}) es cofactor de la 2-hidroxiacil-CoA liasa 1 (HACL1) en la α - oxidación del ácido fitánico y los ácidos grasos de cadena lineal 2-hidroxi-3-metil (Sniekers et al., 2006; Fraccascia et al., 2007). La importancia del correcto funcionamiento de HACL1 en los peroxisomas depende de que la vitamina B1 llegue en su forma activa fosforilada ya que no se ha detectado en estos organelos actividad de la enzima que la sintetiza, la tiamina fosfocinasa 1 (TPK1) (Fraccascia et al., 2007).

En el citosol el TPP participa junto con el ion calcio (Ca^{+2}) es cofactor, como grupo prostético de la transcetolasa, enzima que desempeña un papel fundamental en la vía de las pentosas fosfato, en la que se generan intermediarios glucolíticos, se produce nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y se lleva a cabo la síntesis de ribosa (Horecker, 2002). La transcetolasa cataliza las reacciones de la fase oxidativa mediante la conversión de ribulosa 5-fosfato en glucosa 6-fosfato para generar más NADPH, que es un componente clave para la síntesis de ácidos grasos y la generación de EROs en la vía metabólica (Kochetov y Solovjeva, 2014). Se ha asociado el deterioro funcional de la enzima transcetolasa con la deficiencia de tiamina observada en padecimientos del SNC como el síndrome de Wernicke-Korsakoff y la EA (Martin et al., 1995; Karuppagounder et al., 2009). Las principales fuentes de tiamina para los humanos son la carne y sus derivados (28.2%), seguidos de los cereales y granos enteros (23.2%), legumbres y verduras (11.6%), leche y sus derivados (9.5%) y frutas (6.4%) (Mielgo-Ayuso et al., 2018). En los humanos la vida media de la tiamina es de 9 a 18 días y se elimina por la orina y las heces (Manzetti et al., 2014). Los requerimientos mínimos de tiamina en adultos van de

los 0.4-1.1 mg/día en mujeres, 0.6-1.2mg/día en hombres y de 0.3-0.9 mg/día en niños en edad escolar (Changpeng Wang et al., 2018).

La tiamina se absorbe en la parte proximal del intestino grueso, donde las fosfatasas hidrolizan los ésteres de fosfato de tiamina y los convierten en tiamina libre (Turck et al., 2016; Said, Balamurugan, Subramanian, y Marchant, 2004). La absorción de tiamina libre se lleva a cabo por los transportadores de tiamina 1 y 2 (ThTR-1, ThTR-2) codificados por los genes SLC19A2 y SLC19A3 respectivamente. Los ThTR-1 y 2 son proteínas transmembrana que se expresan en las células epiteliales de los intestinos delgado y grueso (Said et al., 2004). La regulación de la absorción de tiamina en el intestino depende de las concentraciones y el requerimiento de tiamina. La **Tabla 1** muestra las ingestas dietéticas recomendada de tiamina (RDA) según el Instituto de Medicina de los Estados Unidos (NIH-Office of Dietary Supplements, 2023).

Tabla 1. Ingesta dietética recomendada de tiamina por grupos de edad y diferencias de sexo (NIH-Office of Dietary Supplements, 2023).

Grupo de edad	RDA (mg/día)
Lactantes (0-6 meses)	0.2
Lactantes (7-12 meses)	0.3
Niños (1-3 años)	0.5
Niños (4-8 años)	0.6
Niños (9-13 años)	0.9
Adolescentes (14-18 años)	1.2 (hombres) / 1.0 (mujeres)
Adultos (mayores de 19 años)	1.2 (hombres) / 1.1 (mujeres)
Mujeres embarazadas	1.4
Mujeres lactantes	1.5

Es importante tomar en cuenta que éstas son solo recomendaciones generales y que las necesidades individuales pueden variar dependiendo de factores como la dieta, la salud y la actividad física. Por ejemplo, una deficiencia dietética induce la síntesis de más ThTR-2 a través de mecanismos transcripcionales (Reidling y Said, 2005). Además de los ThTR existe otro transportador de tiamina denominado de alta afinidad para TPP (TPPT) codificado por el gen SLC44A4 (Nabokina et al., 2015).

El TPPT se expresa en células epiteliales del colon, próstata, tráquea y pulmones (Manzetti et al., 2014). El TPPT tiene un papel fundamental en la absorción de TPP proveniente del microbiota comensal y contribuye a la nutrición de los colonocitos (Marcé-Grau et al., 2019). Al llegar al torrente sanguíneo la tiamina se une a transportadores de tiamina de alta afinidad e ingresa a los eritrocitos donde se fosforila y forma TPP.

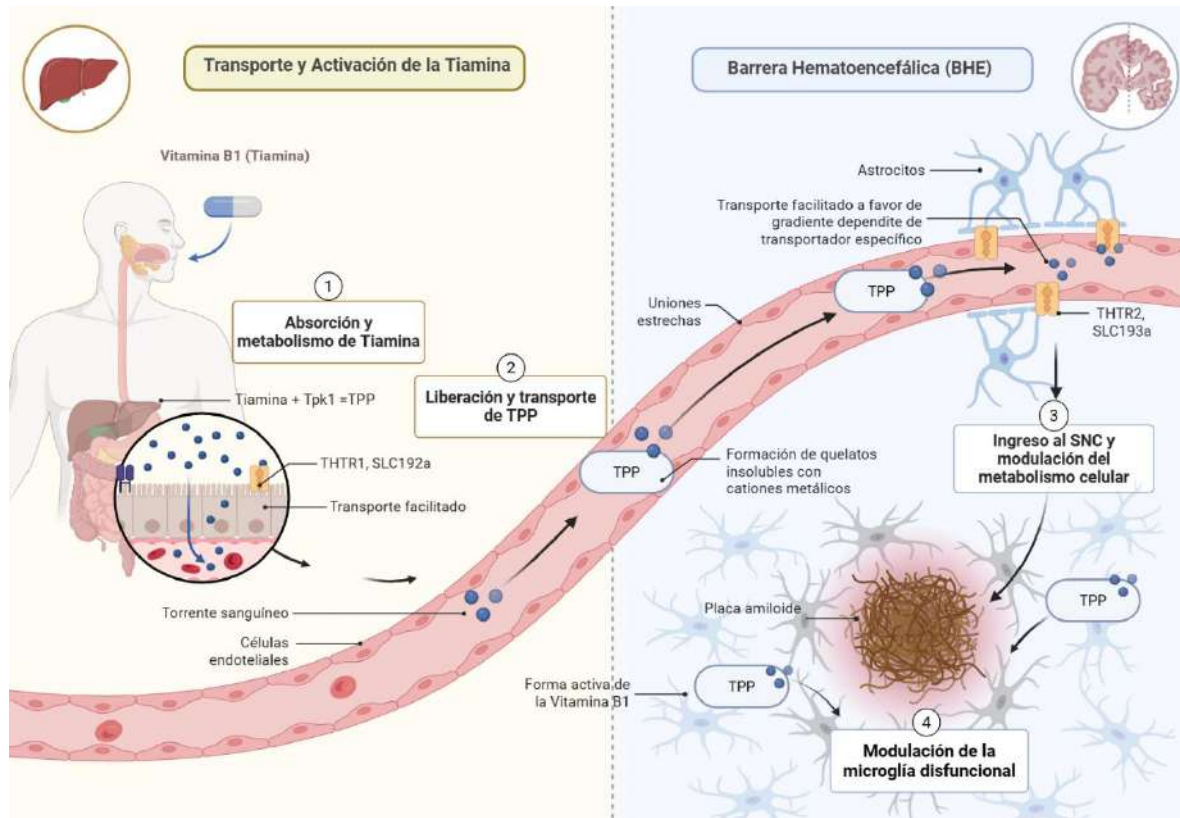


Figura 12. Metabolismo de la tiamina. En A, se ejemplifica la absorción de tiamina libre en el tracto gastrointestinal obtenida de los alimentos y el microbioma, seguido de su conversión a TPP por la TPK1 principalmente en el hígado, para llegar a diferentes órganos por medio del sistema circulatorio. En B, se observa el transportador específico SLC19a3 (familia de los acarreadores de soluto) que se encargan de pasar la tiamina a través de la barrera hematoencefálica (BHE) para transportar el TPP al tejido cerebral. En C, se muestran los 2 tipos celulares del SNC, las neuronas y diferentes células gliales con sus transportadores de membrana y la enzima TPK1. Ilustración creada con Biorender.com, Autoría de Nelly Jovana Pastén Castrejón. Creado a partir de Mergenthaler et al., 2013 y Marcé-Grau et al., 2019.

En las células la formación de TPP a partir de tiamina libre es realizada por dos enzimas (**Figura 12**), TPK1 y la fosforil transferasa (TTPATP), las cuales están presentes en el intestino delgado, el riñón, el cerebro, el hígado, el bazo y la placenta (Zhao, Gao, y Goldman, 2001; Marcé-Grau et al., 2019). El TPP es transportado a

través de la sangre a otros órganos incluido el cerebro, en donde células endoteliales y astrocitos de la barrera hemato-encefálica expresan el transportador SLC19A3. Por otra parte, la tiamina libre cruza las membranas celulares y se puede encontrar en fluidos extracelulares y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Gibson y Blass, 2007).

El contenido corporal total de tiamina se estima en 25 a 30 mg, ubicados en músculos esqueléticos, corazón, cerebro, hígado y riñones y en la sangre, el 80% de la tiamina se encuentra en los eritrocitos como TPP (Manzetti et al., 2014). Utilizando modelos *in vitro* se ha identificado que la tiamina participa en la regulación del crecimiento del soma neuronal y el desarrollo del árbol dendrítico de las células piramidales del hipocampo (Liu et al., 2017), una de las estructuras principalmente afectadas en la EA. Además, la suplementación con 100-500 mg/día de tiamina en pacientes con deficiencia nutricional o por deficiencia congénita de los transportadores o la TPK1 aseguran el neurodesarrollo normal cuando se administra a tiempo. La suplementación con tiamina también puede prevenir las descompensaciones metabólicas (Invernizzi et al., 2017) y produce mejoras en lesiones cerebrales (Banka et al., 2014). Se ha sugerido que la tiamina está asociada con enfermedades neurodegenerativas, a través de su papel en el metabolismo oxidativo y de glucosa (Gibson y Green, 2002; Gibson et al., 2013). La deficiencia de tiamina es una condición común en adultos mayores y en especial en los pacientes hospitalizados, además de que se ha implicado en la EA y la depresión (Pepersack et al., 1999). En las autopsias de pacientes con EA se ha encontrado disminución de la actividad de dos enzimas dependientes de tiamina en comparación con pacientes cognitivamente sanos (Koh, Charlton, Walton, y McMahon, 2015).

Benfotiamina

La benfotiamina (S-benzotiamina O-monofosfato) es un derivado sintético de la vitamina B1 con una biodisponibilidad mucho mayor que la tiamina (Beltramo et al., 2008) y presenta un anillo de tiazol abierto, lo que le permite alcanzar un grado mucho más alto de solubilidad en lípidos que las sales solubles en agua (Loew, 1996). Muchos derivados de la benfotiamina como la alitiamina y sulbutiamina se

desarrollaron originalmente en Japón para tratar el beri-beri, la neuropatía alcohólica y otras complicaciones neurológicas dolorosas (Sánchez-Ramírez et al., 2006; Volvert et al., 2008).

La benfotiamina no difunde a través de las membranas celulares, a menos que se encuentre parcialmente desfosforilado. Se ha probado que es capaz de prevenir complicaciones diabéticas como la neuropatía y retinopatía a partir del aumento significativo de los niveles de TPP en sangre e hígado, modificando la actividad de vías metabólicas, mejorando la actividad enzimática de la TK, teniendo efectos benéficos en los tejidos periféricos, pero no a nivel de sistema nervioso central (Volvert et al., 2008).

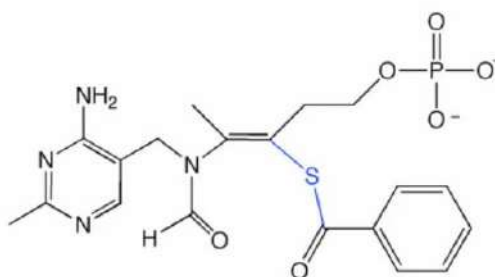


Figura 13. Estructura química de la benfotiamina. Derivado de la tiamina con un anillo de tiazol abierto que mejora su biodisponibilidad periférica durante su administración farmacológica. Tomado de Volvert et al., 2008.

TPP y neurodegeneración

El TPP posee dos fosfatos de alta energía y está involucrado en las reacciones del metabolismo intermedio y la respiración celular y contribuye a la prevención o reducción de la formación de EROs. La evidencia experimental ha comprobado que el TPP puede disminuir la degeneración causada por el daño oxidativo porque mejora el rendimiento de la respiración aeróbica (Torres et al., 2009; Hernández-Montiel et al. 2014), normaliza los niveles de peroxidación lipídica y es un potente inhibidor de la glicosilación no enzimática además de mejorar los sistemas antioxidantes endógenos como la catalasa (CAT), súper-óxido-dismutasa (SOD) y el sistema glutatión (GSH) (Tolstykh y Khmelevskiĭ, 1991).

En otros reportes se ha observado el efecto del TPP sobre aspectos patológicos en la diabetes y otras enfermedades crónico-degenerativas. Durante la retinopatía diabética inducida en ratas, el TPP previene la hiperglucemia disminuyendo la

cantidad de malondialdehído y el estrés oxidativo (Cinici et al.,2016). Por otro lado, el TPP evita el daño oxidativo en la hepatotoxicidad mejorando los sistemas antioxidantes de CAT, SOD y aumentando el antioxidante endógeno GSH (Hernández-Montiel et al., 2014).

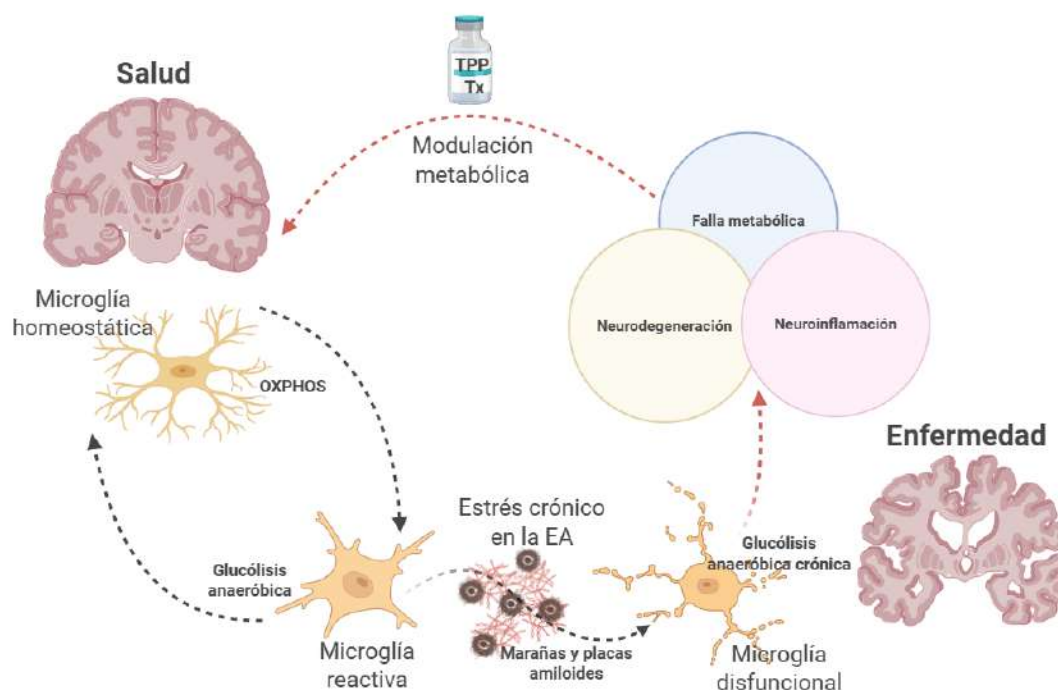


Figura 14. Modulación metabólica y funcional de la microglía en salud y enfermedad. En condiciones de salud, la microglía mantiene un estado homeostático con metabolismo predominantemente oxidativo (OXPHOS). Ante eventos de estrés crónico, como en la enfermedad de Alzheimer (EA), la microglía adopta un fenotipo reactivo que utiliza glucólisis anaeróbica. La exposición prolongada a agregados amiloides y marañas neurofibrilares favorece su transición hacia un estado disfuncional, caracterizado por glucólisis anaeróbica crónica, lo cual contribuye al círculo patológico de falla metabólica, neurodegeneración y neuroinflamación. La intervención con moduladores metabólicos como el pirofosfato de tiamina (TPP) podría restaurar la función microglial y favorecer la homeostasis cerebral. Ilustración creada con Biorender.com, Autoría de Nelly Jovana Pastén Castrejón.

Con relación a las enfermedades neurodegenerativas se ha descrito que se asocian a anomalías en el metabolismo de la glucosa y en los sistemas antioxidantes, además de inflamación y el aumento de la generación de EROs (Karuppagounder et al., 2009). El TPP como potente inhibidor de la peroxidación lipídica, puede llegar a evitar la lipotoxicidad y daño por estrés oxidativo en el SNC, por lo que podría actuar como un tratamiento que reduzca o retrase el progreso de procesos degenerativos asociados a diferentes factores de riesgo relacionados con el

envejecimiento (Gibson y Blass, 2007).

Recientemente, se ha revelado que la inflamación crónica generada por placas de β -amiloide puede suprimir la expresión de TPK1 en microglía, comprometiendo su metabolismo y función protectora, lo que incentiva la progresión de la enfermedad de Alzheimer. Mientras el A β soluble inicialmente incrementa la expresión de TPK1, la inflamación crónica generada por las placas de β A suprime fuertemente la expresión de esta enzima en microglía. Esta reducción metabólica compromete las funciones microgliales como la fagocitosis y el control del crecimiento de placas, creando un círculo vicioso que exacerba la patología amiloidea y la pérdida sináptica en modelos murinos de Alzheimer sin provocar muerte neuronal ni taupatía. Es decir, la deficiencia de TPK1 en microglía, promovida por inflamación asociada al ambiente neurodegenerativo, representa un mecanismo clave en la progresión de la enfermedad mediante la alteración del metabolismo y función microglial (Cheng et al., 2024).

Previamente se realizó un estudio en el que se administró TPP por medio de una bomba subdérmica en el ratón triple transgénico 3xTg-AD y se evaluó su efecto sobre el desempeño conductual en tareas dependientes del hipocampo como la construcción del nido y el laberinto acuático de Morris (LAM). A nivel histopatológico se evaluaron la cantidad de microglía y la acumulación de β A total en áreas relacionadas con el aprendizaje y la memoria como el SUB y el CA1 hipocampal por medio de análisis inmunohistoquímico. Se trataron dos grupos de animales 3xTg-AD: uno con pirofosfato (3xTg-TPP) y otro con solución vehículo (3xTg-SS), comparados con dos grupos control de no transgénicos (NoTg-TPP y NoTg-SS) bajo los mismos tratamientos. Los resultados neuroanatómicos mostraron en el grupo 3xTg-TPP que hubo una menor acumulación de β A en ambas áreas en comparación con el grupo 3xTg-SS. Además, en la conducta se observó una tendencia al retraso del déficit cognitivo en la prueba de construcción del nido y durante la fase de adquisición de la prueba de LAM en el grupo 3xTg-TPP (Pastén-Castrejón, 2019).

Es importante resaltar que uno de los aspectos más prometedores del tratamiento con TPP es su perfil de seguridad y compatibilidad con otros tratamientos, ya que

no presenta interacciones farmacológicas conocidas (Manzetti et al., 2014). Esta característica lo hace una alternativa viable al hablar de estrategias de intervención temprana, particularmente en fases prodrómicas de la enfermedad, donde podría utilizarse como una terapia nutricional o un coadyuvante orientado no solo a preservar la función cognitiva, sino también a modular el metabolismo celular (Cheng et al., 2024; Cinici et al., 2016; Hernández-Montiel et al., 2014). Esta propuesta se alinea con la necesidad actual de replantear la EA desde una perspectiva biológica, en la que el diagnóstico ya no dependa exclusivamente del síndrome clínico, sino de la identificación de biomarcadores específicos en la patología subyacente para brindar un tratamiento temprano (Jack Jr et al., 2018, 2024).

Puente entre la investigación y la atención clínica

Hasta el 2018, la EA se definió como un proceso biológico continuo e irreversible caracterizado por anomalías proteínicas, que pueden ser diagnosticadas en pacientes *in vivo* por medio de biomarcadores específicos de neurodegeneración como el sistema AT(N) donde se considera la amiloidosis (A), la taupatía (T) y la relativa neurodegeneración (N) establecidos por el *National Institute on Aging and Alzheimer's Association* (NIA-AA) (McKhann et al., 2011). Estos biomarcadores, sin embargo, se asocian también a otros trastornos o enfermedades. Más aún, estos biomarcadores, no son necesariamente la causa de la EA, que es un proceso patológico de origen multifactorial que conduce a la demencia amnésica multidominio, que puede presentar síntomas de deterioro cognitivo y sólo se puede confirmar con evaluaciones del tejido cerebral *post mortem* (Jack Jr et al., 2018).

En la actualidad, es necesario e imprescindible separar el síndrome (alteración clínicamente identificada) de la biología (etiología), puesto que esta biología puede dar lugar a diferentes presentaciones fenotípicas (Jack Jr et al., 2024).

Las implicaciones biológicas de la EA incluyen: 1) la EA se define por cambios neuropatológicos específicos, por lo que su detección mediante biomarcadores de estos cambios equivale a un diagnóstico; 2) la EA es un proceso continuo que puede identificarse en fases asintomáticas mediante biomarcadores clave, reflejando alteraciones tempranas en el procesamiento de proteínas; 3) los síntomas son

consecuencia del proceso patológico, pero no son necesarios para diagnosticar la enfermedad; 4) las personas sin síntomas pero con biomarcadores anormales ya tienen EA y están en riesgo de desarrollar síntomas, no simplemente de adquirir la enfermedad; y 5) los síndromes clínicos típicos de la EA pueden deberse a otras causas, por lo que la presentación clínica por sí sola no basta para el diagnóstico (Jack Jr et al., 2024).

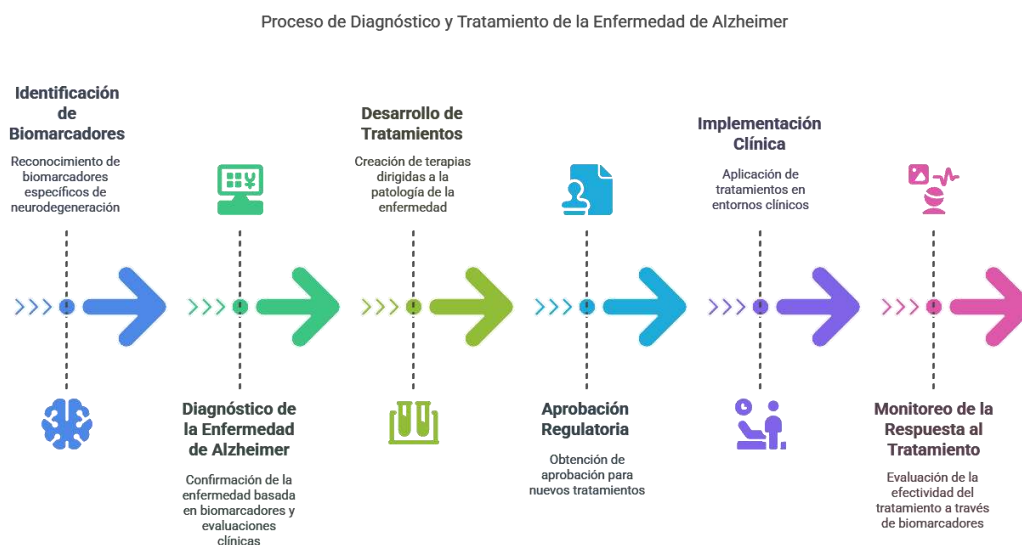


Figura 15. Proceso de diagnóstico y tratamiento de la EA. Representación del orden de pasos a seguir para Representación visual del tránsito desde los la implementación clínica y el uso de un tratamiento para la EA. La figura simboliza cómo intervenciones con TPP pueden conectar el conocimiento básico con estrategias terapéuticas tempranas y/o preventivas. Autoría de Nelly Jovana Pastén Castrejón.

Los avances clave que motivaron esta actualización fueron: la aprobación regulatoria de tratamientos dirigidos a la patología principal de la enfermedad de Alzheimer (EA), el desarrollo de marcadores sanguíneos (MBS) con alto potencial diagnóstico que podrían transformar el acceso al diagnóstico biológico, y el reconocimiento de que biomarcadores por imagen, líquido cefalorraquídeo (LCR) y MBS son en ciertos casos intercambiables dentro del marco AT(N) (Cullen et al., 2023; Brum et al., 2024). La evidencia actual fundamenta un marco diagnóstico y de estadificación común para la EA, cuya aplicación variará según el contexto clínico, sirviendo como puente entre la investigación y la práctica médica. Los detalles operativos del tratamiento deben abordarse en futuras guías de práctica clínica (Jack Jr et al., 2017).

El diagnóstico biológico complementario en pacientes con la EA, se ha priorizado tanto en la investigación como en la práctica médica (Zetterberg & Blennow, 2021). Futuras líneas de trabajo incluyen la realización de estudios con cohortes más representativas, la estandarización de ensayos de biofluidos y técnicas PET, una mejor comprensión de las modificaciones de la proteína tau y el papel de los procesos inmunes, así como la evaluación del impacto de nuevas terapias y biomarcadores (Jack Jr et al., 2024).

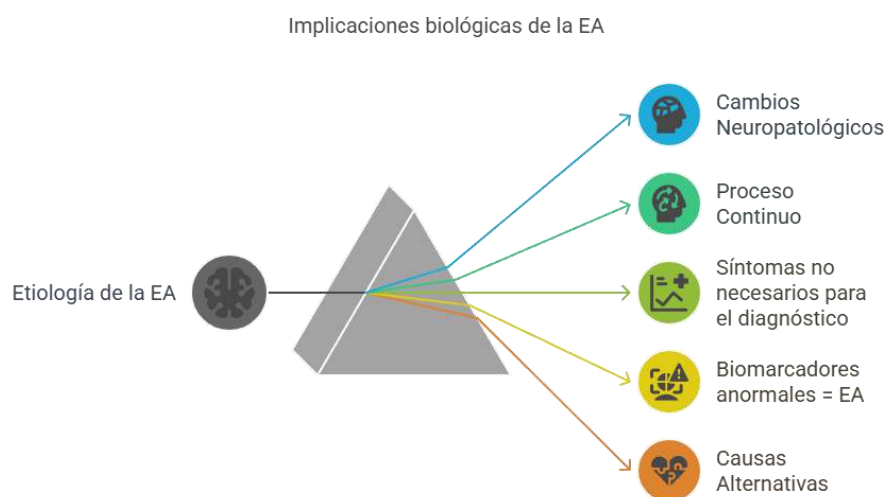


Figura 16. Implicaciones biológicas de la EA. Representación gráfica de cómo el proceso biológico que representa a la patología de la EA puede ayudarnos a encontrar terapias y momentos más tempranos para la aplicación de tratamientos antes de la aparición de los síntomas clínicos. Autoría de Nelly Jovana Pastén Castrejón.

En la actualidad, la mayoría de las terapias están centradas en reducir las placas amiloides con impacto en biomarcadores y síntomas, pero también generan cambios complejos en la neuroimagen que deben monitorearse.

En este contexto, el TPP podría representar una herramienta de transición entre la investigación básica y la atención clínica, al ofrecer una intervención que actúa sobre el metabolismo energético y la función microglial alterada, aspectos centrales en las fases preclínicas de la EA, como lo plantea el marco AT(N).

III. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

Justificación

Debido a que, la EA es una patología neurodegenerativa multifactorial, progresiva e irreversible, sin tratamientos disponibles que puedan modificar su desarrollo. Sin embargo, se ha propuesto el uso de fármacos que puedan mejorar la calidad de vida de los pacientes o que ayuden a entender los múltiples mecanismos por los que se origina daño en el SNC. El cerebro es el mayor consumidor de glucosa, un órgano con metabolismo demandante que representa el 2% del peso corporal total, pero que recibe aproximadamente el 20% de la energía derivada de la glucosa (Mergenthaler et al., 2013). El metabolismo de la glucosa proporciona el ATP necesario para la función fisiológica y mantenimiento de las células gliales y las neuronas. La pérdida de la homeostasis de dicho metabolismo precede a las alteraciones de tipo Alzheimer y se ha relacionado con la progresión de la enfermedad y el estado de neurodegeneración (Sang et al., 2018). Por otro lado, las células neuronales son el sustrato biológico de todos los procesos cognitivos, están especializadas en la transmisión y procesamiento de la información a través de señales químicas y eléctricas que da origen a cambios morfológicos que pueden ser perdurables y se relacionan con la reorganización sináptica y remodelación de circuitos a lo largo de la vida. La disminución de esta actividad neuronal aumenta la eliminación de sinapsis a partir de varias vías, lo que provoca el olvido. Durante la EA este olvido es patológico, progresivo, inevitable e irreversible y no se conocen por completo los mecanismos involucrados en el proceso, pero la microglía podría estar involucrada (Wang et al., 2020). En la actualidad se ha reconocido la neuroinflamación como una característica común en enfermedades neurodegenerativas. Por lo anterior las células gliales pueden ser los nuevos blancos celulares para encontrar estrategias terapéuticas y dilucidar cómo la neuroinflamación contribuye a la progresión de la EA (Timmerman et al., 2018). Existe evidencia de que la microglía expresa receptores del sistema inmune innato y tiene un papel clave en la neuroinflamación, lo que en principio tiene como fin la protección del SNC y puede también provocar lesiones tisulares y neurodegeneración por la producción de citocinas proinflamatorias y EROs/ERNs

(Kummer et al., 2011; Heneka et al., 2014). Aunado a esto, el cambio metabólico que sufren las células microgliales a partir del receptor *Triggering Receptor Expressed on Mieloid Cells 2* (TREM2), dos procesos interrelacionados afectan el perfil de expresión génica homeostática y el fenotipo asociado a la respuesta inmune de la microglía dando lugar a un tipo específico celular involucrado en la neurodegeneración llamado microglía asociada a la degeneración-enfermedad (DAM) (Keren-Shaul et al., 2017; Song y Colonna, 2018). La función metabólica alterada es común en las células bajo estrés, pero en la microglía se ha demostrado que un cambio de la glucólisis aeróbica a la glucólisis anaeróbica después de la interacción con β A causa una descomposición de ambas vías de forma crónica y afecta la capacidad funcional de la microglía (Baik et al., 2019b). Dentro de la oxidación aeróbica de la glucosa en la microglía están implicados procesos como el ciclo de Krebs, la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa para la formación de ATP. En el metabolismo aeróbico de la glucosa, el TPP es fundamental para su funcionamiento (Manzetti et al., 2014). En los complejos enzimáticos PDH y la α -KGDH el TPP participa como grupo prostético de la E1. Permitiendo la síntesis de acil-CoA a partir de piruvato y en el ciclo de Krebs de succinil-CoA a partir de alfa-cetoglutarato (Ryan, 2019).

Además, en diversas enfermedades neurodegenerativas el metabolismo dependiente de tiamina se ve afectado por la disminución de TPK1, enzima encargada de la síntesis del TPP, o la falta de ThTR-1 y 2 (Said et al., 2004; Liu et al., 2017). Igualmente, durante la EA los pacientes tienen desequilibrios en las concentraciones de tiamina en sangre y como resultado una menor actividad de las enzimas dependientes de tiamina (de Moraes et al., 2020). Por lo anterior, el tratamiento y suplementación con TPP podría ser una alternativa para contrarrestar los cambios relacionados al envejecimiento y el metabolismo energético de las células neuronales y microgliales. Dado que el TPP es un cofactor de enzimas limitantes en la producción energética y está directamente involucrado en el mantenimiento del metabolismo intermedio celular ha demostrado ser efectivo en el tratamiento del déficit metabólico asociado a estrés oxidativo e inflamación en células somáticas de modelos animales de envejecimiento, retinopatía diabética,

obesidad y polineuropatía diabética (Torres y Rubio, 2012; Hernández-Montiel et al., 2014; Cinici et al., 2016). Por lo anterior, se propone al TPP como tratamiento para evitar el hipometabolismo en la microglía expuesta a la neurodegeneración de tipo Alzheimer en el modelo murino para la enfermedad de tipo Alzheimer 3xTg-AD, hasta ahora el mejor modelo de esta enfermedad porque contiene validez histopatológica y de constructo biológico que le permiten imitar con similitud gran parte de los mecanismos patológicos que se observan en el humano (Bilkei-Gorzo, 2014; Oddo et al., 2003). Este modelo triple transgénico desarrolla la amiloidosis, taupatía y neuroinflamación de manera progresiva con un perfil temporal y regional específico que imita la EA. Este trabajo se realizará en colaboración con el Instituto de Neurobiología para potenciar la viabilidad del proyecto y propiciar la vinculación científica de la UAQ con otras instituciones.

Pregunta de investigación

¿Puede el TPP rescatar las funciones inmunes microgliales y reducir la pérdida de espinas en el modelo murino 3xTg-AD para la enfermedad de tipo Alzheimer?

IV. HIPÓTESIS

El TPP rescata la función microglial y revierte la pérdida de espinas en el modelo murino 3xTg-AD para la enfermedad de tipo Alzheimer.

V. OBJETIVOS

General

Determinar el efecto del TPP sobre la microglía y las espinas dendríticas en el hipocampo del modelo murino 3xTg-AD para enfermedad de tipo Alzheimer.

Particulares

1. Analizar el deterioro conductual mediante las pruebas de LAM y construcción del nido.
2. Identificar las diferencias morfométricas microgliales en las áreas de *SUB* y *CA1* del hipocampo
3. Caracterizar y cuantificar la densidad de las espinas dendríticas de las células piramidales en las áreas de *SUB* y *CA1* del hipocampo
4. Analizar los perfiles celulares por mensajero en el hipocampo y determinar el fenotipo de la microglía.
5. Correlacionar los perfiles celulares con la densidad de espinas dendríticas de las áreas de *SUB* y *CA1* del hipocampo
6. Relacionar los perfiles celulares con el deterioro conductual de los ratones 3xTg-AD tratados con TPP.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de Investigación

El diseño del presente estudio es de tipo experimental, controlado, doble ciego.



Figura 17. Diseño experimental establecido para el cumplimiento de objetivos que nos permitan evaluar la hipótesis del proyecto de investigación. Abreviaturas: WT, *wild type* (NoTg), VH, vehículo (SS), PPT, pirofosfato de tiamina (TPP), LAM, Laberinto Acuático de Morris. Ilustración creada con Biorender.com, Autoría de Nelly Jovana Pastén Castrejón.

Animales

Los procedimientos experimentales se realizaron bajo la aprobación de comité de bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (No. Registro 117.A). Se utilizaron ratones hembra 3xTg-AD homocigotos de 9 meses de edad generados a partir de un fondo híbrido B6129S (n=20), así como ratones controles no transgénicos de la misma edad y sexo. Los animales se mantuvieron bajo el mismo fondo híbrido B6129S (n=20).

Todos los ratones se reprodujeron y criaron en el bioterio del Instituto de Neurobiología (INB)-UNAM, en cajas de policarbonato (12x12x25 cm) con alimento para ratón del laboratorio Purina Chow formula 5001 y agua *ad libitum*. Para las condiciones de alojamiento se mantuvieron a una temperatura constante entre 20-25 °C, humedad 40-70 % y un ciclo de luz/oscuridad de 12 h.

Implantación de bombas osmóticas y grupos experimentales

Para minimizar posibles sesgos en el experimento, se adoptó un protocolo doble ciego, en el que los investigadores no conocían las claves alfanuméricas asignadas a los grupos experimentales durante todo el proceso, desde la cirugía hasta la evaluación conductual e inmunohistoquímica. En los tratamientos con TPP, se preparó una solución stock mezclando el TPP con solución salina, administrando una dosis de 2 mg/kg/día. Para el tratamiento vehículo, se utilizó únicamente solución salina. Los grupos experimentales fueron los siguientes: transgénicos tratados con TPP (3xTg-TPP, n=10), transgénicos tratados con vehículo (3xTg-SS, n=10) y ratones no transgénicos con los mismos tratamientos, como grupo control (NoTGg-TPP n=10, NoTg-SS n=10).

La cirugía consistió en una incisión de 3 cm en la línea media dorsal, seguida de la separación de la piel del músculo y la inserción de la bomba debajo de la piel, cerrándose finalmente con suturas. La bomba implantada contenía el TPP o el vehículo, según correspondiera. Los animales fueron anestesiados 15 minutos antes de la cirugía con una mezcla de ketamina y xilacina en una proporción 70:30, administrando 70 mg/kg y 6 mg/kg de cada uno de los fármacos, respectivamente. El fármaco fue administrado mediante bombas osmóticas (modelo 2006, Alzet, Durect).

Conducta

La fase conductual se llevó a cabo posterior a la fase de aclimatación de los animales, en la que se habituarán durante una semana al ciclo invertido de luz/oscuridad. Posteriormente, los ratones se colocaron en contenedores individuales 2-3 días previos al inicio de la prueba de construcción del nido y LAM.

Construcción del nido

Esta tarea se evaluó en la última semana de tratamiento después de la habituación y manipulación de los animales y previo a la tarea del LAM. Esta prueba se realizó de acuerdo a Deacon (2012), utilizando círculos de algodón plisado de 5 x 5 cm, capturando la imagen final del nido en fotografía y pesando el material utilizado para su realización. Lo anterior con el fin de poder calificar los nidos en escala de intervalos del 1 al 5, siendo 1 la no realización de la tarea y 5 la construcción

satisfactoria del nido.

Laberinto Acuático de Morris

La prueba de LAM se aplicó de forma consecutiva a la construcción del nido. El método y parámetros para evaluar esta prueba se basarán en los protocolos de Vorhees y Williams, (2006). Se utilizó un tanque circular (1 m de diámetro y 0.4 m altura), de color blanco a una distancia de 0.8 m del suelo, lleno de agua mezclada con pintura témpera del mismo color del tanque, a una temperatura entre 21-23 °C. El tanque se dividió por dos ejes principales, en forma de “+”, lo que dio como resultado la formación de 4 cuadrantes iguales. Además, se colocaron figuras de diferentes formas y colores, distribuidas en las paredes de la habitación que sirvieron como claves extra-laberinto.

Durante la fase de adquisición, los ratones fueron entrenados para nadar hacia una plataforma de acrílico transparente (8 x 8 cm de lado y 15 cm de alto), que estaba sumergida a 1.5 cm debajo de la superficie del agua e invisible para los ratones mientras nadan. Se realizaron 4 ensayos de este entrenamiento por día por 4 días en total, en cada sesión el ratón se colocó en el tanque desde uno de los puntos de inicio ubicados en los cuadrantes en un orden semi-aleatorio.

Se permitió al ratón escapar a la plataforma sumergida para evaluar su latencia de escape en segundos, mientras realizaban un nado libre de máximo de 60 s.

En el quinto día de la prueba, para el caso de la fase de memoria, se retiró la plataforma de acrílico y se dio la oportunidad al ratón de realizar la búsqueda de la misma durante un tiempo máximo de 60 s, aquí se evaluó la forma del nado del ratón y el número de entradas al cuadrante donde se encontraba anteriormente la plataforma, al igual que la latencia de escape.

Todas las pruebas fueron grabadas y analizadas con el software SMART Video Traking System (Panlab Harvard Apparatus), con el cual también se definieron los perímetros, los cuadrantes y las locaciones de la plataforma de escape.

Punto final humanitario

Al finalizar los diferentes tratamientos, los ratones de cada una de las diferentes condiciones experimentales fueron llevados a punto final humanitario por decapitación para la obtención de tejido en fresco y por administración de una dosis

letal de pentobarbital sódico (0.22ml/kg) para los tejidos fijados. Posteriormente fueron fijados por perfusión cardiaca con una solución de paraformaldehído 4% (PFA 4%) en solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) 0.1 M a pH 7.4.

Procesamiento del tejido

Inmunohistoquímica

El tejido cerebral fue extraído al momento del punto final e inmediatamente seccionado para los diferentes procedimientos. Luego de 24 h en post fijación en PFA 4% los tejidos se cambiaron a una solución de sacarosa al 30% por 48 h para ser crioprotectados y cortados por congelación en criostato (Leica Biosystems) con un grosor de 40 μ m. Se seleccionaron de 4 a 5 cortes del hemisferio izquierdo de cada animal y a continuación serán lavados en flotación con PBS 0.1 M por 10 min, luego incubadas en buffer de citratos a 80-100°C por 20 min para lograr la exposición de epítopes, seguido de 3 lavados con PBS de 10 min cada uno. Las secciones fueron permeabilizadas con 0.05% de Tritón 20 + PBS 0.1 M (PBS-T) por 15 min. En la **Tabla 2** se muestran los reactivos a utilizar en el procesamiento inmunohistoquímico. Para localizar las células microgliales se utilizó el anticuerpo primario policlonal hecho en cabra Iba-1 (1:500; abcam, ab107159), que reconoce las moléculas de enlace a calcio ionizado que se expresa en la microglía (Ito et al., 1998). El anticuerpo en mención se incubó con los tejidos durante toda la noche en agitación a 4°C. Al día siguiente los tejidos fueron lavados con PBS, 3 veces por 10 min en cada ocasión a temperatura ambiente. Hecho lo anterior, se aplicó el anticuerpo secundario biotinilado correspondiente, un anti-cabra (1:500; Vector Labs, Biotinylated Horse AntiGoat IgG Antibody; BP-9500) por 2 h, continuando con el sistema de amplificación de A+B (Sistema Avidina y Biotina; 50:2500; Vector Labs; PK6100) por 30 min. Se realizaron tres lavados de 10 min con PBS y finalmente, se procedió a revelar la marca de los anticuerpos con el sistema DAB y glucosa oxidasa. Los cortes fueron montados en PBS 0.05 M en portaobjetos para ser deshidratados en xilol y cubiertos con resina de montaje (Baik et al., 2019).

Tabla 2. Reactivos para procesamiento inmunohistoquímico.

Reactivo	No. De catalogo	Marca
Rabbit polyclonal Anti-Iba-1	019-19741; RRID: AB_839504	Wako Pure Chemical Corporation
Biotinylated Horse Anti-Goat IgG Antibody	BP-9500	Vector Labs
Sistema Avidina y Biotina (A+B) y Diaminobencidina (DAB)	VECTASTAIN ABC PK-6100	Vector Labs

Tinción Golgi-Cox

En el caso de la técnica de Golgi-Cox rápido modificada por Diaz-Cintra et al. (1981), se fijó a los animales con una solución de PFA al 4% y cuando las extremidades, orejas, y nariz del ratón tomaron un tono blanco, se obtuvo el tejido cerebral por decapitación. Después se colocó la cabeza en un frasco con PFA 4% para la posfijación durante 1-2 horas. Transcurrido el tiempo se removió el cerebro y en seguida se colocaron los tejidos en las soluciones para la tinción de Golgi-Cox.

Los tejidos obtenidos se colocaron en una solución de dicromato de potasio al 4.5 % en solución de buffer pH 7, por 5 h. Posteriormente los tejidos se transfirieron a solución fresca de 1 parte de ácido ósmico al 1% por 4 partes de dicromato de potasio al 4.5%, los cerebros permanecieron un máximo de 12 días en esta solución, para después proceder a la diferenciación con nitrato de plata al 0.75% por 1 h, se cambia la solución por una solución fresca y se deja reposar de 18 a 24 h. Los tejidos teñidos y diferenciados se lavaron con agua destilada y se limpió el exceso de cristales y efectuado lo anterior se procedió a la deshidratación con soluciones de etanol con diferente graduación (50%, 70%, 80% y 95%), se hicieron dos cambios cada 30 minutos en cada solución de etanol, prosiguiendo con dos cambios de etanol absoluto de 1 h cada uno. Al término de la deshidratación se incluyeron los tejidos en nitrocelulosa de baja viscosidad al 1%, durante 24 h y transcurrido el tiempo indicado el bloque se retiraron para ser pasado por concentraciones mayores de nitrocelulosa al 5%, 7% y 12% permaneciendo 24 h en cada solución. Finalmente, en una concentración de 30% se dejaron 48 h y una vez que estuvieron formados los bloques embebidos en nitrocelulosa se colocaron en moldes de plástico, dentro de un desecador conectado al vacío con el fin de extraer el aire

contenido entre el tejido y la nitrocelulosa, para terminar esta operación los moldes fueron puestos en otro desecador con cloroformo puro durante 12 h para que su endurecimiento facilitara el corte en el microtomo.

Microscopía y análisis de imagen

Las imágenes de inmunohistoquímica enzimática (Iba-1) y las muestras de la tinción por Golgi-Cox, fueron obtenidas de dos campos de los tejidos procesados, la región de SUB y CA1 del hipocampo. Se utilizó un microscopio Nikon modelo Eclipse CIE, mediante el software NIS- Elements Viewer. Para el análisis de las fotografías se usó el software de procesamiento de imagen ImageJ (National Institutes of Health). Las imágenes se analizaron bajo un protocolo de ciego para evitar sesgos en la obtención de la información.

Obtención de ARN para RT- qPCR

El ARN total se extrajo por el método de Trizol® (Life Technologies), a partir de tejido cerebral homogenizado por maceración. Brevemente, se añadió 1 ml de Trizol por cada 100 mg de muestra, después la muestra se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se añadieron 0.2 ml de cloroformo por cada ml de Trizol utilizado. Se centrifugaron y recuperaron la fase acuosa en un tubo nuevo. En seguida, se añadieron 0.5 ml de isopropanol por cada ml de Trizol utilizado y se incuban por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifuga. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado de ARN se resuspendió en 100 µl de agua libre de ARNasas (1µl de inhibidor de ARNasas/ 500ul de H₂O). Una vez obtenidas las muestras se cuantificó el ARN a 260/280 nm en un espectrofotómetro Nanodrop ND-2000 (Thermo Scientific) para determinar su pureza y rendimiento. Para realizar la electroforesis de ARN total se hizo un gel de agarosa al 1% y se tiñó con SYBRgreen.

Síntesis de ADNc y condiciones de RT-qPCR

El ARN obtenido se utilizó para realizar la retrotranscripción y así sintetizar el ADNc. El ARN se incubó con 500ng de poliA a 37 °C durante la noche en un volumen de reacción total de 10 µl que contenía los cebadores hexámeros aleatorios (5 µM; Roche), ditiotreitól (DTT, 10 mM; Gibco BRL), los cuatro desoxirribonucleótidos

trifosfatos (dNTP, 0,5 mM cada uno; Pharmacia), 20 U de inhibidor de ribonucleasa (Promega) y 100 U de transcriptasa inversa (Superscript [™] II; Gibco BRL). El ADNc se mantuvo a -70 ° C hasta la amplificación por PCR. El ADNc se purificó, diluyó y cuantificó usando un Biofotómetro (Eppendorf).

Análisis estadístico

El análisis estadístico y los gráficos se realizaron con ayuda del programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, La Jolla, CA), el programa SPSS (IBM, Statistics 24.0) y el programa R (GNU, R Development Core Team). A todos los datos se les aplicó la prueba de D'Angosino-Person para determinar si los datos se distribuían de forma Gaussiana. Para los datos normales se aplicaron pruebas *t de Student* para pares de muestras o Análisis de Varianza (ANOVA) una o dos vías o pruebas no paramétricas equivalentes según sea el caso. Los datos paramétricos se presentan como el promedio $\pm$ la desviación o el error estándar de la media (SEM). Los datos no paramétricos se presentarán como la mediana y el rango intercuartílico. Se indican las condiciones estadísticamente solo cuando son diferentes del control: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns, no significativo.

VII. CONSIDERACIONES BIOÉTICAS

El desarrollo experimental se llevó a cabo siguiendo la norma No. 313 para la Presentación de Proyectos e Informes Técnicos de Investigación en las instituciones de Atención a la Salud. Además, se siguieron los lineamientos de las normas internacionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio establecidas por el *National Research Council* (2010) y la Norma Oficial Mexicana de Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) NOM-062 ZOO-1999, la cual establece las medidas de cuidado y uso de animales de laboratorio con propósitos de investigación o enseñanza. Los residuos biológico-infecciosos se trataron conforme la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

Además, se siguieron los principios éticos universales establecidos por el Consejo Internacional de Organizaciones Médicas (CIOMS) para el uso y cuidado de los

animales de laboratorio, por lo tanto:

- Se priorizó el avance del conocimiento, la protección de la salud y/o el bienestar de los animales requeridos en esta experimentación.
- Se reemplazó a los animales o se usarán métodos alternativos en la medida posible.
- Se realizó la experimentación en animales después de justificar y estudiar su importancia para la generación del conocimiento y el mantenimiento de la salud humana.
- Se seleccionaron animales de especie y calidad apropiadas para requerir el mínimo número de individuos y obtener resultados científicamente válidos.
- Se trató a los animales como seres sensibles y será imperativo su cuidado y su uso, evitando y/o minimizando las molestias, la angustia, el estrés y el dolor.
- Los procedimientos que podían causar dolor o angustia momentánea o mínima se realizaron bajo sedación, anestesia o analgesia. No se realizaron procedimientos quirúrgicos o dolorosos en animales no anestesiados.
- Los animales mantenidos bajo experimentación con fines biomédicos tuvieron las mejores condiciones de vida posibles y estaban bajo la supervisión de personal altamente calificado y veterinarios con experiencia en la crianza, la manipulación, el punto final humanitario y la bioética del trabajo con animales de laboratorio.
- Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro (FM-UAQ, número de protocolo 12853, fecha de aprobación: 28 de octubre de 2021) y cumplieron con los lineamientos institucionales del Instituto de Neurobiología (INB-UNAM; número de protocolo 057, fecha de aprobación: 28 de febrero de 2013), así como con las normas internacionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NIH). Para minimizar el sesgo experimental, todos los procedimientos —desde la implantación quirúrgica hasta las pruebas conductuales y el análisis inmunohistoquímico— se realizaron bajo condiciones de cegamiento.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El TPP mejora el desempeño cognitivo del modelo 3xTg-AD

Para analizar el nivel del deterioro conductual utilizamos dos pruebas, en primer lugar, la construcción del nido que es una conducta innata dependiente del hipocampo que realizan hembras y machos en la que podemos evaluar la puntuación de los nidos del 1 al 5 (Deacon, 2012). El 1 es el puntaje más bajo y representa la calificación para un ratón que no tocó el algodón para construir el nido, mientras que el 5 representa el mayor puntaje posible donde los ratones lograron construir un nido que forma un cráter, en donde caben y cubre su cuerpo por completo (Deacon, 2012). El grupo 3xTg-SS mostró las puntuaciones significativamente más bajas en la tarea de construcción del nido en comparación con los grupos NoTg, indicando el avance esperado del deterioro cognitivo en el modelo 3xTg. En contraste, el grupo 3xTg-TPP no presentó diferencias significativas con los grupos NoTg-SS y NoTg-TPP, lo que sugiere un rescate de la función cognitiva afectada en nuestro modelo después del tratamiento con TPP (**Figura 18 y 19 A**).



Figura 18. Imágenes representativas de los puntajes que pueden ser obtenidos en la tarea de construcción del nido. Fotografías representativas de la prueba. Autoría Nelly Jovana Pastén Castrejón.

El deterioro cognitivo de los ratones 3xTg-AD comienza a observarse alrededor de los 4 m.d.e. y esto se correlaciona con la aparición inicial de la patología intracelular de β -amiloide en las regiones del SUB y CA1 hipocampal, avanzando

paulatinamente hacia la corteza y la amígdala. Aunque, las placas extracelulares de β - amiloide se hacen evidentes a partir de los 6 m.d.e. y aumentan con la edad, por la presencia de ovillos neurofibrilares hasta los 12 m.d.e. aproximadamente (Belfiore et al., 2019; Javonillo et al., 2022; Sterniczuk et al., 2010).

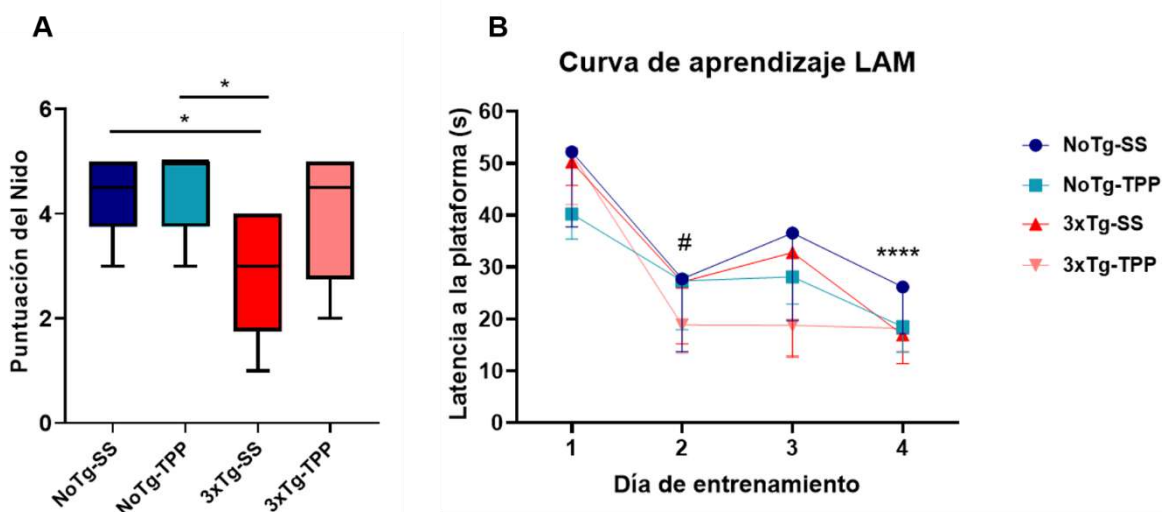


Figura 19. El tratamiento con TPP rescata la conducta del nido en los ratones 3xTg-AD. (A) Comparación de las puntuaciones del nido entre los tratamientos. Se utilizó el test de Kruskal-Wallis ($n = 10$ por grupo), resultando en diferencias significativas entre las medianas de los grupos ($H = 11.49$, $p = 0.0093$). Los datos se representan como mediana $\pm$ rango intercuartílico. *Post-hoc* de Dunn con corrección de Bonferroni ($* p < 0.05$). El grupo 3xTg-TPP obtuvo mayor cantidad de puntuaciones similares a los grupos control NoTg con y sin tratamiento y estos a su vez puntuaciones significativamente diferentes al grupo 3xTg-SS. (B) Latencia a la plataforma en segundos (s) a lo largo de 4 días de entrenamiento para los distintos tratamientos. Datos representados como media $\pm$ SEM ($n=10-13$ por grupo). Análisis realizado mediante ANOVA de dos vías con medidas repetidas, con corrección Geisser-Greenhouse. Se encontró un efecto significativo del día de entrenamiento $F(2.821, 53.61) = 32.82$ ($**** p < 0.0001$) y del tratamiento a partir del día 2, $F(19, 57) = 1.892$ ($\# p=0.0333$), sin interacción significativa ($p = 0.4302$).

Por otro lado, Hirata-Fukae et al. (2008) reportaron que las hembras 3xTg-AD desarrollan y exhiben una patología amiloide más agresiva que los machos, lo que podría contribuir a mayores alteraciones conductuales relacionadas con ansiedad y miedo, esto podría explicar en parte la variabilidad observada en los resultados de la conducta de construcción del nido de nuestro grupo 3xTg-TPP. Este hallazgo es interesante porque las hembras 3xTg-AD son un modelo adecuado para estudiar alteraciones no solo relacionadas al deterioro cognitivo como se explora en este trabajo, sino también de cambios en la hiper-excitabilidad y alteraciones neuropsiquiátricas relacionadas con la ansiedad y el miedo, sobre todo en un contexto de influencia hormonal y respuesta al estrés, y en especial cuando no son

ovarioectomizadas (Sterniczuk et al., 2010; Wang et al., 2025).

Otra prueba que realizamos para el análisis del deterioro conductual fue la prueba de adquisición de LAM, donde evaluamos el efecto del TPP en el aprendizaje espacial de ratones 3xTg-AD (**Figura 19 B**). En este caso observamos que todos los grupos alcanzaron la disminución de latencia a la plataforma al cuarto día con respecto al primer día de entrenamiento de manera significativa. Sin embargo, al examinar la curva de aprendizaje diaria, fue notorio que, a partir del segundo día el grupo 3xTg-TPP presentó la menor latencia para alcanzar la plataforma y está se conservó hasta el cuarto día. A diferencia del grupo 3xTg-SS mostró mayor variabilidad en la latencia promedio, indicando un aprendizaje menos consistente y potencial deterioro en la adquisición espacial (**Figura 16 B**). Este hallazgo sugiere que el tratamiento con TPP podría atenuar algunos déficits cognitivos asociados al modelo, el cual presenta deterioros en la memoria relacionados con la disfunción sináptica y acumulación de tau fosforilada que afectan regiones claves del hipocampo como CA1 que es una salida fundamental de información hacia la corteza entorrinal y CA3 que procesa y recibe la información espacial y de memoria, ambas regiones son claves para el procesamiento de la memoria y la integración de la información a nivel central (Geiller et al., 2023; Javonillo et al., 2022).

La mejora observada en el desempeño del grupo 3xTg-TPP podría estar relacionada con la modulación positiva sobre las vías sinápticas afectadas, mejorando la capacidad del aprendizaje y la memoria espacial deterioradas en este modelo. Además, el metabolismo y la función microglial constituyen un componente fundamental en la progresión de la patología del Alzheimer en el modelo 3xTg-AD. Se ha demostrado que la acumulación de placas amiloides induce una respuesta microglial marcada por un cambio metabólicos hacia estados proinflamatorios, caracterizados por el aumento del consumo energético y la producción de mediadores reactivos que pueden exacerbar el daño neuronal y comprometer la plasticidad sináptica (Baik et al., 2019b; Balderrama-Gutierrez et al., 2021; Crapser et al., 2020; Keren-Shaul et al., 2017).

La mayor variabilidad observada en nuestros experimentos en el grupo 3xTg-SS podría reflejar una microglía altamente reactiva y disfuncional que contribuye a la

neuroinflamación y deterioro cognitivo, lo que impacta negativamente el aprendizaje espacial.

Por lo anterior, inferimos que, el tratamiento con TPP podría tener un efecto modulador sobre la microglía en especial sobre su metabolismo, promoviendo un perfil más neuroprotector y antiinflamatorio que facilite la restauración de sus funciones neuroprotectoras (Lepiarz-Raba et al., 2023). Esta hipótesis estaría en línea con los reportes que señalan que la regulación del estado funcional de la microglía puede disminuir la pérdida de redes perineuronales y la neurotoxicidad asociada, mejorando la plasticidad y el desempeño en tareas de memoria como se observó previamente en los modelos transgénicos y pacientes con Alzheimer (Gibson et al., 2022; Gibson & Blass, 2007; Sang et al., 2018).

De este modo, la mejora observada en el grupo 3xTg-TPP sugiere que esta intervención farmacológica puede mitigar el déficit cognitivo del modelo 3xTg-AD y destacar la importancia de considerar el metabolismo celular glial como un blanco terapéutico valioso en la enfermedad de Alzheimer.

El TPP tiene un efecto sobre la morfología microglial del hipocampo

Para analizar e identificar las diferencias morfométricas de las células microgliales de la región de SUB y CA1 del hipocampo en los ratones 3xTg-AD tratados con TPP, se llevó a cabo el procesamiento de imágenes tomadas a partir de la preparación inmunohistoquímica de tejidos para la detección de la microglía utilizando el marcador Iba-1, como se describe en la **Figura 18**.

En un análisis preliminar, para la elección de los parámetros morfológicos medidos se tomaron de referencia los trabajos de Morrison et al. (2017) y Fernández-Arjona et al. (2017). En donde se realizan análisis de la dimensión fractal que se refiere a la complejidad de las ramificaciones microgliales y contribuye a la identificación de formas intermedias en el gradiente entre la morfología ameboide más redondeada hasta la morfología ramificada.

También se midieron; la lacunaridad, que expresa la heterogeneidad del perfil celular y explica la distribución de los px y los espacios entre ellos, la relación de aspecto, que mide la relación entre el eje más largo y corto de la célula, la densidad, que nos demuestra la compactación celular, la circularidad, que aborda la regularidad de la superficie y la longitud total de los procesos obtenidos de los esqueletos microgliales, representada por los px totales por célula (**Figuras 20-22**).

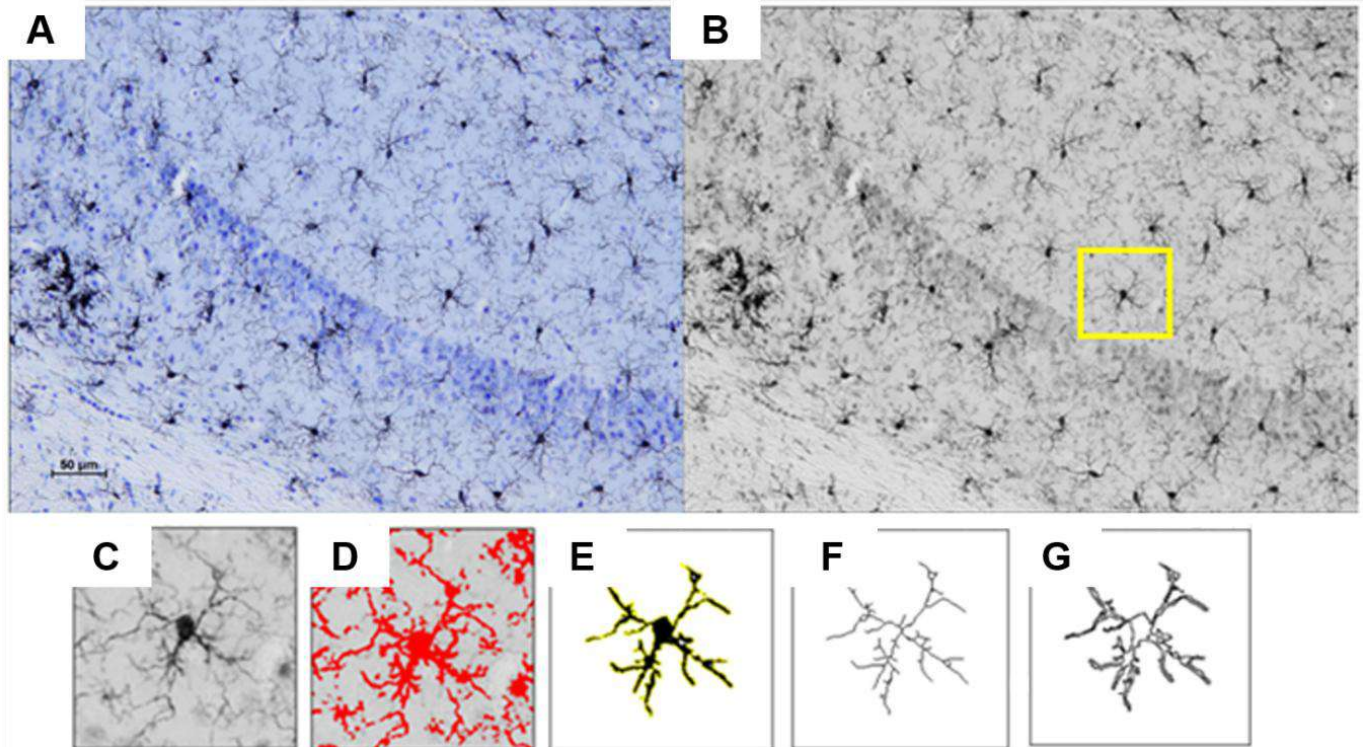


Figura 20. Imágenes representativas del procesamiento para el análisis morfométrico de la microglía en la región de CA1. Las imágenes fueron obtenidas con un aumento de 40x en (A) Las imágenes se convirtieron a 8bits y posteriormente se seleccionaron las microglías con recuadros de 20x20 px en (B), ampliación de la microglía seleccionada en (C). Se utilizó el plugin *threshold* en (D), para obtener el trazo de la célula y completar su patrón a mano en (E) Para finalmente utilizar el plugin *skeletonize* para obtener el esqueleto en (F) y el perímetro celular en (G) Se utilizó en programa ImageJ (barra de escala = 50 µm).

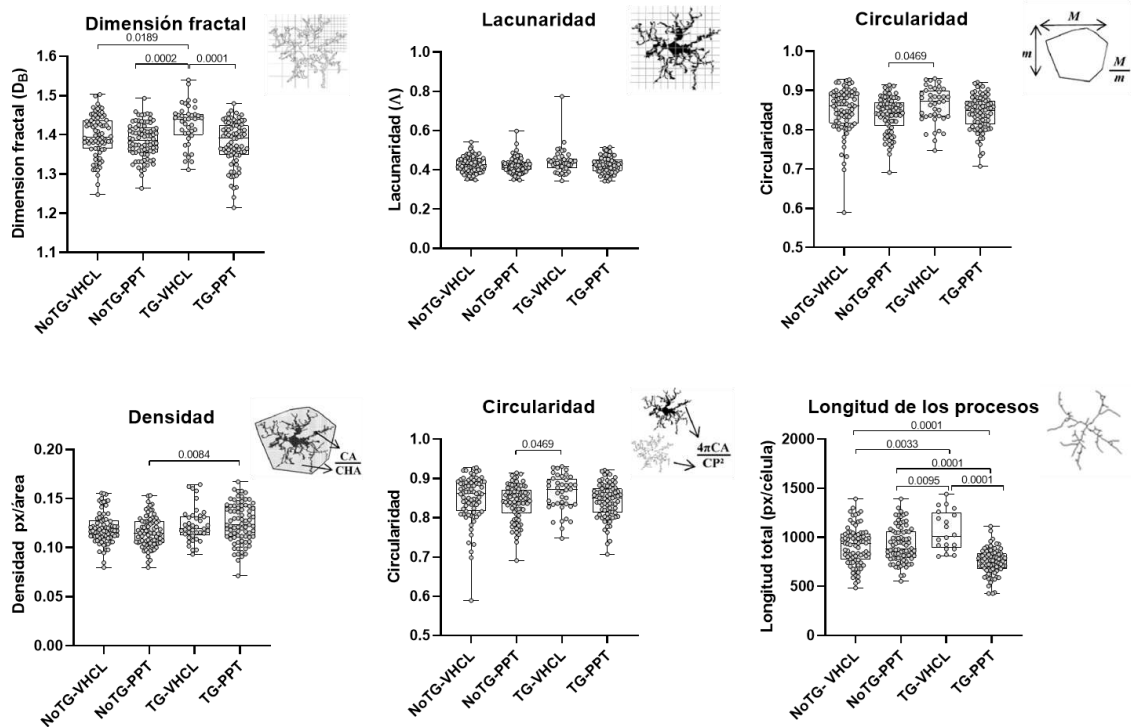


Figura 21. Los tipos morfológicos de la microglía de la región de CA1 del hipocampo fueron analizados estadísticamente utilizando una prueba de Kruskal-Wallis, en los gráficos se observa la mediana y los rangos intercuartílicos.

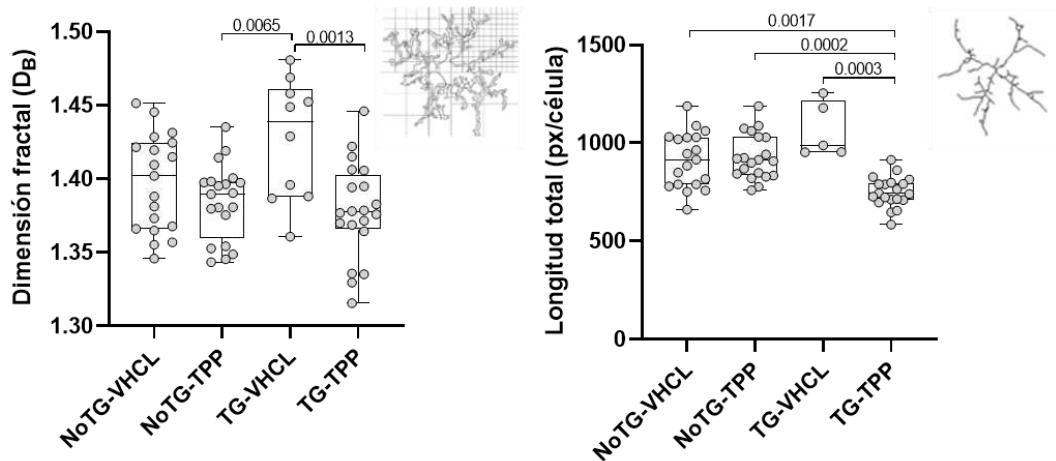


Figura 22. Los tipos morfológicos de la microglía de la región de CA1 del hipocampo fueron analizados estadísticamente utilizando una prueba de Kruskal-Wallis, en los gráficos se observa la mediana y los rangos intercuartílicos.

Remodelación microglial específica por región en ratones 3xTg-TPP

El análisis morfológico microglial final se llevó a cabo mediante el uso de la herramienta MorphoGlia, creada por nuestro grupo de trabajo para caracterizar objetivamente morfologías microgliales (Maya-Arteaga et al., 2024).

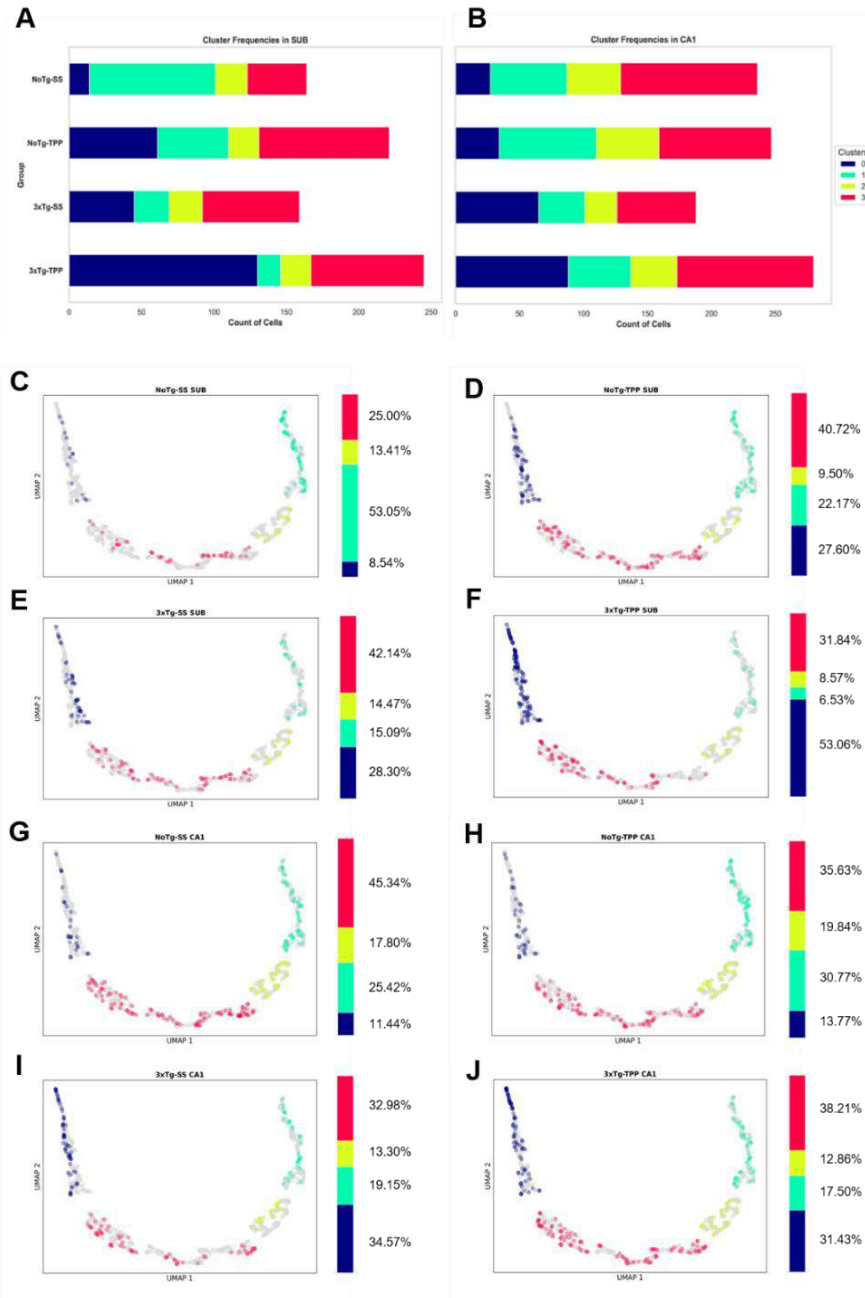


Figura 23. El TPP modula la morfología y la complejidad de la microglía en el hipocampo. Distribución del grupo de estudio entre conglomerados y recuento celular del clúster muestra el número absoluto de células en cada clúster para cada uno de los grupos de estudio SUB (A) y CA1 (B). Observe que los grupos tratados con TPP tienen un recuento celular más alto en comparación con los grupos SS en ambas condiciones genéticas. Diagramas de dispersión de los grupos del panel

(C) NoTg-SS, (D) NoTg-TPP, (E) 3xTg-SS, (F) 3xTg- TPP en SUB y (G) NoTg-SS, (H) NoTg-TPP, (I) 3xTg-SS y (J) 3xTg-TPP en CA1 entre la variedad y los conglomerados obtenidos. La barra de color indica los porcentajes de células en cada conglomerado para cada uno de los grupos de estudio en las dos áreas del hipocampo.

A nivel global se identificó la cantidad de células en SUB y la cantidad de células en CA1, la región SUB presentó menor cantidad de células microgliales en comparación con CA1, especialmente en el grupo NoTg-SS. En contraste, los grupos 3xTg-SS y 3xTg-TPP mostraron un aumento en la población celular dentro de SUB, probablemente reflejando procesos inflamatorios o reclutamiento celular inducidos por la patología y/o el tratamiento. Por otro lado, en CA1, el grupo 3xTg-SS evidenció una disminución en el número celular; dado que algunas imágenes contenían un número bajo de células totales (**Figura 21 A, B**).

Posteriormente, se cuantificó el número total de células identificadas en cada grupo por área (**Figura 23 C-J**) y se calculó el promedio de células por imagen: NoTg-SS presentó 164 células totales en SUB y 236 en CA1 (medias: 9,11 y 12,42 por imagen), NoTg-TPP registró 221 células en SUB y 247 en CA1 (medias: 11,05 y 12,35 por imagen), 3xTg-SS contabilizó 159 células en SUB y 188 en CA1 (medias: 10,6 y 13,42 por imagen) y 3xTg-TPP alcanzó 245 células totales en SUB y 280 en CA1 (medias: 12,89 y 14 por imagen).

El TPP modula la morfología y la complejidad de la microglía en el hipocampo

Realizamos un análisis morfológico microglial mediante el uso de la herramienta MorphoGlia, para caracterizar objetivamente morfologías microgliales (Maya-Arteaga et al., 2024). Tras seleccionar las características más relevantes, aplicamos la técnica no lineal de reducción UMAP (**Figura 24 A**), que transformó las 16 variables en dos dimensiones ($n_components = 2$). Para una clasificación imparcial, empleamos HDBSCAN con un tamaño mínimo de clúster de 20 y de muestra de 10, obteniendo 4 clústeres (**Figura 24 B**), para un total de 1740 células microgliales clasificadas. Con el objetivo de identificar patrones morfológicos microgliales, generamos mapas de calor que relacionaron las variables con los grupos de estudio y los clústeres (**Figura 24 C**), así como matrices de confusión para evaluar si la agrupación mejoraba el rendimiento del algoritmo al evitar la mezcla de estados

morfológicos entre grupos. Identificamos morfologías diferenciadas que pueden reflejar estados funcionales diversos en las regiones SUB y CA1 del hipocampo bajo las condiciones de No-Tg y 3xTg, además de la influencia del tratamiento con TPP o solo la solución salina. El clúster 0 fue caracterizado por una morfología microglial menos compleja, en contraste con el clúster 1, que representó la morfología más compleja. Mientras que los clústeres 2 y 3 fueron los menos y más complejos en segundo orden respectivamente.

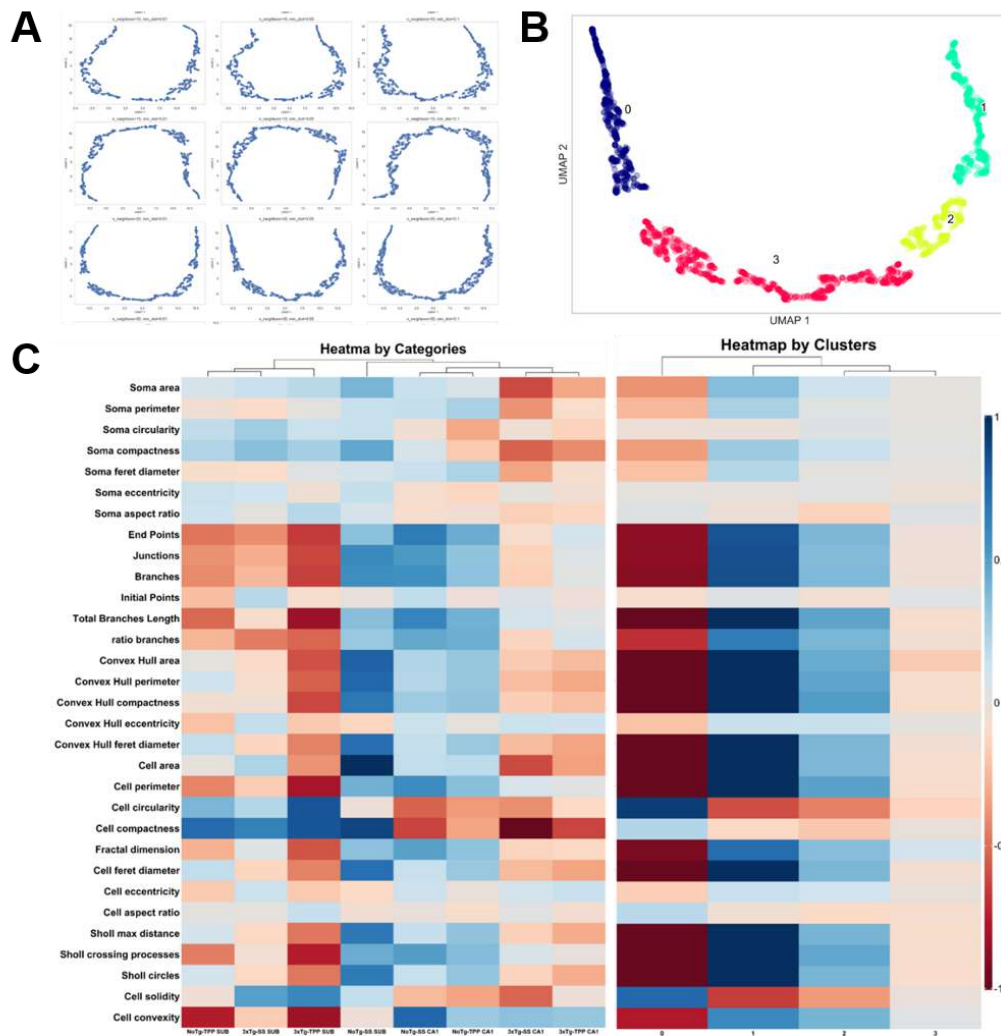


Figura 24. Reducción de dimensionalidad mediante Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) y agrupamiento con HDBSCAN. (A) Reducción de la dimensionalidad mediante aproximación y proyección de colectores uniformes y agrupamiento en clústeres de HDBSCAN. (B) A la izquierda, reducción de la dimensionalidad mediante UMAP en un espacio bidimensional utilizando las 16 características seleccionadas por RFE (Recursive Feature Elimination). A la derecha, el agrupamiento de HDBSCAN identifica cinco clústeres distintos codificados por color. (C) Mapas de calor que comparan los grupos de estudio y los clústeres resultantes utilizando las 32 características extraídas del análisis morfológico.

*Los clústeres morfológicos microgliales revelan efectos región-
dependientes del tratamiento con TPP*

Para determinar qué conglomerados estaban más asociados con cada grupo de estudio, calculamos los residuos estandarizados. Los conglomerados mostraron que en la región del SUB el clúster 0 (menos complejo) predominó en 3xTg-TPP y fue menos frecuente en NoTg-SS. El clúster 1 (más complejo) se encontró con mayor frecuencia en NoTg-SS y escaso en 3xTg-TPP y 3xTg-SS. En cuanto al clúster 2 (segundo menos complejo) se identificó principalmente en grupos sin tratamiento y menos en grupos con TPP, reforzando su posible asociación con la administración del fármaco. Mientras que el clúster 3 (segundo más complejo) predominó en 3xTg-SS y fue menos común en NoTg-SS (**Figura 25 A**). Con respecto a la región de CA1 observamos que los conglomerados del clúster 0 fue más frecuente en 3xTg-TPP y 3xTg-SS, menos frecuente en ambos grupos NoTg de ambas condiciones, el clúster 1 predominó en NoTg-TPP y fue menos común en 3xTg-TPP y 3xTg-SS. El clúster 2, con complejidad moderada baja, se asoció principalmente con NoTg-TPP y NoTg-SS. Finalmente el clúster 3, con morfología más compleja, abundó más en NoTg-SS y fue menos frecuente en 3xTg-TPP y el NoTg-TPP (**Figura 25 B**).

Dadas las variaciones en el número de células entre grupos, evaluamos la relación entre los conglomerados y los grupos de estudio mediante una prueba de chi-cuadrado ($\chi^2 = 270.78$, $p < 2.68e-45$), obteniendo una asociación significativa. El análisis de residuos estandarizados reveló que, en SUB, destacan asociaciones positivas notables para el clúster 1 con NoTg-SS (8.34) y para el clúster 0 con 3xTg-TPP (5.94), mientras que se observan asociaciones negativas marcadas para el clúster 0 con NoTg-SS (-5.27) y el clúster 1 con 3xTg-TPP (-5.23). En CA1, se aprecian asociaciones positivas relevantes para el clúster 0 en 3xTg-SS (3.49) y 3xTg-TPP (3.15), así como asociaciones negativas para el mismo clúster en NoTg-SS (-3.58) y NoTg-TPP (-2.89). Este patrón sugiere que la distribución de clústeres microgliales varía según el genotipo, el tratamiento y la región hipocampal,

indicando una reorganización morfológica diferencial modulada por el tratamiento.

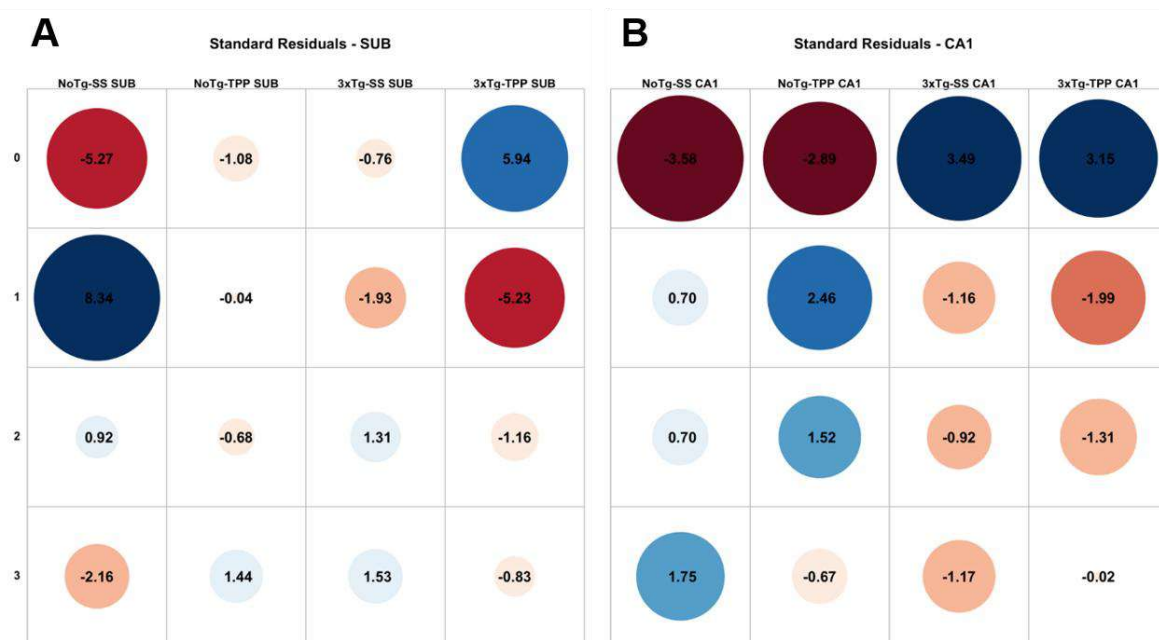


Figura 25. El análisis estadístico mediante chi-cuadrado y residuos estandarizados reveló patrones específicos de asociación. La figura muestra los residuos estandarizados del análisis de chi-cuadrado que evalúa la asociación entre clústeres microgliales y grupos experimentales en las regiones hipocampales SUB (A) y CA1 (B). Los tonos azules indican asociaciones positivas y los rojos negativas, con mayor intensidad y tamaño del círculo reflejando asociaciones más fuertes. El clúster 0, el menos complejo, predominó en las regiones del SUB y CA1, representando principalmente a la microglía de los ratones 3xTg, tanto tratados como no tratados. El clúster 2, el segundo menos complejo, fue más representativo en el SUB de los 3xTg-SS y en CA1 de los NoTg de ambas condiciones. Por otro lado, el clúster 1, el más complejo, predominó en el SUB de los NoTg-SS y en CA1 de los NoTg en ambas condiciones. Finalmente, el clúster 3, de complejidad intermedia, fue más abundante en los NoTg-SS en la región CA1. Prueba de chi-cuadrado ($\chi^2 = 270.78$, $p < 2.68e-45$).

Estos resultados son interesantes porque el cambio morfológico de la microglía está íntimamente relacionado con su función y muchos autores recurren a su estudio para obtener información del estado en que se encuentra el sistema inmune del SNC durante la salud, la enfermedad y los eventos agudos de daño (Streit et al., 2004; Morrison et al., 2017 y Fernández-Arjona et al. 2017; Maya-Arteaga et al., 2024). La neuroinflamación en la EA se puede definir como un cambio en la morfología y el número de células microgliales debido a factores como el estrés oxidativo, causado por ERNs y EROs, citocinas pro-inflamatorias y prostaglandinas que promueven la neurodegeneración (Akiyama et al., 2000; Mangialasche et al., 2010). La microglía regula la respuesta inmune y su homeostasis en el SNC (Streit, 2002). Cuando ésta se pierde por una lesión o enfermedad, la microglía adquiere

un estado “activo” y una morfología “ameboide” acompañada de cambios en la expresión génica y, por tanto, cambios funcionales (Hanisch & Kettenmann, 2007; Keren-Shaul et al., 2017). La diversidad de fenotipos de la microglía aún sigue siendo controversial. Sin embargo, aunque actualmente existen dos postulados aceptados: el estado de activación alternativo (M2) y el clásico (M1), los fenotipos microgliales no son absolutos, sino un continuo de morfologías intermedias y funciones variadas. Los cambios sutiles en la longitud de sus proyecciones, la circularidad del soma y la complejidad celular, dan lugar a subtipos ampliamente distintos, entre los que podemos encontrar morfologías compactas y redondeadas o ramificadas longitudinal y radialmente que pueden ser funcionales o no (Revisar Lawson et al 1990; Fernández-Arjona et al., 2019). Las células microgliales contribuyen a la eliminación y degradación de β A (Casali et al., 2020), debido a que β A funciona como un péptido antimicrobiano que protege al cerebro de patógenos que logran pasar la barrera hematoencefálica, al aglutinarse alrededor de estos para contenerlos (Kumar et al., 2016). La microglía responde también a moléculas endógenas relacionadas con células necróticas y moléculas derivadas de mecanismos protectores patogénicos por medio de NRLs y TLRs u otros como TREM2 (Fu et al., 2014).

Recientemente, Cheng et al. (2004) demostraron que la expresión de la enzima TPK en microglía juega un papel crucial en la modulación de la acumulación y propagación de placas de β A en la EA. En modelos de ratón transgénicos APP/PS1, la TPK en microglía se eleva en etapas tempranas, pero se reduce selectivamente en microglía asociada con placas en estadios avanzados, debido principalmente al ambiente inflamatorio inducido por las placas. La delección específica de Tpk en microglía provoca disminución en la capacidad fagocítica y cobertura de placas, lo que acelera la deposición de β A y la pérdida sináptica, aunque sin inducir la neurodegeneración ni formación de ovillos neurofibrilares (Cheng et al., 2024). Estos cambios metabólicos en microglía incluyen acumulación de gotas lipídicas y disfunción mitocondrial, que alteran su respuesta protectora frente a la patología amiloide y contribuyen al avance de la enfermedad.

Una de las piezas que ha demostrado tener una relación directa con el cambio en

la expresión génica para la activación de DAM es TREM2, que funciona como receptor específico de células de linaje mieloide como la microglía (Song & Colonna, 2018). TREM2 detecta patrones lipídicos asociados a neurodegeneración como fosfolípidos, células apoptóticas y lipoproteínas, además de mantener la respuesta microglial a la amiloidosis en la EA (Wang et al., 2015; Ulland et al., 2017; Deczkowska et al., 2018).

Además, estudios previos de nuestro grupo donde se llevó a cabo la administración crónica de TPP en el 3xTg-AD han demostrado una reducción significativa en la carga amiloide del hipocampo y una tendencia a mejorar los déficits cognitivos (Pastén-Castrejón, 2019). Estos hallazgos respaldan los hallazgos del presente estudio, ya que la expresión de la TPK en microglía es crucial para la modulación de la progresión de las placas de β A. La capacidad del TPP para potenciar el metabolismo de la tiamina podría ayudar a corregir la disfunción microglial inducida por la reducción de TPK en el entorno inflamatorio de las placas, restaurando la capacidad fagocítica y limitando la expansión de la patología amiloide. Por tanto, la intervención dirigida a mantener o restablecer la actividad de TPK en microglía representa una prometedora estrategia terapéutica para retrasar la progresión de la enfermedad de Alzheimer mediante la mejora de la función microglial.

El tratamiento con TPP modula la expresión génica proinflamatoria y metabólica en el hipocampo

Para llevar a cabo la evaluación del fenotipo de las células hipocampales que incluyeron a la microglía se hizo la cuantificación relativa de ARNm del tejido hipocampal mediante RT-qPCR. Lo primero que se hizo fue el diseño y estandarización de cebadores para los genes de interés.

Los resultados de este análisis de los perfiles complementan los análisis morfológicos y los hallazgos podrían estar relacionados con la recuperación de la función de la microglía.

Para corroborar que los genes elegidos para el análisis por RT-qPCR están relacionados entre sí y con un perfil celular específico se realizó un estudio de genes por clúster, basado en la literatura científica y los registros de secuenciación génica de bases de datos públicas con ayuda del recurso bioinformático STRING 12.0.

En este sentido los genes similares en función de patrones de expresión génica se agrupan, lo que nos permite ver con mayor claridad información sobre las vías biológicas y procesos celulares que están regulados de manera coordinada, esto puede ayudarnos a comprender algunas funciones de la microglía en distintos contextos.

Este tipo de análisis de genes por clúster pueden utilizarse para complementar nuestros resultados experimentales ya que fortalecen la evidencia de que los datos experimentales son consistentes sobre lo que conocemos en cuestión de biología celular de un caso específico, por lo que la importancia de este tipo de análisis radica en la validación de los resultados y la identificación de marcadores, patrones, vías de señalización y/o fenotipos asociados a la expresión génica de la microglía.

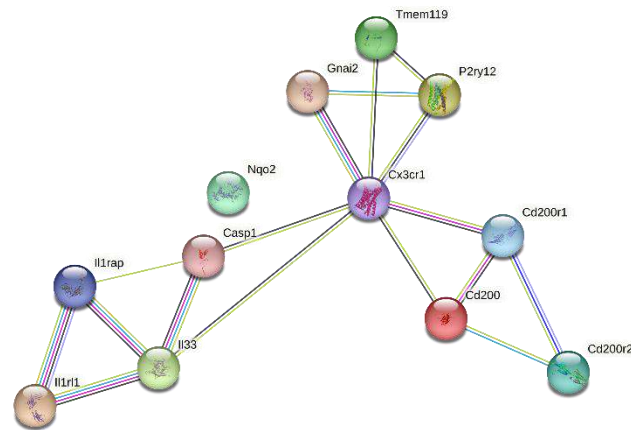


Figura 26. Análisis por clúster de genes microgliales en el hipocampo. Datos de expresión génica de microglía aislada del hipocampo de ratones mediante secuenciación de ARN obtenidos de la base de datos bioinformática STRING versión 12.0. Se identifica una red de genes asociados a subtipos microgliales con perfiles de expresión génica distintivos asociados a funciones biológicas homeostáticas y de vigilancia.

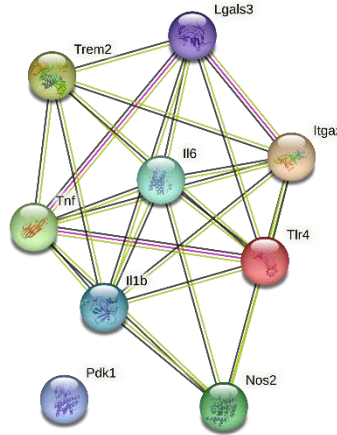


Figura 27. Análisis por clúster de genes microgliales en el hipocampo. Datos de expresión génica de microglía aislada del hipocampo de ratones mediante secuenciación de ARN obtenidos de la base de datos bioinformática STRING versión 12.0. Se identifica una red de genes asociados a subtipos microgliales con perfiles de expresión génica distintivos asociados a funciones biológicas de respuesta inmune y metabolismo.

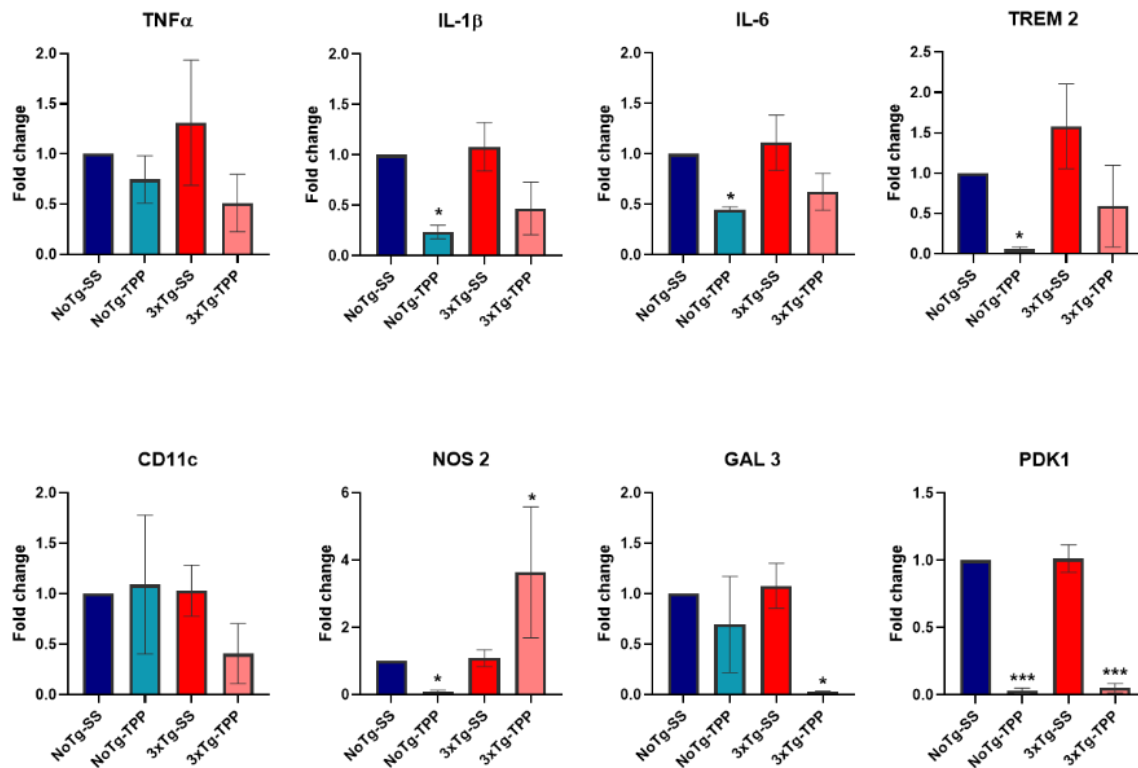


Figura 28. El tratamiento con TPP modula la expresión génica proinflamatoria y metabólica en el hipocampo. Análisis de perfiles celulares del hipocampo evaluados por RT-qPCR ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), la cuantificación se realizó utilizando la RLP27 y RLP13A como genes constitutivos de referencia para la normalización. Se realizó una ANOVA de Welch debido a varianzas desiguales entre grupos ($W=10.98$ (2.000, 11.28)), seguida de una prueba *Post-hoc* de Dunett T3. Los datos se presentan como la media $\pm$ SEM ($n = 4$ por grupo). Se observaron diferencias significativas entre el grupo control y los grupos tratados (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

El análisis de expresión génica mediante ANOVA de Welch ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) representada como media $\pm$ SEM (n = 4 por grupo), identificó modulaciones significativas en redes proinflamatorias y metabólicas microgliales (**Figura 26**). Los genes proinflamatorios (TNF α , IL-1 β , IL-6, CD11c) mostraron una sobreexpresión mayor en 3xTg-SS, que, aunque no alcanza la significancia se ve atenuada tras el tratamiento con TPP. NOS 2 y PDK1 exhibieron variaciones consistentes con una reprogramación metabólica, mientras que TREM2, GAL 3 y CD11c reflejaron cambios en perfiles asociados a activación y capacidad fagocítica microglial después del tratamiento con TPP. En conjunto, los hallazgos sugieren que el TPP ejerce una modulación inmunometabólica específica de genotipo, reequilibrando el fenotipo microglial hacia un estado más funcional y menos proinflamatorio.

Los resultados que encontramos al realizar la RT-qPCR para identificar los perfiles celulares del hipocampo son interesantes porque se observa una ligera disminución en la expresión relativa en el caso de las interleucinas proinflamatorias como TNF α , IL-1 β e IL-6 que median la respuesta inflamatoria, reclutando células inmunes y señalizando para la producción de otras proteínas, y aunque esta diferencia no alcanza la significancia estadística, podría en conjunto con la disminución significativa de la expresión relativa de GAL3 sugerir que la inflamación hipocampal es menor después del tratamiento crónico con TPP en nuestro modelo. GAL3 es una lectina que interactúa con diferentes receptores microgliales como TLR4 y TREM2, que son componentes clave en la respuesta a DAMP's, y que se expresa en células microgliales después de la aparición del daño de las células neuronales. Además, aumenta en niveles séricos y del fluido cerebroespinal en pacientes con patologías neurodegenerativas como la EA (García-Revilla et al., 2022).

La regulación a un fenotipo más funcional de la microglía en el hipocampo no solo depende de que haya una disminución de la inflamación o de marcadores de estrés y descomposición celular como galectina, también depende de la señalización de quimiotaxis y la expresión de moléculas de adhesión, esto lo vemos en nuestros resultados gracias a la disminución significativa de CD11c. Este marcador aumenta conforme mayor sea el daño cerebral, ya que permite la interacción con otras células del sistema inmunológico y la continuación de la respuesta inflamatoria.

En el estudio de perfiles transcripcionales microgliales para CD11c en modelos para la EA se ha observado que los niveles de transcripción de CD11c aumentan drásticamente cuando las placas comienzan a aparecer, lo que puede potencialmente contrarrestar la deposición de amiloide mediante una mayor absorción y degradación por parte de la microglía, sin embargo, durante el ambiente neurodegenerativo las funciones fagocíticas están alteradas, por lo que una mayor expresión relativa de CD11c implica una mayor contribución al contexto inflamatorio que promueve la progresión de la EA (Kamphuis et al., 2016).

En nuestro caso el tratamiento con TPP posiblemente recupero las funciones fagocíticas de la microglía ya que encontramos una disminución significativa de la amiloidosis sin un aumento de la cantidad de células microgliales en nuestro análisis inmunohistoquímico. En esta misma dirección, encontramos un aumento sutil en la expresión de NOS2 que en la microglía puede regular positivamente la fagocitosis por medio de la señalización dependiente de PI3K (Maksoud et al., 2019). Por otro lado, se sabe también que la NOS2 en la microglía activada participa en los mecanismos de defensa del huésped y se ha observado una correlación inversa entre la producción de NO y la fagocitosis en el cultivo celular de microglía BV-2 al añadir péptido β A, en donde la producción de NO disminuyó mientras que la fagocitosis aumentó (Kopec et al., 2000).

En el caso de TREM2 que solo se expresa en células mieloides y para el caso específico del hipocampo de en la microglía y participa en su proliferación, supervivencia, flexibilidad metabólica, migración y fagocitosis, no encontramos diferencias significativas pero si un cambio sutil que está relacionado con la regulación de la respuesta inflamatoria ya que sus ligandos tienen efectos protectores en el cerebro durante la EA, además, actúa promoviendo la eliminación de sustancias tóxicas neuronales y proteínas anormales, además de ser un inmunomodulador (Li et al., 2023).

En el caso de PDK1, uno de los principales reguladores de la expresión de la PDH, esta se encarga de fosforilar e inactivar a la PDH, lo que reduce la conversión de piruvato a acetil-CoA que es el sustrato del ciclo de Krebs. Nosotros encontramos una disminución significativa en la PDK1 después del tratamiento con TPP lo que

podría sugerir la reprogramación metabólica de la microglía, la cual le permitiría recuperar su flexibilidad metabólica, es decir, pasar de la glucólisis al ciclo de Krebs y posteriormente a la OXPHOS para la obtención de ATP, ya que esto es crucial para mantener la homeostasis energética y funcional. Asimismo, durante la enfermedad de Alzheimer se observa un decremento de la actividad de la PDH y el metabolismo de la glucosa, en estos casos tanto astrocitos como neuronas muestran también características hipometabólicas y una mayor producción de lactato (Zhang et al., 2014). Esta reconfiguración del metabolismo energético puede impactar no solo a la función microglial, si no también el entorno sináptico del hipocampo positivamente, por lo que también buscamos explorar las posibles implicaciones de estos hallazgos sobre la densidad y morfología de las espinas dendríticas en SUB y CA1.

Efecto del TPP sobre las espinas dendríticas del hipocampo

Considerando el papel clave de la microglía en el mantenimiento del entorno sináptico y la homeostasis neuronal, exploramos también las implicaciones funcionales del tratamiento con TPP sobre la morfología sináptica, enfocándonos en las espinas dendríticas del hipocampo. Las espinas dendríticas son estructuras especializadas donde ocurren la mayoría de las sinapsis excitatorias en el cerebro, y su número, forma y estabilidad reflejan procesos fundamentales como la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria. En la enfermedad de Alzheimer, la pérdida progresiva de estas estructuras ha sido asociada con el deterioro cognitivo y se ha relacionado con la disfunción de células gliales, el estrés oxidativo y la acumulación de β -amiloide (Bittner et al., 2010; Spires-Jones & Hyman, 2014). Dado que nuestros hallazgos sugieren una restauración de la funcionalidad fagocítica y del metabolismo microglial tras el tratamiento con TPP, resultaba crucial evaluar si este entorno neuroinmunológico más regulado y bioenergéticamente eficiente se traducía en una mejor preservación de la conectividad sináptica. Por tanto, el análisis de las espinas dendríticas se planteó como una medida indirecta pero relevante del estado funcional del circuito hipocampal, proporcionando un vínculo integrador entre la modulación glial, la disminución de la amiloidosis y los posibles beneficios neuroprotectoras del TPP.

Para caracterizar y cuantificar la densidad de las espinas dendríticas de las células piramidales del hipocampo de los ratones tratados con TPP se estandarizó la técnica histológica de Golgi Cox, para marcar por completo el citoesqueleto de las células neuronales. En este caso los resultados esperados son principalmente que el aumento o disminución de espinas dendríticas esté relacionado con lo que se encuentre en las tareas conductuales de nuestro modelo. Esperamos que después del tratamiento la estructura sináptica se restablezca y/o permanezca conservando la fuerza sináptica de las redes hipocampales.

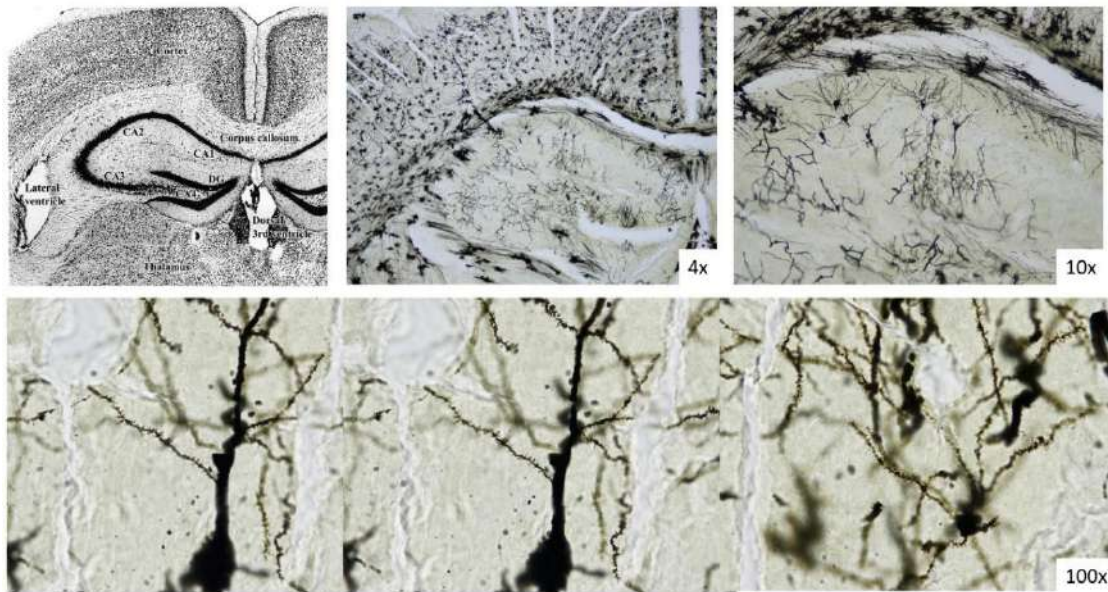


Figura 29. Imágenes representativas de las neuronas teñidas con la técnica de Golgi Cox en diferentes aumentos.



Figura 30. Imágenes representativas de las neuronas teñidas con la técnica de Golgi Cox en aumento de 100x.

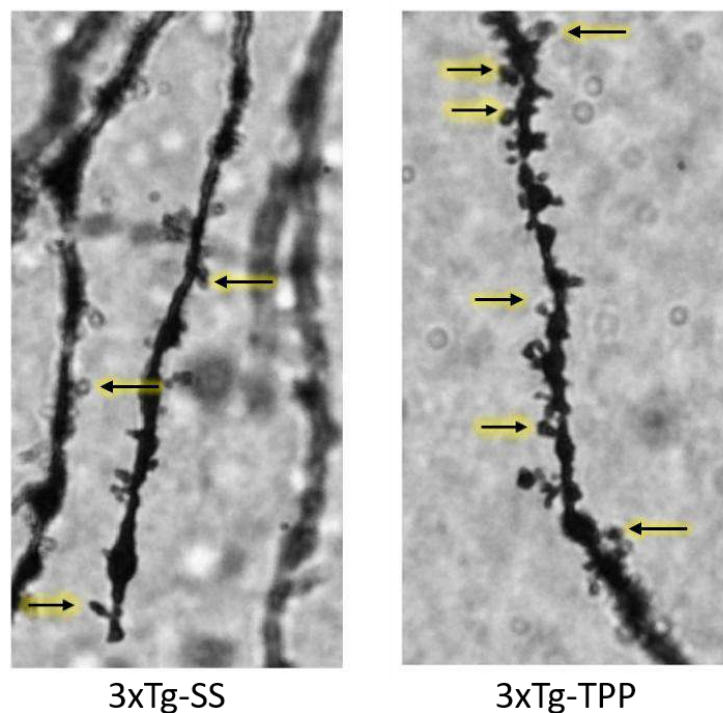


Figura 31. Imágenes representativas de la Tinción de Golgi. Se muestran imágenes representativas de cortes de cerebro del modelo de ratón 3xTg-SS a la izquierda con tratamiento 3xTg-TPP de neuronas del hipocampo (CA1) de las neuronas teñidas con la técnica de Golgi Cox en un aumento de 100x. Las flechas marcan diferentes tipos de espinas: hongo, rechonchas y filopodio. Se observa una cantidad aparentemente mayor de espinas en la dendrita del 3xTg-TPP.

Lo que observamos fue que de forma cualitativa parece haber menos espinas y de menor tamaño en los ratones 3xTg-SS a comparación de los 3xTg-TPP que muestran mayor variedad y tamaño de espinas dendríticas. Las espinas de tipo hongo y rechonchas tienen una forma de hongo o cabeza de hongo con una mayor superficie de contacto y que requieren de mayor síntesis proteica, son espinas que están mayormente asociadas a la conectividad neuronal perdurable lo que quiere decir esto es que se relacionan mayormente con la memoria a largo plazo o consolidada. Por otro lado, las espinas de tipo filopodio son espinas largas y delgadas con una vida útil corta que son más plásticas y no establecen contactos funcionales o de larga duración.

Esto puede darnos información acerca de la memoria debido a que las espinas son el sustrato biológico de la memoria y durante la enfermedad de Alzheimer se ha observado un decremento y disfunción de estas estructuras no solo en modelos animales que tratan de imitar esta patología si no también en cerebros humanos.

Aunque el análisis detallado de la densidad y morfología de las espinas dendríticas en neuronas piramidales fue iniciado, su desarrollo quedó fuera del alcance temporal de esta tesis. No obstante, se reconoce este aspecto como una línea experimental complementaria de alta relevancia, cuya continuidad permitirá integrar los efectos del TPP a nivel sináptico con las observaciones ya obtenidas en microglía. Las observaciones preliminares sugieren cambios estructurales potenciales en las espinas, los cuales serán profundizados en trabajos posteriores. Esta aproximación representa una extensión lógica del presente estudio hacia una comprensión más amplia de los mecanismos neuroprotectores del TPP.

Al final, la importancia de estos estudios radica en comprender que la microglía recibe señales del entorno neurodegenerativo a nivel integral y que estos cambios metabólicos y la pérdida de la homeostasis, pueden ser más bien un estado disfuncional inducido por la EA en contexto de la acumulación amiloide. Por lo tanto, en la medida que logremos modular la alteración metabólica microglial podríamos estar protegiendo al SNC del daño que ocasiona la neurodegeneración en las demencias (Baik et al., 2019; Lepiarz-Raba et al., 2023; Ulland et al., 2017). Es importante resaltar que lo fundamental del tratamiento con TPP es que puede usarse en conjunto con otros tratamientos o como coadyuvante, por lo que podría tener un papel importante en la prevención del deterioro cognitivo, incluso como una intervención nutricional.

IX. CONCLUSIONES

1. El TPP tiene un efecto neuroprotector y rescata la conducta de anidación y de adquisición del LAM en el grupo 3xTg-TPP.
2. El TPP modula la morfología microglial, reduciendo la complejidad y ramificación de las células en SUB de los 3xTg-TPP.
3. El TPP mejora la función microglial, aumentando su capacidad fagocítica y flexibilidad metabólica, lo que beneficia el entorno funcional y sináptico del hipocampo.
4. Las observaciones preliminares con la técnica de Golgi-Cox sugieren que el tratamiento con TPP podría preservar o restaurar la estructura sináptica en neuronas piramidales del hipocampo, al aumentar la variedad y tamaño de espinas dendríticas.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Agudelo-Botero, M., Giraldo-Rodríguez, L., & Rojas-Russell, M. E. (2023). Systematic and comparative analysis of the burden of Alzheimer's disease and other dementias in Mexico. Results at the national and subnational levels, 1990--2019. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, 10(1), 120–129.
- Akiyama, H., Arai, T., Kondo, H., Tanno, E., Haga, C., & Ikeda, K. (2000). Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, 14(1), S47--S53.
- Andrade-Guerrero, J., Santiago-Balmaseda, A., Jeronimo-Aguilar, P., Vargas-Rodríguez, I., Cadena-Suárez, A. R., Sánchez-Garibay, C., Pozo-Molina, G., Méndez-Catalá, C. F., Cardenas-Aguayo, M.-C., Diaz-Cintra, S., & others. (2023). Alzheimer's Disease: An Updated Overview of Its Genetics. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3754.
- Baik, S. H., Kang, S., Lee, W., Choi, H., Chung, S., Kim, J. Il, & Mook-Jung, I. (2019a). A Breakdown in Metabolic Reprogramming Causes Microglia Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Cell Metabolism*, 30(3), 493-507.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.06.005>
- Baik, S. H., Kang, S., Lee, W., Choi, H., Chung, S., Kim, J.-I., & Mook-Jung, I. (2019b). A breakdown in metabolic reprogramming causes microglia dysfunction in Alzheimer's disease. *Cell Metabolism*, 30(3), 493–507.
- Balderrama-Gutierrez, G., Liang, H., Rezaie, N., Carvalho, K., Forner, S., Matheos, D., Rebboah, E., Green, K. N., Tenner, A. J., LaFerla, F., & others. (2021). Single-cell and nucleus RNA-seq in a mouse model of AD reveal activation of distinct glial subpopulations in the presence of plaques and tangles. *BioRxiv*, 2009–2021.
- Belfiore, R., Rodin, A., Ferreira, E., Velazquez, R., Branca, C., Caccamo, A., & Oddo, S. (2019). Temporal and regional progression of Alzheimer's disease-like pathology in 3xTg-AD mice. *Aging Cell*, 18(1), e12873.
- Bennett, F. C., & Liddel, S. A. (2019). Microglia Metabolic Breakdown Drives Alzheimer's Pathology. *Cell Metabolism*, 30(3), 405–406. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.08.017>
- Bilkei-Gorzo, A. (2014). Genetic mouse models of brain ageing and Alzheimer's disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 142(2), 244–257.
- Bittner, T., Fuhrmann, M., Burgold, S., Ochs, S. M., Hoffmann, N., Mitteregger, G., Kretschmar, H., LaFerla, F. M., & Herms, J. (2010). Multiple events lead to dendritic spine loss in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *PloS One*, 5(11), e15477.
- Blurton-Jones, M., & LaFerla, F. M. (2006). Pathways by which A β facilitates tau pathology. *Current Alzheimer Research*, 3(5), 437–448. <https://doi.org/10.2174/156720506779025242>
- Brum, W. S., Ashton, N. J., Simrén, J., di Molfetta, G., Karikari, T. K., Benedet, A. L., Zimmer, E. R., Lantero-Rodriguez, J., Montoliu-Gaya, L., Jeromin, A., & others. (2024). Biological variation estimates of Alzheimer's disease plasma biomarkers in healthy individuals. *Alzheimer's & Dementia*, 20(2), 1284–1297.
- Calsolaro, V., & Edison, P. (2016). Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions. *Alzheimer's & Dementia*, 12(6), 719–732. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.02.010>
- Cao, H., Zhou, X., Chen, Y., Ip, F. C. F., Chen, Y., Lai, N. C. H., Lo, R. M. N., Tong, E. P. S., Mok, V. C. T., Kwok, T. C. Y., & others. (2022). Association of SPI1 haplotypes with altered SPI1 gene expression and Alzheimer's disease risk. *Journal of Alzheimer's Disease*, 86(4), 1861–1873.
- Casali, B. T., MacPherson, K. P., Reed-Geaghan, E. G., & Landreth, G. E. (2020). Microglia depletion rapidly and reversibly alters amyloid pathology by modification of

- plaque compaction and morphologies. *Neurobiology of Disease*, 142, 104956.
- Cheng, X., Zhao, R., Qiu, H., Song, P., Kou, L., Sang, S., Xia, Y., Cai, W., Jin, B., Huang, Q., & others. (2024). The mechanism and consequences of amyloid- β modulating thiamine pyrophosphokinase-1 expression in microglia. *BioRxiv*, 2009–2024.
- Cinici, E., Ahiskali, I., Cetin, N., Suleyman, B., Kukula, O., Altuner, D., Coban, A., Balta, H., Kuzucu, M., & Suleyman, H. (2016). Effect of thiamine pyrophosphate on retinopathy induced by hyperglycemia in rats: A biochemical and pathological evaluation. *Indian Journal of Ophthalmology*, 64(6), 434.
- Cole, L., Kramer, P. R., Henry, W., Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). Mechanisms of disease Alzheimer's disease. *New Engl J Med*, 362, 329–344.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803699-0.00045-1>
- CONAPO, C. N. de P. (2021). *Día Internacional de las Personas de Edad*. 30 Septiembre.
<https://www.gob.mx/conapo/articulos/dia-internacional-de-las-personas-de-edad-284170?idiom=es>
- Crapser, J. D., Spangenberg, E. E., Barahona, R. A., Arreola, M. A., Hohsfield, L. A., & Green, K. N. (2020). Microglia facilitate loss of perineuronal nets in the Alzheimer's disease brain. *EBioMedicine*, 58.
- Cullen, N. C., Janelidze, S., Mattsson-Carlgrén, N., Palmqvist, S., Bittner, T., Suridjan, I., Jethwa, A., Kollmorgen, G., Brum, W. S., Zetterberg, H., & others. (2023). Test-retest variability of plasma biomarkers in Alzheimer's disease and its effects on clinical prediction models. *Alzheimer's & Dementia*, 19(3), 797–806.
- Dahm, R. (2006). Alzheimer's discovery. *Current Biology*, 16(21), R906–R910.
- Deacon, R. (2012). Assessing burrowing, nest construction, and hoarding in mice. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 59, e2607.
- Deczkowska, A., Keren-Shaul, H., Weiner, A., Colonna, M., Schwartz, M., & Amit, I. (2018). Disease-associated microglia: a universal immune sensor of neurodegeneration. *Cell*, 173(5), 1073–1081.
- DeTure, M. A., & Dickson, D. W. (2019). The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 14(1), 1–18.
- Fernández-Arjona, M. del M., Grondona, J. M., Granados-Durán, P., Fernández-Llebrez, P., & López-Ávalos, M. D. (2017). Microglia morphological categorization in a rat model of neuroinflammation by hierarchical cluster and principal components analysis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 235.
- Fu, R., Shen, Q., Xu, P., Luo, J. J., & Tang, Y. (2014). Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases. *Molecular Neurobiology*, 49, 1422–1434.
- Geiller, T., Priestley, J. B., & Losonczy, A. (2023). A local circuit-basis for spatial navigation and memory processes in hippocampal area CA1. *Current Opinion in Neurobiology*, 79, 102701.
- Gibson, G. E., & Blass, J. P. (2007). Thiamine-dependent processes and treatment strategies in neurodegeneration. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(10), 1605–1620.
- Gibson, G. E., Feldman, H. H., Zhang, S., Flowers, S. A., & Luchsinger, J. A. (2022). Pharmacological thiamine levels as a therapeutic approach in Alzheimer's disease. *Frontiers in Medicine*, 9, 1033272.
- Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., & Gage, F. H. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140(6), 918–934.
- Green, T. R. F., & Rowe, R. K. (2024). Quantifying microglial morphology: an insight into function. *Clinical and Experimental Immunology*, 216(3), 221–229.
- Gutierrez-Robledo, L. M., & Arrieta-Cruz, I. (2015). Dementia in Mexico: The need for a national Alzheimer's plan. *Gac Med Mex*, 151, 667–673.
- Gutiérrez-Robledo, L. M., Jácome-Maldonado, L. D., González-Rivero, C. B., Lozano-Juárez, L. R., Tella-Vega, P., & García-Peña, C. (2022). Monetary cost estimation of

- care for functionally dependent older adults in Mexico. *The Journal of the Economics of Ageing*, 21, 100365.
- Hanisch, U.-K., & Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature Neuroscience*, 10(11), 1387–1394. <https://doi.org/10.1038/nn1997>
- Hernández-Montiel, H. L., Lopez, V., González-Loyola, J. G., Vega-Anaya, G. C., Villagrán-Herrera, M. E., Gallegos-Corona, M. A., Saldaña, C., Ramos Gómez, M., García-Horshman, P., García Solís, P., & others. (2014). *Chronic administration of thiamine pyrophosphate decreases age-related histological atrophic testicular changes and improves sexual behavior in male Wistar rats*.
- Hirata-Fukae, C., Li, H.-F., Hoe, H.-S., Gray, A. J., Minami, S. S., Hamada, K., Niikura, T., Hua, F., Tsukagoshi-Nagai, H., Horikoshi-Sakuraba, Y., & others. (2008). Females exhibit more extensive amyloid, but not tau, pathology in an Alzheimer transgenic model. *Brain Research*, 1216, 92–103.
- Ho, K. H., & Patrizi, A. (2021). Assessment of common housekeeping genes as reference for gene expression studies using RT-qPCR in mouse choroid plexus. *Scientific Reports*, 11(1), 3278.
- INGER. (2024). *Plan Nacional de Demencia México 2024*. https://www.alzint.org/u/Plan_Nacional_Demencias_Mexico_2024.pdf
- Jack Jr, C. R., Andrews, J. S., Beach, T. G., Buracchio, T., Dunn, B., Graf, A., Hansson, O., Ho, C., Jagust, W., McDade, E., & others. (2024). Revised criteria for diagnosis and staging of Alzheimer's disease: Alzheimer's Association Workgroup. *Alzheimer's & Dementia*, 20(8), 5143–5169.
- Jack Jr, C. R., Bennett, D. A., Blennow, K., Carrillo, M. C., Dunn, B., Haeberlein, S. B., Holtzman, D. M., Jagust, W., Jessen, F., Karlawish, J., & others. (2018). NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 14(4), 535–562.
- Jack Jr, C. R., Wiste, H. J., Weigand, S. D., Therneau, T. M., Lowe, V. J., Knopman, D. S., Gunter, J. L., Senjem, M. L., Jones, D. T., Kantarci, K., & others. (2017). Defining imaging biomarker cut points for brain aging and Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 13(3), 205–216.
- Javonillo, D. I., Tran, K. M., Phan, J., Hingco, E., Kramár, E. A., da Cunha, C., Forner, S., Kawauchi, S., Milinkeviciute, G., Gomez-Arboledas, A., & others. (2022). Systematic phenotyping and characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 785276.
- Keren-Shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-Natan, O., Dvir-Szternfeld, R., Ulland, T. K., David, E., Baruch, K., Lara-Astaiso, D., Toth, B., Itzkovitz, S., Colonna, M., Schwartz, M., & Amit, I. (2017). A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell*, 169(7), 1276–1290.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.018>
- Keren-Shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-Natan, O., Dvir-Szternfeld, R., Ulland, T. K., David, E., Baruch, K., Lara-Astaiso, D., Toth, B., & others. (2017). A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease. *Cell*, 169(7), 1276–1290.
- Krukowski, K., Feng, X., Paladini, M. S., Chou, A., Sacramento, K., Grue, K., Riparip, L. - K., Jones, T., Campbell-Beachler, M., Nelson, G., & others. (2018). Temporary microglia-depletion after cosmic radiation modifies phagocytic activity and prevents cognitive deficits. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13.
- Kumar, D. K. V., Choi, S. H., Washicosky, K. J., Eimer, W. A., Tucker, S., Ghofrani, J., Lefkowitz, A., McColl, G., Goldstein, L. E., Tanzi, R. E., & others. (2016). Amyloid- β peptide protects against microbial infection in mouse and worm models of Alzheimer's

- disease. *Science Translational Medicine*, 8(340), 340ra72–340ra72.
- Lepiarz-Raba, I., Gbadamosi, I., Florea, R., Paolicelli, R. C., & Jawaid, A. (2023). Metabolic regulation of microglial phagocytosis: Implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Translational Neurodegeneration*, 12(1), 48.
- Mangialasche, F., Solomon, A., Winblad, B., Mecocci, P., & Kivipelto, M. (2010). Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *The Lancet Neurology*, 9(7), 702–716.
- Manrique-Espinoza, B., Salinas-Rodríguez, A., Moreno-Tamayo, K. M., Acosta-Castillo, I., Sosa-Ortiz, A. L., Gutiérrez-Robledo, L. M., & Téllez-Rojo, M. M. (2013). Condiciones de salud y estado funcional de los adultos mayores en México. *Salud Pública de México*, 55, S323–S331.
- Manzetti, S., Zhang, J., & van der Spoel, D. (2014). Thiamin function, metabolism, uptake, and transport. *Biochemistry*, 53(5), 821–835.
- Marcé-Grau, A., Martí-Sánchez, L., Baide-Mairena, H., Ortigoza-Escobar, J. D., & Pérez-Dueñas, B. (2019). Genetic defects of thiamine transport and metabolism: A review of clinical phenotypes, genetics, and functional studies. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 42(4), 581–597.
- Mattap, S. M., Mohan, D., McGrattan, A. M., Allotey, P., Stephan, B. C. M., Reidpath, D. D., Siervo, M., Robinson, L., & Chaiyakunapruk, N. (2022). The economic burden of dementia in low-and middle-income countries (LMICs): a systematic review. *BMJ Global Health*, 7(4), e007409.
- Maya-Arteaga, J. P., Martínez-Orozco, H., & Diaz-Cintra, S. (2024). MorphoGlia, an interactive method to identify and map microglia morphologies, demonstrates differences in hippocampal subregions of an Alzheimer's disease mouse model. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 18, 1505048.
- McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack Jr, C. R., Kawas, C. H., Klunk, W. E., Koroshetz, W. J., Manly, J. J., Mayeux, R., & others. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 7(3), 263–269.
- Morrison, H., Young, K., Qureshi, M., Rowe, R. K., & Lifshitz, J. (2017). Quantitative microglia analyses reveal diverse morphologic responses in the rat cortex after diffuse brain injury. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12.
- Nguyen, P. T., Dorman, L. C., Pan, S., Vainchtein, I. D., Han, R. T., Nakao-Inoue, H., Taloma, S. E., Barron, J. J., Molofsky, A. B., Kheirbek, M. A., & others. (2020). Microglial remodeling of the extracellular matrix promotes synapse plasticity. *Cell*, 182(2), 388–403.
- NIH-Office of Dietary Supplements, N. I. of H. (2023). *Thiamin: Fact Sheet for Health Professionals*. Thiamin (Vitamin B1) – Health Professional Fact Sheet. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Thiamin-HealthProfessional/>
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P. P., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y., & LaFerla, F. M. (2003). Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39(3), 409–421. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00434-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3)
- OMS. (2025). *Dementia*. 31 March. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
- Paolicelli, R. C., Sierra, A., Stevens, B., Tremblay, M.-E., Aguzzi, A., Ajami, B., Amit, I., Audinat, E., Bechmann, I., Bennett, M., & others. (2022). Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron*, 110(21), 3458–3483.
- Parra-Rodríguez, L., González-Meljem, J. M., Gómez-Dantés, H., Gutiérrez-Robledo, L.

- M., López-Ortega, M., García-Peña, C., & Medina-Campos, R. H. (2020). The burden of disease in Mexican older adults: premature mortality challenging a limited-resource health system. *Journal of Aging and Health*, 32(7–8), 543–553.
- Pastén-Castrejón, N. J. (2019). *Uso del Pirofosfato de Tiamina como tratamiento neuroprotector en un modelo animal para la enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD)* [Universidad Autónoma de Querétaro]. <https://ri-ng.uaq.mx/handle/123456789/1784>
- Patterson, C., Feightner, J. W., Garcia, A., Hsiung, G.-Y. R., MacKnight, C., & Sadovnick, A. D. (2008). Diagnosis and treatment of dementia: 1. Risk assessment and primary prevention of Alzheimer disease. *Cmaj*, 178(5), 548–556.
- Poblano-Paez, I. (2024). *ESTUDIO DE LAS ESPINAS DENDRÍTICAS DEL HIPOCAMPO EN EL MODELO 3XTG-AD PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER* [Universidad Autónoma de Querétaro]. <https://ri-ng.uaq.mx/bitstream/123456789/11304/1/MEMAC-318076.pdf>
- Reddaway, J., Richardson, P. E., Bevan, R. J., Stoneman, J., & Palombo, M. (2023). Microglial morphometric analysis: so many options, so little consistency. *Frontiers in Neuroinformatics*, 17, 1211188.
- Rice, R. A., Spangenberg, E. E., Yamate-Morgan, H., Lee, R. J., Arora, R. P. S., Hernandez, M. X., Tenner, A. J., West, B. L., & Green, K. N. (2015). Elimination of microglia improves functional outcomes following extensive neuronal loss in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 35(27), 9977–9989.
- Robledo, L. M. G., Peña, M. del C. G., Rojas, P. A. R., & Ruiz, A. M. (2017). La Enfermedad de Alzheimer y otras demencias como problema nacional de salud. *CONACYT y ANMM*.
- Sang, S., Pan, X., Chen, Z., Zeng, F., Pan, S., Liu, H., Jin, L., Fei, G., Wang, C., Ren, S., & others. (2018). Thiamine diphosphate reduction strongly correlates with brain glucose hypometabolism in Alzheimer's disease, whereas amyloid deposition does not. *Alzheimer's Research & Therapy*, 10(1), 26.
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., Ransohoff, R. M., Greenberg, M. E., Barres, B. A., & Stevens, B. (2012). Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*, 74(4), 691–705.
- Secretaría de Salud. (2021). *Enfermedad de Alzheimer, demencia más común que afecta a personas adultas mayores*. 05 de Octubre. <https://www.gob.mx/salud/es/articulos/enfermedad-de-alzheimer-demencia-mas-comun-que-afecta-a-personas-adultas-mayores>
- Song, W. M., & Colonna, M. (2018). The identity and function of microglia in neurodegeneration. *Nature Immunology*, 19(10), 1048–1058.
- Spires-Jones, T. L., & Hyman, B. T. (2014). The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease. *Neuron*, 82(4), 756–771.
- Sterniczuk, R., Antle, M. C., LaFerla, F. M., & Dyck, R. H. (2010). Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: part 2. Behavioral and cognitive changes. *Brain Research*, 1348, 149–155.
- Streit, W. J. (2002). *Microglia as Neuroprotective, Immunocompetent Cells of the CNS*. 139(February), 133–139. <https://doi.org/10.1002/glia.10154>
- Streit, W. J., Khoshbouei, H., & Bechmann, I. (2020). Dystrophic microglia in late-onset Alzheimer's disease. *Glia*, 68(4), 845–854.
- Streit, W. J., Sammons, N. W., Kuhns, A. J., & Sparks, D. L. (2004). Dystrophic microglia in the aging human brain. *Glia*, 45(2), 208–212.
- Ulland, T. K., Song, W. M., Huang, S. C.-C., Ulrich, J. D., Sergushichev, A., Beatty, W. L., Loboda, A. A., Zhou, Y., Cairns, N. J., Kambal, A., & others. (2017). TREM2 maintains microglial metabolic fitness in Alzheimer's disease. *Cell*, 170(4), 649–663.

- Wang, C., Yue, H., Hu, Z., Shen, Y., Ma, J., Li, J., Wang, X.-D., Wang, L., Sun, B., Shi, P., & others. (2020). Microglia mediate forgetting via complement-dependent synaptic elimination. *Science*, 367(6478), 688–694.
- Wang, Y., Cella, M., Mallinson, K., Ulrich, J. D., Young, K. L., Robinette, M. L., Gilfillan, S., Krishnan, G. M., Sudhakar, S., Zinselmeyer, B. H., & others. (2015). TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model. *Cell*, 160(6), 1061–1071.
- Wang, Z., Li, H., Shi, B., Qin, Q., Ye, Q., & Thompson, G. J. (2025). Female 3xTg-AD mice demonstrate hyperexcitability phenotype of Alzheimer's disease in structure-function and function-behavior relationships. *Network Neuroscience*, 1–52.
- Weinhard, L., di Bartolomei, G., Bolasco, G., Machado, P., Schieber, N. L., Neniskyte, U., Exiga, M., Vadisiute, A., Raggioli, A., Schertel, A., & others. (2018). Microglia remodel synapses by presynaptic trogocytosis and spine head filopodia induction. *Nature Communications*, 9(1), 1228.
- Wißfeld, J., Nozaki, I., Mathews, M., Raschka, T., Ebeling, C., Hornung, V., Brüstle, O., & Neumann, H. (2021). Deletion of Alzheimer's disease-associated CD33 results in an inflammatory human microglia phenotype. *Glia*, 69(6), 1393–1412.
- Wu, S., Liu, H., Zhao, H., Wang, X., Chen, J., Xia, D., Xiao, C., Cheng, J., Zhao, Z., & He, Y. (2020). Environmental lead exposure aggravates the progression of Alzheimer's disease in mice by targeting on blood brain barrier. *Toxicology Letters*, 319, 138–147.
- Yang, S., Qin, C., Hu, Z.-W., Zhou, L.-Q., Yu, H.-H., Chen, M., Bosco, D. B., Wang, W., Wu, L.-J., & Tian, D.-S. (2021). Microglia reprogram metabolic profiles for phenotype and function changes in central nervous system. *Neurobiology of Disease*, 105290.
- Zetterberg, H., & Blennow, K. (2021). Moving fluid biomarkers for Alzheimer's disease from research tools to routine clinical diagnostics. *Molecular Neurodegeneration*, 16(1), 10.

XI. ANEXOS

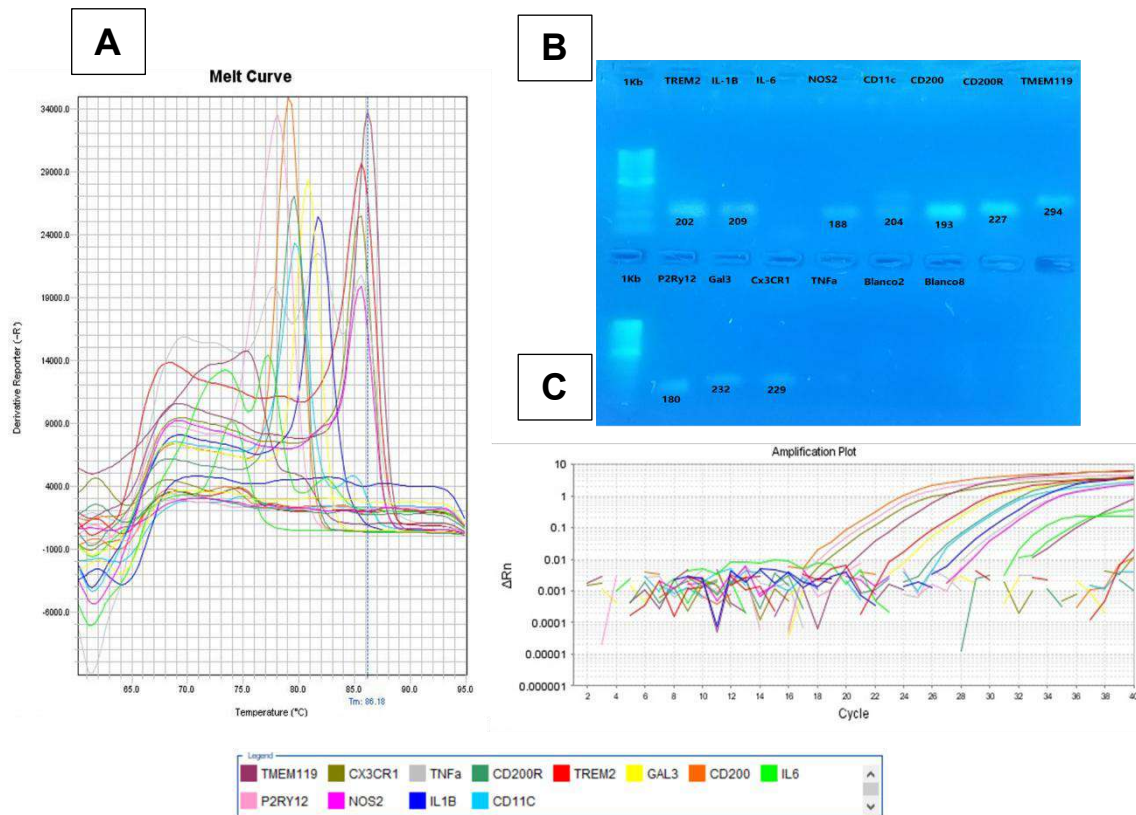
Los siguientes anexos presentan la información complementaria correspondiente al análisis molecular realizado mediante RT-qPCR en tejido hipocampal de ratones del modelo 3xTg-AD. En esta sección se incluyen las secuencias de los oligonucleótidos utilizados, así como la evidencia del proceso de estandarización y validación experimental, que permitió confirmar la especificidad, eficiencia y reproducibilidad de las reacciones de amplificación génica empleadas en el presente proyecto.

1. Secuencias de oligonucleótidos estandarizados utilizados en el proyecto de investigación.

Gen Mus musculus	Secuencia Oligos	Tm	Tamaño (pb)	Temperatura de alineación
TREM-2	F: AAGTGGACACAGCACCTCC R: AGGATCTGAAGTTGGTGCCC	60.18 59.67	202	62°C
IL-1β	F: GTAATGAAAGACGGCACACCC R: TCCTGACCACTGTTGTTTCCC	59.53 60.13	209	62°C
IL-6	F: TTTCTCTGGTCTTCTGGAGT R: TTAGCCAACCTCTGTGACT	58.02 58.39	219	62°C
NOS2	F: CCCAGCCTTGATCCTCATT R: TCTCTTGGGACCATCTCCT	60.40 60.32	188	62°C
CD11c	F: TCGGGTAGCATCAGTTCCAC R: TGTGTACCTCTTAGCTGCC	59.46 59.10	204	62°C
CD200	F: AATCAGGAGCGGGTGAATC R: CAAATCCCTCACAGGCTCGT	59.82 60.04	193	62°C
CD200R	F: TGGAGAACTTCTGCCCTAGC R: GGCAGGCCTCTGAGCTTAT	59.09 59.82	227	62°C
TMEM119	F: TACCCAGAACCTCCGGTCTC R: GCACAGGGACTTTCAGGAGG	60.32 60.32	294	62°C
P2Ry12	F: TGCTGTACACCGTCCTGTTT R: CGGCTCCAGTTTAGCATCA	59.97 60.11	180	62°C
Lgals3/Gal3	F: TCCACTTTAACCCCGCTTC R: AGTTGGCTGATTTCCCGGAG	59.96 60.04	232	62°C
CX3CR1	F: TCACCGTCATCAGCATCGAC R: TTGACTTCCGAGTTGCGGAG	60.18 60.32	229	62°C
TNFα	F: TCCCAATGGCCTCCCTCT R: TGGGTGAGGAGCACGTAGT	60.23 60.23	229	64°C

Anexo 1. Las secuencias de los cebadores se diseñaron y validaron siguiendo las recomendaciones de las guías MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) con el fin de asegurar la reproducibilidad y calidad de los experimentos de RT-qPCR. Los oligonucleótidos fueron diseñados con una temperatura de alineamiento promedio de 60 ± 2 °C, verificados mediante BLAST (NCBI) para evitar amplificaciones inespecíficas y sintetizados por T4 OLIGO, Irapuato, Guanajuato, México.

2. Estandarización y validación de oligonucleótidos por RT-qPCR



Anexo 2. (A) Curvas de amplificación de los oligonucleótidos estandarizados. Se observan las curvas de amplificación obtenidas por RT-qPCR para los genes evaluados en tejido hipocampal de ratones control 3xTg-AD. La pendiente y el ciclo umbral (Ct) confirmaron la eficiencia de amplificación dentro del rango óptimo para la mayoría de los oligonucleótidos diseñados. (B) Curvas de disociación (*melt curve*) de los productos amplificados. Las curvas de fusión mostraron picos únicos bien definidos para cada gen analizado, lo que indica especificidad en la amplificación y ausencia de dímeros de cebadores o productos inespecíficos. (C) Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR. Los productos amplificados se separaron en gel de agarosa teñido con SYBR Green. Se observan bandas únicas con tamaños esperados (160-300 pb) para los genes analizados.

3. Artículo científico publicado derivado del trabajo de tesis



Article

Hippocampal, Microglial, Morphological, and Amyloid Profiles Following Thiamine Pyrophosphate Treatment in 3xTg-AD Mice

Nelly Jovana Pastén-Castrejón ^{1,2} , Humberto Martínez-Orozco ² , Gloria Yareli Gutiérrez-Silerio ¹,
Hebert Luis Hernández-Montiel ³, Juan Pablo Maya-Arteaga ² , Israel Poblano-Paez ², Pablo García-Solís ^{1,*}
and Sofía Yolanda Díaz-Miranda ^{2,*}

¹ Laboratorio de Endocrinología y Nutrición, Facultad de Medicina, Centro de Investigación Biomédica Avanzada de la Universidad Autónoma de Querétaro, Santiago de Querétaro 76140, Mexico; jovana.pasten.08@gmail.com (N.J.P.-C.); gloria.gutierrez@uaq.mx (G.Y.G.-S.)

² Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología-UNAM Campus Juriquilla, Boulevard Juriquilla 3001, Querétaro 76230, Mexico; h_martinez@live.com.mx (H.M.-O.); juanpablo.maya@hotmail.com (J.P.M.-A.); israelpoblano9015@outlook.com (I.P.-P.)

³ Laboratorio de Neurobiología y Bioingeniería Celular, Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro 76230, Mexico; hebert@uaq.mx

* Correspondence: pablo.garcia@uaq.mx (P.G.-S.); yoldi@unam.mx (S.Y.D.-M.); Tel.: +52-(442)-192-12-00 (ext. 62530) (P.G.-S.); +52-(55)-56-23-40-58 (ext. 34058) (S.Y.D.-M.)

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is characterized by the accumulation of amyloid- β (A β) and chronic neuroinflammation, with microglia playing a central role in its pathogenesis. Alterations in microglial metabolism have been proposed to contribute to AD-related inflammatory responses and reduced A β clearance, suggesting that thiamine-dependent pathways may be relevant in this context. Thiamine pyrophosphate (TPP), the active form of vitamin B1, is essential for glucose metabolism and mitochondrial function; however, its association with microglial changes in AD remains unclear. In this study, 9-month-old female triple-transgenic AD (3xTg-AD) mice and non-transgenic controls (NoTg) received TPP (2.0 mg/mL) or saline as a vehicle for six weeks via osmotic pumps. Nesting, a hippocampus-dependent behavioral test, as well as analyses of A β burden, microglial morphology, and the expression of genes related to metabolic and immune pathways were evaluated. Differences in nesting behavior between experimental groups were observed, but TPP treatment was not associated with an evident change in 3xTg-AD mice. In the subiculum and CA1 regions of the hippocampus of female 3xTg-AD mice exposed to TPP, a lower A β burden was observed, and morphological variations in microglia were detected in both groups (3xTg-AD and NoTg). Additionally, in the brain of the TPP-treated group, some changes in mRNA gene expression were recorded. Together, these findings describe hippocampal microglial and amyloid profiles following TPP treatment in 3xTg-AD mice and provide a basis for further investigation of thiamine-dependent pathways in AD-related neuroinflammatory contexts.



Academic Editor: Natalia V. Gulyaeva

Received: 29 April 2026

Revised: 19 May 2026

Accepted: 22 May 2026

Published: 2 June 2026

Copyright: © 2026 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 \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) license.

Keywords: vitamin B1; Alzheimer's genetics; microglial morphology; neuroinflammation; amyloid- β clearance; metabolic flexibility; gene expression; osmotic pump; Alzheimer's disease treatment; mitochondrial dysfunction

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative, progressive, and irreversible disorder that affects millions of people worldwide. It is also the main type of dementia in

older populations [1]. AD is characterized by amyloid- β (A β) accumulation, hyperphosphorylation of tau protein, and chronic neuroinflammation. Together, these alterations are associated with progressive synaptic and cognitive dysfunction [2–4]. Moreover, microglia play an important role in AD progression by regulating inflammatory responses and modulating pathways related to neuronal maintenance, metabolism, and homeostasis [5,6].

In AD, microglia contribute to both A β plaque formation and clearance throughout disease progression [7,8]. They recognize and phagocytose aggregated A β species through several pathways, including those involving the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-2 (TREM2) [8,9]. TREM2 is highly involved in the transition of microglia toward a disease-associated microglia (DAM) state [10–12]. This transition is accompanied by morphological and transcriptional changes, including reduced process complexity, enlarged soma morphology, and the emergence of reactive microglial states associated with decreased expression of homeostatic markers and increased expression of disease-associated markers, including *Trem2* and *Lgals3*, which have been associated with A β plaque formation in AD [13,14].

A β accumulation is accompanied by inflammatory and metabolic changes in microglia, including altered TREM2-related signaling and increased expression of mediators such as TNF, IL-1 β , IL-6, and iNOS [5,14–16]. In addition, the inflammatory state acquired by microglia in AD has been linked to alterations in cellular energy metabolism, including pathways related to glycolysis, mitochondrial function, and TREM2-associated signaling [10,14,17]. These metabolic changes involve enzymes such as PDK1 (*pyruvate dehydrogenase kinase 1*), which regulates *pyruvate dehydrogenase* activity and has been implicated in the balance between glycolysis and oxidative phosphorylation [18,19].

Alterations in microglial energy metabolism have also been proposed in AD. Previous studies suggest that reduced metabolic flexibility may be associated with impaired A β clearance and enhanced inflammatory responses, making thiamine-dependent pathways of interest in this context [14,17]. Thiamine pyrophosphate (TPP), the active form of vitamin B1, is an essential cofactor for enzymes involved in glucose metabolism and mitochondrial function [20], including *pyruvate dehydrogenase* and *α -ketoglutarate dehydrogenase* [21–25]. Altered metabolism has also been described in AD, including reduced activity of Thiamine-dependent enzymes and lower expression of *thiamine pyrophosphokinase 1* (TPK1) in affected brain regions [25–27].

Experimental studies have shown that TPP participates in pathways related to mitochondrial respiration, oxidative stress, and glucose metabolism [25,28,29]. Because alterations in these processes have been described in AD, TPP has been proposed as a molecule of interest in neurodegenerative conditions [20,30,31]. However, although previous studies have examined thiamine supplementation in AD models, the association of TPP exposure with microglial morphology, inflammatory and metabolic gene expression, and AB burden remains incompletely understood, particularly in early-affected hippocampal regions such as the subiculum and CA1 [31,32].

Therefore, the present study evaluated the association between chronic TPP exposure and hippocampal-dependent nesting behavior, A β burden, microglial morphology, and the expression of selected genes involved in inflammatory and metabolic pathways in the hippocampus of 9-month-old female 3xTg-AD mice.

2. Results

2.1. Hippocampal-Dependent Nesting Behavior Following TPP Exposure in 3xTg-AD Mice

Nesting behavior was assessed as a hippocampal-dependent task. After six weeks, 3xTg-SS mice showed lower nest scores than both NoTg groups ($p = 0.031$ vs. NoTg-SS; $p = 0.014$ vs. NoTg-TPP), whereas nest scores in 3xTg-TPP mice were similar to those

observed in NoTg-SS and NoTg-TPP animals ($p > 0.99$ for both comparisons). No difference was detected between 3xTg-TPP and 3xTg-SS mice ($p = 0.179$). Overall group differences were supported by the Kruskal–Wallis test ($H(3) = 11.49, p = 0.0093$) followed by Dunn’s post hoc test (Figure 1A–C).

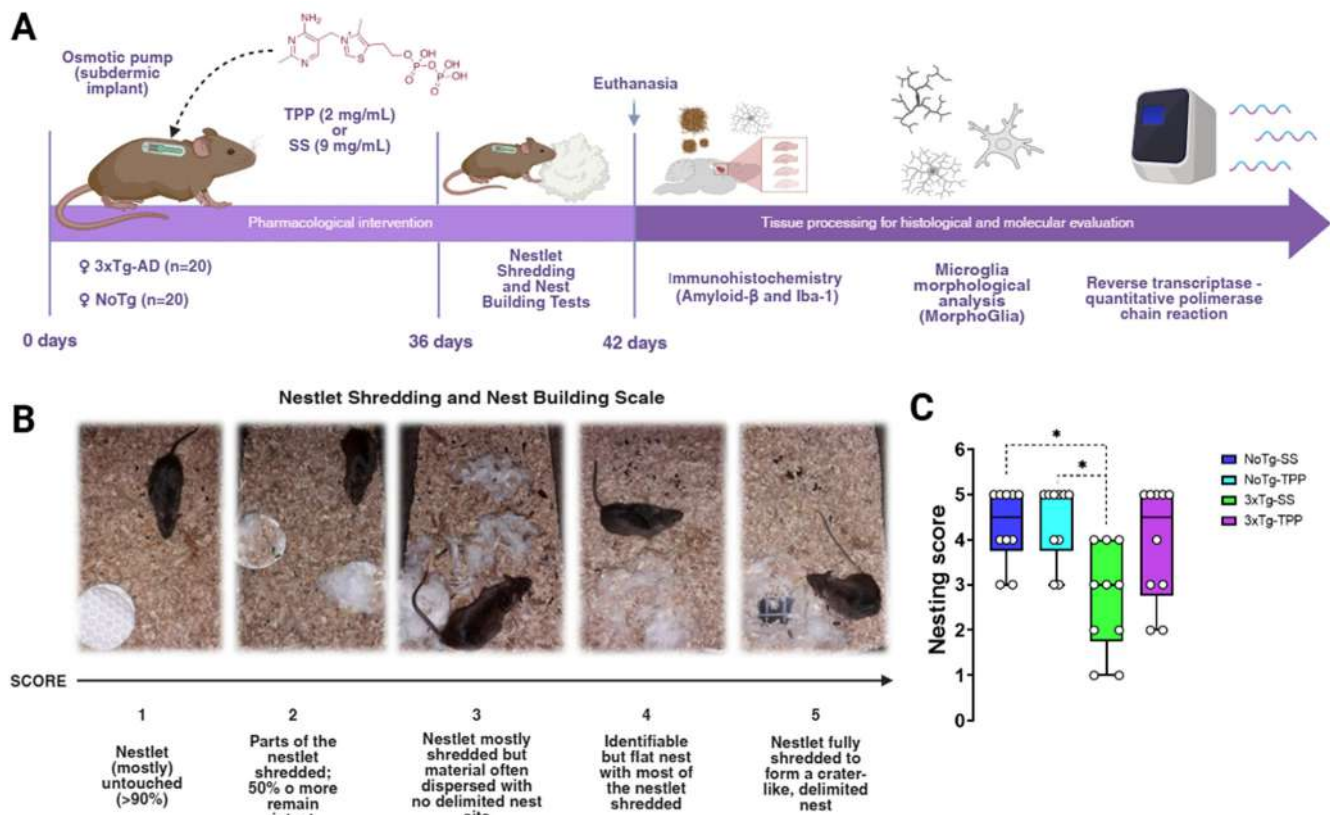


Figure 1. Hippocampal-dependent nesting behavior following TPP exposure in female 3xTg-AD mice. (A) Experimental timeline and schematic representation of the TPP intervention protocol. Nine-month-old female NoTg and 3xTg-AD mice received saline solution (SS, 9 mg/mL) or thiamine pyrophosphate (TPP, 2 mg/mL) via osmotic pumps for 42 days. (B) The nestlet shredding and nest-building scale, as described by Deacon and Dorninger [33,34], were used to assess nesting behavior. (C) Box and whisker plot showing nesting scores of NoTg-SS, NoTg-TPP, 3xTg-SS, and 3xTg-TPP mice. Data are presented as median and interquartile range. Asterisks indicate significant pairwise differences identified by Dunn’s post hoc test following Kruskal–Wallis analysis ($* p < 0.05$). $n = 10$ animals/group. Abbreviations: NoTg, non-transgenic; SS, saline solution; TPP, thiamine pyrophosphate.

2.2. Reduced Hippocampal A β Burden Associated with TPP Exposure in 3xTg-AD Mice

Amyloid burden was quantified to evaluate whether chronic TPP exposure was associated with changes in A β accumulation within early-affected hippocampal regions of 3xTg-AD mice. Quantification of BAM10+ immunolabeling showed fewer A β -positive plaques in the subiculum (SUB; $U = 0, p = 0.012$) and CA1 ($U = 0, p = 0.0079$) of 3xTg-TPP mice compared with 3xTg-SS mice. This pattern was consistent with the lower A β -immunostaining labeling area observed in both regions. As expected, BAM10+ labeling was detected in 3xTg-AD mice but not in NoTg animals (Figure 2A). Box and whisker plots summarize plaque number and total plaque area in SUB ($U = 1, p = 0.015$) and CA1 ($U = 0, p = 0.008$), as well as 2D analysis of plaque number versus area of A β plaques (Figure 2B–G; Supplementary Materials Figure S1). Data are presented as median and interquartile range. Statistical differences between 3xTg-SS and 3xTg-TPP groups were evaluated using the Mann–Whitney U test ($** p < 0.01, n = 5$ animals/group).

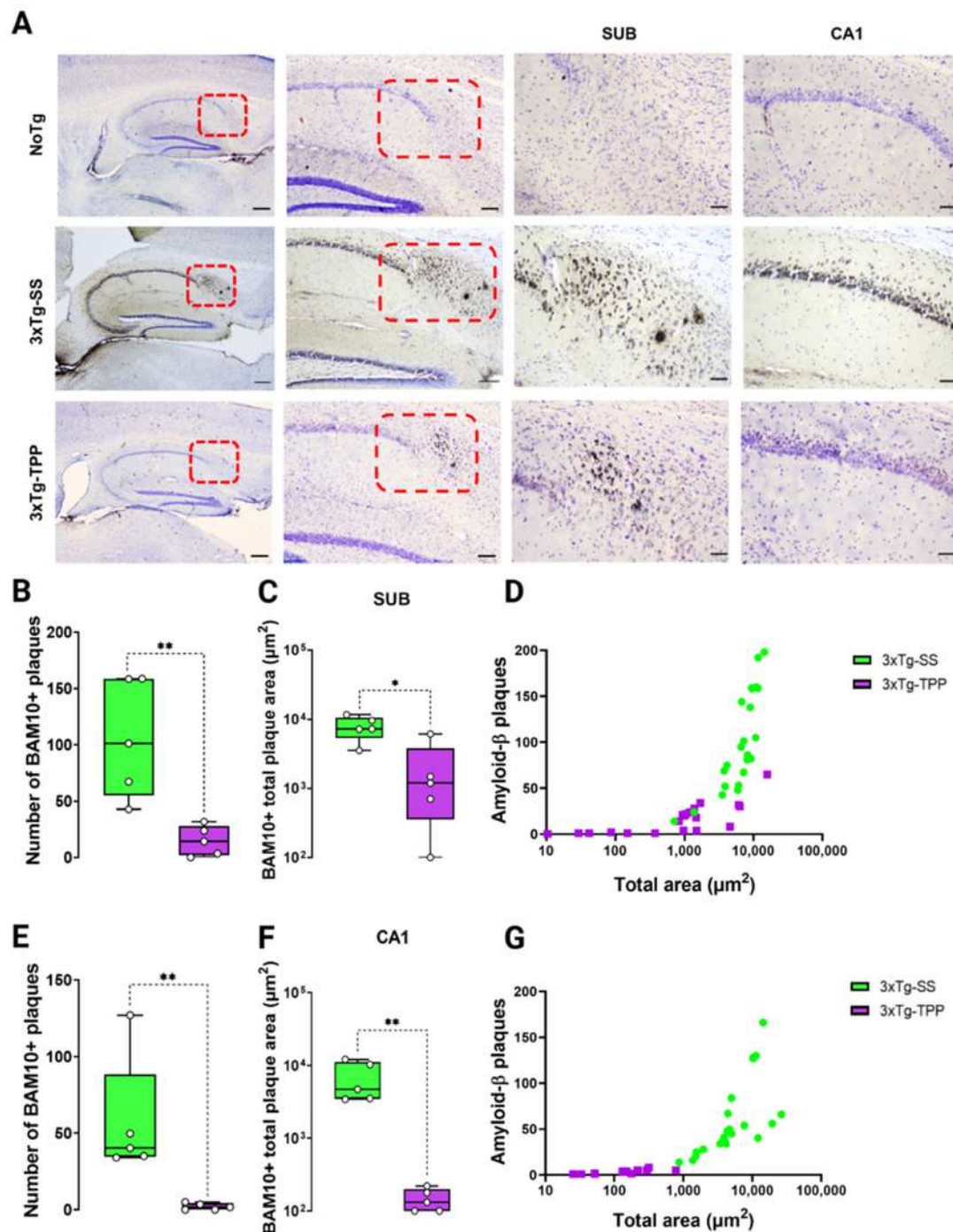


Figure 2. Hippocampal A β burden following TPP exposure in 3xTg-AD mice. **(A)** Representative images of the hippocampal formation and higher-magnification photomicrographs of the SUB and CA1 immunostained with the anti-A β antibody BAM10 in NoTg, 3xTg-SS (9 mg/mL), and 3xTg-TPP (2 mg/mL) mice. Scale bars: 500 μm (40 $\times$), 100 μm (100 $\times$), and 50 μm (200 $\times$). BAM10+ labeling was absent in NoTg animals and was observed in both intracellular and extracellular compartments in 3xTg-SS mice. Lower BAM10+ labeling was observed in the SUB and CA1 of 3xTg-TPP mice compared with 3xTg-SS mice. **(B)** Number of BAM10+ plaques in the SUB. **(C)** Total BAM10+ plaque area in the SUB. **(D)** Two-dimensional plot showing plaque number versus area in the SUB. **(E)** Number of BAM10+ plaques in the CA1. **(F)** Total BAM10+ plaque area in the CA1. **(G)** Two-dimensional plot showing plaque number versus area in the CA1. Data are presented as median and interquartile range. Asterisks indicate significant differences between groups after the Mann–Whitney U test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n = 5$ animals/group). Abbreviations: SUB, subiculum; A β , amyloid- β ; NoTg, non-transgenic; SS, saline solution; TPP, thiamine pyrophosphate.

2.3. Microglial Density in the Hippocampal Formation of 3xTg-AD Mice Following TPP Exposure

Microglial density was quantified to determine whether chronic TPP exposure was associated with changes in the abundance and regional distribution of microglial cells within the hippocampal formation of 3xTg-AD mice. Quantification of Iba1+ cells/mm² showed that overall microglial density numbers remained similar across groups, with a difference detected only in CA1 (Figure 3A,C). Kruskal–Wallis test revealed a group effect in CA1 ($H(3) = 8.356$, $p = 0.022$), and Dunn’s post hoc test indicated a higher number of Iba1+ cells in 3xTg-TPP mice compared with 3xTg-SS ($p = 0.036$). In contrast, no significant differences were detected in the SUB ($H(3) = 3.822$, $p = 0.297$). Data are presented as median and interquartile range. Asterisks indicate significant pairwise differences identified by Dunn’s post hoc test following Kruskal–Wallis analysis ($*p < 0.05$, $n = 4$ animals/group).

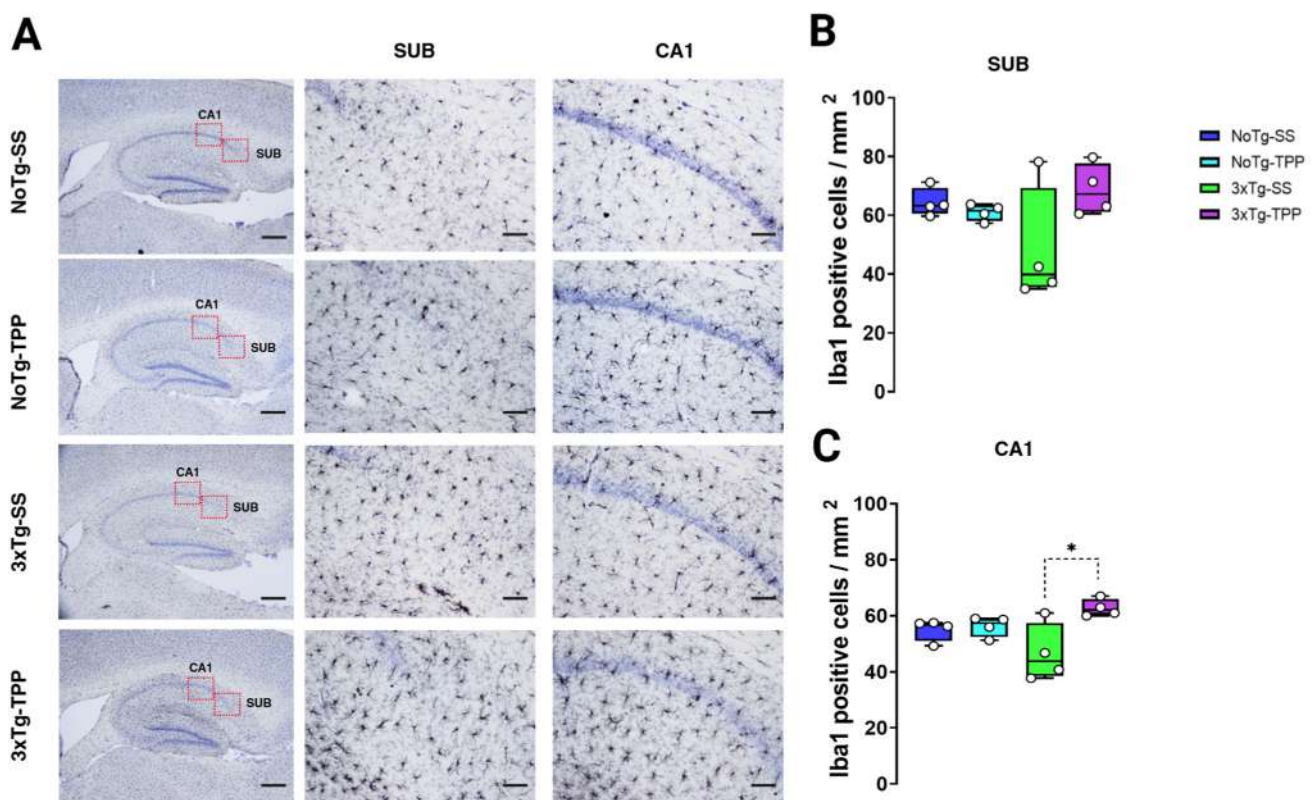


Figure 3. Microglial density in the hippocampal formation of 3xTg-AD mice following TPP exposure. (A) Representative images of the hippocampal formation and higher-magnification photomicrographs of SUB and CA1 from Iba1-immunostained brain slices of NoTg and 3xTg-AD mice receiving saline solution (SS, 9 mg/mL) or thiamine pyrophosphate (TPP, 2 mg/mL) for 42 days. Scale bars: 500 μ m (40 $\times$) and 50 μ m (200 $\times$). (B) A box-and-whisker plot showing the density of Iba1+ cells/mm² in the SUB. (C) A box-and-whisker plot showing the density of Iba1+ cells/mm² in the CA1. Microglial counts were normalized by area (mm²). Data are presented as median and interquartile range. Asterisks indicate significant pairwise differences identified by Dunn’s post hoc test following the Kruskal–Wallis test ($*p < 0.05$, $n = 4$ animals/group). Abbreviations: SUB, subiculum; CA1, Cornu Ammonis 1; A β , amyloid- β ; NoTg, non-transgenic; SS, saline solution; TPP, thiamine pyrophosphate.

These observations indicate that hippocampal microglial density remained relatively stable across groups at this stage of pathology, with a region-specific difference detected in CA1 following TPP.

2.4. Microglial Morphology and Structural Complexity in the Hippocampal Formation of 3xTg-AD Mice Following TPP Exposure

Microglial morphology was analyzed to evaluate whether chronic TPP exposure was associated with differences in structural complexity in 3xTg-AD mice (Figure 4A–F; Supplementary Materials Figures S2–S4). Using the MorphoGlia pipeline developed by Maya-Arteaga and colleagues [35], 1740 microglial cells were analyzed and classified into four clusters (Clusters 0–3) spanning a continuum from less complex morphologies with reduced branching and lower Sholl complexity (Cluster 0) to highly complex and ramified cells with greater structural complexity (Cluster 1), whereas Clusters 2 and 3 displayed intermediate profiles (Figure 4F). Across hippocampal regions, 3xTg-AD mice were enriched in Cluster 0, whereas NoTg mice showed a greater representation of Cluster 1 cells. Following TPP exposure, differences in cluster distribution were detected across groups and regions ($\chi^2 = 270.78$, $p < 2.68 \times 10^{-45}$), while region-specific associations were identified by standardized residual analysis (Figure 4B,C).

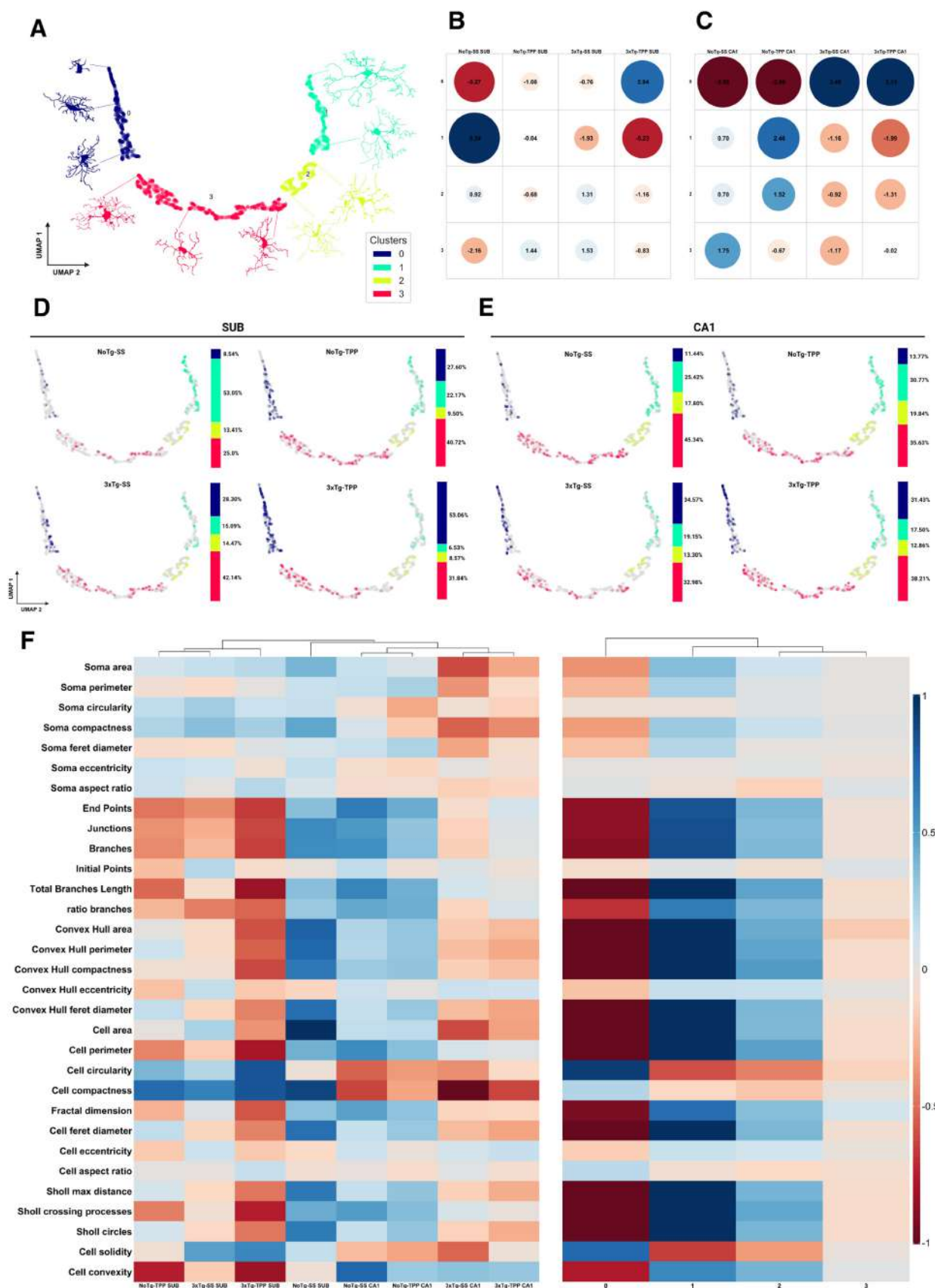
In the SUB, NoTg-SS mice showed a predominance of Cluster 1 cells, whereas NoTg-TPP mice displayed a broader distribution across Clusters 1–3. In contrast, 3xTg-SS mice were enriched in Cluster 0. 3xTg-TPP mice exhibited a distribution characterized mainly by Clusters 0 and 3, indicating a shift toward less complex and intermediate morphologies in this region (Figure 4D). In the CA1, NoTg-SS mice showed a greater proportion of Cluster 3 cells, whereas NoTg-TPP mice were enriched in Clusters 1 and 2. 3xTg-SS mice remained predominantly associated with Cluster 0. In contrast, 3xTg-TPP mice exhibited an intermediate cluster distribution, with representation of Cluster 0 together with a greater contribution of Cluster 2 relative to 3xTg-SS mice. (Figure 4E).

Heatmap of morphometric parameters further distinguished the identified clusters and experimental groups (Figure 4F). In the SUB, differences were primarily observed in branching, number of initiation points, and Sholl complexity, with 3xT-SS animals showing lower values than NoTg groups. In CA1, NoTg-TPP mice were associated with greater branching, total branch length, and cell convexity, whereas 3xTg-SS mice retained less complex morphometric profiles. 3xTg-TPP mice showed intermediate morphometric profiles in CA1, overlapping features of Clusters 0 and 2. Together, these observations indicate that microglial morphology differed across hippocampal subregions and experimental conditions, with the transgenic background associated with reduced structural complexity.

2.5. Descriptive Analysis of Inflammatory and Metabolic Gene Expression in the Hippocampus Following Chronic TPP Exposure

To explore whether chronic TPP exposure was associated with differences in the expression of genes related to microglial activation and metabolism, hippocampal mRNA levels were analyzed by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) (Figure 5A). To examine potential functional relationships among the analyzed genes, an interactome network was generated using STRING (<https://string-db.org>; accessed on 8 February 2026). The resulting network showed interactions among inflammatory mediators (*Tnf*, *Il1b*, *Il6*, *Nos2*), microglial receptors (*Trem2*), and metabolic regulators (*Pdk1*, *Lgals3*), indicating that these genes participate in interconnected pathways relevant to microglial activation and neuroinflammation (Figure 5A).

Descriptive comparison of relative mRNA expression levels ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) revealed variability across experimental groups (Figure 5B–I). Data are presented as median and interquartile range to illustrate central tendency and dispersion within each group. In NoTg mice, the NoTg-TPP group showed lower median expression of *Il1b*, *Il6*, *Trem2*, *Nos2*, and *Pdk1* compared with NoTg-SS controls. *Lgals3* and *Pdk1* displayed lower median values in 3xTg-TPP than in 3xTg-SS mice. In contrast, *Nos2* expression showed higher median levels in 3xTg-SS mice than in other groups.



(B,C) Standardized residuals from the chi-square analysis showing the distribution of microglial clusters in the SUB (B) and CA1 (C). Blue circles indicate positive residuals and red circles indicate negative residuals. Color intensity and circle size are proportional to the magnitude of the standardized residuals. (D,E) UMAP plots illustrating the relative distribution of microglial clusters across experimental groups in the SUB (D) and CA1 (E). (F) Heatmaps comparing experimental groups and clusters based on 32 extracted morphological features. The heatmap organized by experimental group (left) shows differences in branching, branch length, Sholl complexity, and other morphometric parameters according to genotype, treatment, and hippocampal region. The cluster-based heatmap (right) highlights the distinct morphometric profiles underlying each cluster. Abbreviations: SUB, subiculum; UMAP, Uniform Manifold Approximation and Projection; NoTg, non-transgenic; SS, saline solution.

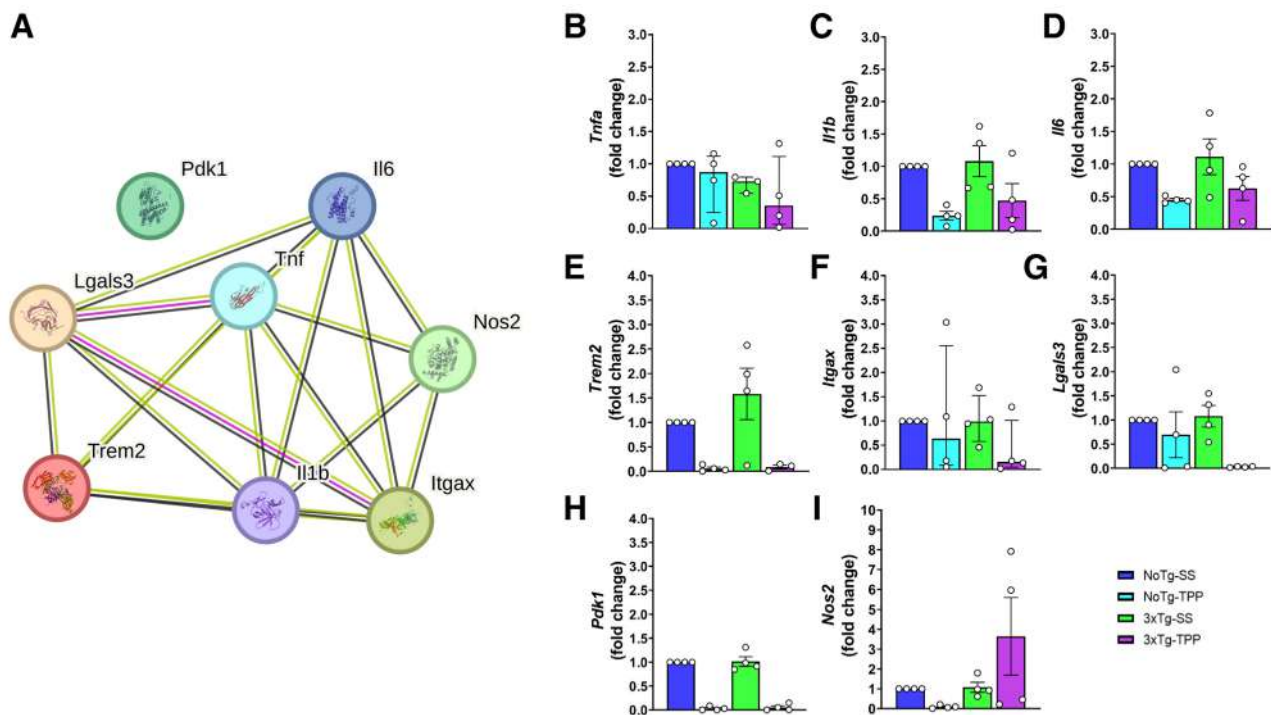


Figure 5. Descriptive, inflammatory, and metabolic relative gene expression in the hippocampus following TPP exposure in NoTg and 3xTg-AD mice. (A) Interactome network of microglia-related genes generated using STRING (<https://string-db.org>; accessed on 8 February 2026). Nodes represent proteins: colored nodes are query proteins and first-shell interactors. Edges represent protein–protein associations derived from different sources of evidence. Green edges indicate text-mining associations, pink edges indicate experimentally determined interactions, and black edges indicate co-expression relationships. Hippocampal mRNA expression levels were quantified by RT-qPCR and expressed as fold change calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, normalized to the geometric mean of RPL13A and RPL27 as housekeeping genes. Data are presented as median and interquartile range ($n = 3$ – 4 animals per group). Due to the limited number of biological replicates, results are shown descriptively. (B) *Tnfa*, (C) *Il1b*, (D) *Il6*, (E) *Trem2*, (F) *Itgax*, (G) *Lgals3*, (H) *Pdk1*, and (I) *Nos2* relative mRNA expression levels. Abbreviations: RT-qPCR, reverse transcription quantitative polymerase chain reaction; TNF, tumor necrosis factor.

Overall, gene expression distributions in 3xTg-SS mice were broadly similar to those observed in NoTg controls for several markers, although variability differed among genes. Given the limited number of biological replicates ($n = 3$ – 4 per group), no inferential statistical analyses were performed, and results are presented descriptively. These findings are exploratory and hypothesis-generating.

3. Discussion

The present study provides a descriptive and region-specific characterization of hippocampal A β burden, microglial morphology, and selected metabolic gene expression following chronic TPP exposure in female 3xTg-AD mice. Rather than establishing direct causal mechanisms, these findings identify coordinated patterns consistent with links between thiamine-dependent metabolic pathways and microglial diversity, as described in experimental models of Alzheimer's disease.

Alzheimer's is recognized as a multicausal disease in which the development of effective therapies remains challenging. Key contributing processes include tau pathology, A β aggregation, neuroinflammation, synaptic dysfunction, and metabolic pathways [36]. From this perspective, preclinical and clinical evidence supports the therapeutic potential of thiamine derivatives in AD. Thus, benfotiamine, a lipophilic thiamine derivative, has been shown to improve spatial memory, reduce A β deposition and tau phosphorylation, and increase thiamine levels in cortical areas of transgenic AD mice [32,37]. Unlike benfotiamine, which requires phosphorylation by TPK1 to generate active TPP, direct administration of TPP bypasses this enzymatic step [23]. Because TPK1 expression is reduced in AD brains [27], direct TPP administration may theoretically bypass a potential metabolic bottleneck that could limit the efficacy of thiamine precursors.

In addition to its metabolic role, thiamine pyrophosphate may also be relevant in glial biology. Thiamine pyrophosphatase (TPPase) activity has been identified in microglial cells, localized to the plasma membrane and cellular processes, suggesting active thiamine-related metabolism in these cells [38]. This supports the notion that thiamine-dependent pathways may contribute to microglial function, providing a conceptual framework to interpret the patterns observed following TPP exposure in the present study.

Among the principal findings of this study were lower median *Pdk1* and *Lgals3* transcript levels in TPP-exposed groups, together with lower hippocampal A β burden. PDK1 phosphorylates and inhibits pyruvate dehydrogenase, thereby limiting pyruvate's entry into the TCA cycle and favoring glycolytic metabolic programs previously associated with inflammatory microglial states [14]. Therefore, the lower median *Pdk1* expression observed following TPP exposure is consistent with transcriptional patterns previously associated with greater reliance on oxidative phosphorylation, although metabolic flux was not directly assessed. Similarly, lower median *Lgals3* expression may be relevant because galectin-3 has been associated with impaired A β clearance and neuroinflammatory responses in AD [15,39].

Consistent with these transcriptional patterns, BAM10+ immunoreactivity revealed lower A β burden in both SUB and CA1, accompanied by a shift toward smaller and more compact deposits. PCA-based analyses (Supplementary Figure S1) further suggested differences in plaque size and structural compactness [7]. Together, these observations are compatible with previous reports linking thiamine-dependent metabolic pathways with amyloid dynamics in vulnerable hippocampal circuits; however, they do not establish direct mechanistic modulation [27,30]. Although amyloid burden was quantitatively assessed using BAM10+ immunohistochemistry, future studies incorporating biochemical analyses of soluble and insoluble A β species, as well as APP-processing pathways, will be important for further characterizing the effects of TPP exposure.

On the other hand, morphometric clustering identified four microglial populations representing a continuum from less complex to highly ramified morphologies. Across regions, 3xTg-AD mice were predominantly associated with low-complexity clusters, whereas NoTg mice showed greater representation of highly ramified morphologies. Following TPP exposure, microglial distributions differed across hippocampal subregions. In the SUB,

3xTg-TPP mice showed greater representation of low-complexity and intermediate clusters, whereas in CA1, the distribution was more similar to that observed in 3xTg-SS mice.

In the central nervous system, thiamine has been implicated in regulating microglial immune responses and bioenergetic programs relevant to AD [40–42]. Thiamine deficiency has been associated with increased microglial proliferation and neuronal loss in rodent brains [31,43], whereas increased numbers of Iba1+ microglia have been reported in the hippocampus of 3xTg-AD mice from six months of age [44]. In the present study, overall, Iba1+ cell density was largely comparable between NoTg and 3xTg-AD mice; however, TPP-exposed 3xTg-AD animals displayed higher microglial numbers in the CA1. Given that thiamine has been associated with microglial bioenergetics and responsiveness [10,41,42], this regional increase may be compatible with altered microglial recruitment or persistence in CA1, although cell-specific functional assays were not performed.

TPP exposure was associated with region-specific shifts in microglial morphological clusters. In the SUB, 3xTg-TPP mice showed a higher relative abundance of low-complexity microglia together with a lower extracellular A β burden. Low-complexity morphologies have previously been associated with reactive, migratory, and phagocytic states in neurodegenerative contexts [45–47]. By contrast, NoTg animals were enriched for highly ramified clusters, which are commonly associated with surveillance-related phenotypes [35,45,47]. Intermediate clusters may represent transitional morphologies along the continuum between reactive and homeostatic states.

In contrast, microglial cluster distributions in CA1 were more similar between TPP and SS-treated 3xTg-AD mice, although 3xTg-TPP animals showed a modest increase in intermediate complexity clusters relative to 3xTg-SS mice. This regional difference may reflect distinct influences of extracellular versus intracellular A β accumulation on microglial structural plasticity, since extracellular plaque pathology is more prominent in the SUB, whereas intracellular A β is still predominant in CA1 at this age in 3xTg-AD mice [44,48,49]. TPP exposure was also associated with subtle morphological shifts in NoTg mice, although the functional significance of these changes remains uncertain [50]. Overall, these findings suggest that TPP exposure may be associated with changes in the relative representation of distinct microglial states rather than with a uniform morphological response. However, morphology alone does not allow direct functional inference.

Our histological observations were aligned with the gene expression distributions. Relative to NoTg-SS mice, 3xTg-SS animals showed differences in the expression of inflammatory and metabolism-related genes, which may reflect distinct microglial states within the AD model. In contrast, TPP exposure was associated with lower median expression of Pdk1 and Lgals3, as well as lower hippocampal A β burden. These findings are consistent with previous studies implicating thiamine-dependent pathways in microglial metabolism and amyloid-associated inflammation [14,27,41].

PDK1 phosphorylates and inactivates PDH, thereby restricting pyruvate entry into the TCA cycle and promoting glycolytic metabolism [14,27]. Because glycolytic programs have been associated with pro-inflammatory microglial states, the lower median Pdk1 expression observed in TPP-treated groups may be compatible with transcriptional patterns previously associated with greater reliance on OXPHOS and metabolic function [41,51,52]. Similarly, lower median Lgals3 expression may be relevant, as galectin-3 is a TREM2 ligand associated with impaired A β clearance and inflammatory microglial activation in AD [15,39]. TPP-exposed groups also showed lower median expression of IL-1 β , IL-6, Trem2, and Nos2 relative to saline controls. Together, these transcriptional patterns may be compatible with previously described immunometabolic frameworks in which thiamine availability influences the balance between inflammatory and homeostatic microglial programs [10,14,17].

These observations should nevertheless be interpreted cautiously. RT-qPCR analyses were performed with a limited number of biological replicates; therefore, the transcriptional findings are descriptive rather than inferential. In addition, neither metabolic flux nor cell-type-specific gene expression was directly assessed. Consequently, the present data do not demonstrate that TPP directly modifies microglial metabolism or function, but rather identify transcriptional patterns that are compatible with mechanisms proposed in previous studies [14,19,41].

In addition, the present study identified morphological, amyloid-associated, and transcriptional changes following TPP exposure. Additional protein-level characterization using markers such as CD68, TREM2, TMEM119, P2RY12, or Galectin-3, together with amyloid-related co-localization approaches, will be necessary to further define the functional phenotypes and microglial states associated with TPP exposure [17,39].

Compared with previous studies using high-dose oral benfotiamine, six weeks of continuous low-dose TPP administration (2 mg/mL) was associated with detectable histological and transcriptional differences. Because TPP is the active form of thiamine, direct administration may bypass metabolic limitations associated with reduced TPK1 expression observed in AD brains [23,27,53]. In line with prior observations of thiamine-related enzymatic activity, such as TPPase, in microglial cells, this may also be compatible with cell-type-specific metabolic engagement [38]. However, the present study did not directly compare TPP with benfotiamine; therefore, no conclusion regarding relative efficacy can be drawn.

Overall, these findings suggest that thiamine-dependent metabolic pathways may contribute to microglial and amyloid-related changes in the hippocampus of 3xTg-AD mice. Future studies combining dose-response approaches, metabolic flux analyses, and cell-specific profiling will be necessary to determine whether these descriptive associations reflect direct mechanisms relevant to AD progression.

4. Materials and Methods

4.1. Experimental Animals

Homozygous 9-month-old female 3xTg-AD mice (harboring APPSwe and tauP301L transgenes on a mutant PS1M146V knock-in background) generated from a B6129S hybrid background ($n = 20$) were used, as well as NoTg mice of the same age and sex. Animals were maintained under the same B6129S hybrid background ($n = 20$). All mice were bred and raised in the vivarium laboratory of the Institute of Neurobiology (INB)-UNAM, housed in polycarbonate cages (12 × 12 × 25 cm) under standard conditions (4–5 animals per cage, 20–25 °C, 40–70% humidity, 12 h light/dark cycle) with ad libitum access to Purina® Chow 5001 and water. 3xTg-AD and NoTg mice (129C57/BL6) were randomly assigned to experimental groups (TPP treatment or SS, saline solution) using a simple randomization procedure prior to the start of the intervention. All subsequent experimental procedures and analyses were conducted using the assigned group codes.

Only female mice were used for this study, since sex-dependent differences in the 3xTg-AD model are well documented. Females show an earlier onset of amyloid and tau pathology compared to males [48,54]. Regarding age, nine months is considered “early middle-age” in mice. According to research, this is a suitable window to study early pathological changes and therapeutic interventions [55]. During early middle age, 3xTg-AD females exhibit evident intracellular A β accumulation in the CA1 and SUB. Extracellular plaques emerge later, around 11–12 months of age [56]. Importantly, cognitive alterations and diffuse A β deposits have also been reported at nine months of age [57], supporting its selection as an appropriate time point for intervention. The estrous cycle was monitored,

and females were preferentially tested and processed during the diestrus phase to reduce hormonal variability [58].

All procedures were approved by the Bioethics Committee of the Faculty of Medicine, Universidad Autónoma de Querétaro (FM-UAQ, protocol number 12853, date of approval: 28 October 2021) and complied with the institutional guidelines of the INB-UNAM (protocol number 057, date of approval: 28 February 2013) and international standards for the care and use of laboratory animals (NIH). To minimize experimental bias, all procedures—from surgical implantation to behavioral testing and immunohistochemical analysis—were conducted under blinded conditions. Clinical trial number: not applicable.

4.2. Pharmacological Intervention

A stock solution of TPP was prepared at a final concentration of 2 mg/mL in sterile saline [59]. Continuous delivery was achieved using Osmotic pumps model 2006 (ALZET®, Cupertino, CA, USA) (0.15 µL/h for 42 days), corresponding to an estimated cumulative exposure of approximately 12.1 mg/kg in mice weighing ~25 g. The required amount of TPP was dissolved in 0.9% saline, gently mixed until homogeneous, and immediately loaded into the osmotic pumps according to the manufacturer's instructions. For vehicle treatments, only saline was administered. Four experimental groups were used: transgenic mice treated with TPP (3xTg-TPP, $n = 10$), transgenic mice treated with vehicle solution (3xTg-SS, $n = 10$), and non-transgenic mice treated with TPP and SS as controls (NoTg-TPP, $n = 10$; NoTg-SS, $n = 10$). A three-centimeter surgical incision was made along the middorsal plane. Afterward, the skin was separated from the muscle, and the pump was inserted beneath the skin. After wound closure, a topical analgesic-antibiotic ointment was applied to prevent self-scratching and infection [60]. Mice were allowed to recover from anesthesia for 30–60 min on a heating pad and then returned to their cages under continuous monitoring for the first 48 h, the critical period for pump activation. The implanted pump contained either TPP or vehicle solution and was weighed before filling and after completion of the procedure to verify solution delivery. For surgery, the animals were anesthetized using a 70:30 mixture of ketamine and xylazine at a dose of 70 mg/kg and 6 mg/kg, respectively. TPP (X-2) was obtained from the Instituto de Investigaciones Filosóficas y Científicas, S.A. de C.V. Drug delivery was performed using osmotic pumps (model 2006, ALZET®, Cupertino, CA, USA), which provide continuous release via an osmotic mechanism. In this process, water influx through a semipermeable membrane generates pressure that drives the drug solution at a constant rate (0.15 µL/h, 42 days).

4.3. Nest Shredding and Nest Building Test

The nest-building task ($n = 10$ animals per group) was assessed during the final week of treatment, after the animals had undergone habituation and handling. This assay evaluates innate, hippocampal-dependent behavior in rodents and is widely used as a sensitive indicator of cognitive function and general well-being [33,34]. For the test, each mouse was individually housed in a clean polycarbonate cage (12 cm × 12 cm × 25 cm) with food and water available ad libitum. A single pressed cotton pad (5 cm × 5 cm) was placed in the lower left corner of the cage. This nestlet was provided at the beginning of the dark phase of the reversed light/dark cycle, allowing the animals to manipulate it for 24 h. After this period, the nests were photographed from above, and any unused material was removed. Nest quality was scored according to a 1–5 scale (1 = no nest; 5 = satisfactory nest), as described by Deacon [34]. Scoring was performed independently by two blinded observers to minimize bias. Both the final score and the material used were included in the statistical analysis.

4.4. Tissue Preparation

Brain tissue was collected at the humanitarian endpoint and processed through two distinct procedures. For histological and immunohistochemical analyses, animals were deeply anesthetized with an overdose of sodium pentobarbital (0.22 mL/kg) administered intraperitoneally. Adequate anesthesia depth was confirmed by the absence of response to tail pinch stimulation prior to intracardiac perfusion. Mice were transcardially perfused with phosphate-buffered saline (PBS; 30–50 mL, room temperature) for 1–2 min, followed by 4% paraformaldehyde (PFA). Brains were post-fixed in 4% PFA for 24 h, cryoprotected in 30% sucrose in PBS for 48 h, and sagittal-sectioned using a Leica CM1510 cryostat (Leica Biosystems, Nussloch, Germany) for subsequent staining and imaging.

For molecular analyses, animals were euthanized by rapid decapitation without perfusion; the hippocampus was immediately dissected from fresh tissue, snap-frozen on dry ice, and preserved with RNAlater™ Solution (AM7020, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for RNA stabilization and storage at -80°C . All procedures were approved by the Bioethics Committee of the INB-UNAM (protocol code 057) and conducted in accordance with the Mexican Official Standard for the Use and Care of Laboratory Animals (NOM-062-ZOO-1999) and the National Research Council guidelines (NRC, 2010).

4.5. Immunohistochemistry

After 24 h in post-fixation in 4% PFA, the tissue was moved to a 30% (m/v) sucrose solution for 48 h for cryoprotection. Subsequently, a Leica CM1510 cryostat (Leica Biosystems, Nussloch, Germany) was used to freeze the tissue and cut it at a thickness of 40 μm . Four to five sections from the left or right hemisphere of each animal were selected according to the Paxinos and Franklin mouse brain atlas [61]. Hippocampal sections corresponding approximately to -1.34 to -2.30 mm relative to bregma were analyzed. Standardized anatomical regions corresponding to the CA1 and SUB hippocampal areas were evaluated. Images were acquired at $200\times$ magnification using identical acquisition parameters, and the full image field was used for subsequent analysis. For each animal, one image per region was acquired from 4 to 5 sections, and values obtained from the corresponding image fields were averaged to generate a single biological value per animal prior to statistical analysis, thereby avoiding pseudoreplication. Sections were then washed under free-floating conditions in 0.1 M PBS for 10 min and incubated in citrate buffer (pH = 6.0) at 80 – 100°C for 20 min to expose epitopes, followed by three 10 min washes in 0.1 M PBS (pH = 7.4) containing 0.05% Tween 20. Afterward, sections were incubated overnight with 0.1 M Iba1 antibody (1:500; ab107159, RRID: AB_10972670; Abcam, Cambridge, UK) while shaking at 4°C . The next day, immunolabeled brain sections were incubated with a biotinylated anti-goat secondary antibody (1:500; BA-9500, RRID: AB_2336123; Vector Laboratories, Newark, CA, USA) for 2 h, followed by a signal amplification step. Visualization was achieved using the diaminobenzidine-glucose oxidase method, as previously described [35]. For the amyloid antibody, we used 90% formic acid for 5 min, then washed quickly in distilled water, followed by three 10 min washes in 0.1 M PBS (pH 7.4) containing 0.05% Tween 20. Afterward, sections were incubated overnight with 0.1 M BAM10 (1:500; A3981, RRID: AB_1078153; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) while shaking at 4°C . The next day, immunolabeled brain sections were incubated with biotinylated anti-mouse secondary antibody (1:500; BA-2001-ZC1230, RRID: AB_2336180; Vector Laboratories, Newark, CA, USA) for 2 h. This was followed by an amplification signal step. For visualization, the diaminobenzidine-glucose oxidase method was used, as previously described. Additionally, we performed three 10 min washes in 0.1 M PBS (pH = 7.4) containing 0.05% Tween 20. The sections were mounted on slides in 0.05 M PBS, dehydrated in xylene, and subsequently covered with Entellan® (Merck, KGaA; Darmstadt, Germany).

4.6. Morphological Analysis

Photomicrographs of BAM10+ plaques and Iba1+ cells in the SUB and CA1 of the hippocampal formation were acquired using a Nikon Eclipse Ci-Li light microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) equipped with a Nikon Plan 40x/0.65 air lens ($n = 4$ animals per group) and the NIS-Elements Viewer software (Version 4.13.00, Nikon Corporation, Tokyo, Japan). Digital images were pre-processed under blinded conditions using Fiji/ImageJ software (version 1.53c; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; <https://imagej.net/ij> (accessed on 8 February 2026)), based on previous protocols [35,62]. Resulting binary images in TIFF format were analyzed using MorphoGlia, a computational tool for automated analysis and unbiased classification of microglial morphology.

The MorphoGlia pipeline is an unsupervised framework grounded in manifold learning. The pipeline employs recursive feature elimination to identify the most informative morphometric descriptors and reduce redundancy in the feature space. The selected features are subsequently embedded using Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP), which represents the data as a fuzzy topological graph while preserving both local and global relationships on a low-dimensional manifold. Finally, clustering is performed on 1740 microglial cells using Hierarchical Density-Based Spatial Clustering of Applications with Noise (HDBSCAN), a density-based approach capable of detecting clusters of variable shapes and sizes without requiring a predefined number of clusters [35].

For the UMAP parameters, nearest neighbors ($n_neighbors$) were set to 20, and the minimum distance between points (min_dist) = 0.05. For the HDBSCAN, minimum cluster size ($min_cluster_size$) = 30 and minimum cluster samples ($min_samples$) = 30. Color-coded cells were generated and mapped back onto the tissue microphotograph to visualize their spatial arrangement.

For the BAM10+ plaque analysis, digital micrographs were acquired under identical microscope settings and processed using Fiji/ImageJ software (version 1.53c; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; <https://imagej.net/ij> (accessed on 8 February 2026)) under blinded conditions. Images were converted to grayscale and subjected to color deconvolution to isolate the signal. A uniform Otsu threshold was set to lower = 0 and upper = 190, and applied across groups to define BAM10+ immunoreactivity. Plaques were quantified using the Analyze Particles function, excluding background artifacts by setting a minimum size (μm^2): >0–10,000 μm^2 and a circularity range of 0.20–1.00.

4.7. RNA Extraction and Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

Total RNA was extracted from brain tissue homogenized by maceration. To do so, the TRIzol[®] Reagent method (15596018, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was followed according to the manufacturer's instructions. TRIzol[®] Reagent (1 mL) was added for every 100 mg of sample, then the sample was incubated for 5 min at room temperature. Subsequently, 0.2 mL of chloroform was added for each milliliter of TRIzol[®] Reagent used. The aqueous phase was centrifuged and recovered in a new tube. Next, 0.5 mL of isopropanol was added for each milliliter of TRIzol[®] Reagent used, incubated for 10 min at room temperature, and then centrifuged. RNA purity and yield were determined by measuring the absorbance ratio at 260/280 nm in a NanoDrop[™] ND-2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). To perform total RNA electrophoresis, a 1.5% agarose gel was made and stained with SYBR green. The obtained RNA was used to carry out retrotranscription and cDNA was synthesized using the RevertAid[®] First Strand cDNA Synthesis Kit (K1621, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the supplier's instructions. The cDNA was stored at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis by polymerase chain reaction (PCR).

Amplification was performed using a StepOne® thermal cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and data were collected using StepOne Software v2.3™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). All primer sequences utilized to identify the fragments of the genes of interest were designed with a similar T_m (Table 1). Therefore, RT-qPCR conditions were as follows: final reaction volume of 10 µl; alignment temperature of 62 °C; a holding stage of 95 °C for 10 min; a cycling stage consisting of 40 cycles at 95 °C for 15 s, 62 °C for 40 s, and 72 °C for 10 s; a melting curve stage of 95 °C for 15 s, 60 °C for 1 min, and 95 °C for 15 s. Rpl27 (F: 5'-TGGCTGGAATTGACCGCTAT-3'; R: 5'-TTCAAAGCTGGGTCCCTGAA-3') and Rpl13A (F: 5'-GTGGAAGTACCAGGCAGTGA-3'; R: 5'-AGGAGTCCGTTGGTCTTGAG-3') were used as controls for normalization.

Table 1. Microglial activation and metabolism-related genes evaluated in the hippocampus of wild-type and 3xTg-AD mice treated with TPP or saline solution.

Gene	Codified Protein	Functions	Forward (F)/Reverse(R) Sequence
<i>Trem2</i>	TREM2	Involved in microglial activation, proliferation, migration, apoptosis, and expression of pro-inflammatory cytokines [10].	F: 5'-AAGTGAACACAGCACCTCC-3' R: 5'-AGGATCTGAAGTTGGTGCCC-3'
<i>Lgals3</i>	GAL3	Highly expressed in AD, mainly in the brain when damaged by reactive microglia; interacts with immune receptors like TREM2 [39].	F: 5'-TCCACTTTAACCCCGCTTC-3' R: 5'-AGTTGGCTGATTCCCGGAG-3'
v <i>Itgax</i>	Cd11c	Counteracts Aβ deposition via increased Aβ-uptake and degradation by microglia [63].	F: 5'-TCGGGTAGCATCAGTTCAC-3' R: 5'-TGTGTACCCTCTTAGCTGCC-3'
v <i>Il1b</i>	IL-1β	Mediates microglial activation and proliferation [64].	F: 5'-GTAATGAAAGACGGCACACCC-3' R: 5'-TCCTGACCACTGTTGTTCCC-3'
<i>Il6</i>	IL-6	Induces microglial activation, cell proliferation, and the production of microglia-derived pro-inflammatory molecules [65].	F: 5'-AGACAAAGCCAGAGTCCTTCAG-3' R: 5'-GAGCATTGGAAATTGGGGTAGG-3'.
<i>Tnf</i>	TNFα	Involved in chronic neuroinflammation mediated by microglia; regulates morphological changes and cytokine release, and controls the expression of neuroprotective factors [66].	F: 5'-AGTTCTATGGCCAGACCCT-3' R: 5'-ACAAGGTACAACCCATCGGC-3'.
<i>Nos2</i>	iNOS	It is Ca ²⁺ -independent and can be upregulated in response to TNF and IFNγ, or downregulated in response to IL-1β; involved in nitric oxide production [67].	F: 5'-CCCAGCCTTGCATCCTCATT-3' R: 5'-TCTCTTGC GGACCATCTCCT-3'.
v <i>Pdk1</i>	PDK1	Involved in facilitating the expression of inflammatory mediators and improving glucose uptake to support the glycolytic shift in reactive microglial phenotypes [19].	F: 5'-GGATTGCCCATATCACGCCT-3' R: 5'-TCATGTCTTTCGGCTCTCGG-3'.

4.8. Statistical Analysis

For behavioral analysis, there were 10 animals per group; for histological analyses, four to five animals per group; and for RT-qPCR analyses, three to four animals per group. Each animal served as a unit of analysis. For histology, two fields (SUB, CA1) and four to five sections per animal were quantified and averaged to produce a single value per animal. For RT-qPCR, three technical replicates were averaged per animal. Statistical analyses and graphical representations were performed using GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) and R version 4.4.0 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Data distribution was first assessed with the D'Agostino–Pearson omnibus test. Non-parametric data were expressed as median and interquartile range. Statistical significance was indicated only when differences were observed relative to the control group: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Nest-building behavior was analyzed using a Kruskal–Wallis test followed by Dunn's post hoc test for multiple group comparisons. For histological analyses, which included quantification of BAM10+ plaques and Iba1+ cells per mm² in the SUB and CA1 regions, we used the Mann–Whitney U test for comparisons between two groups and the Kruskal–Wallis test followed by Dunn's post hoc test for multiple-group comparisons. Microglial morphology was assessed using MorphoGlia [35], which integrates dimensionality reduction with UMAP and supervised clustering with HDBSCAN. Cluster frequencies across experimental groups and hippocampal subregions

were analyzed with Pearson's chi-square test, and standardized residuals and heatmaps were generated to visualize associations between clusters and experimental conditions. Finally, hippocampal gene expression profiles obtained from RT-qPCR were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method with the geometric mean of RPL13A and RPL27 as housekeeping genes [68]. Statistical comparisons were performed using the Kruskal–Wallis test followed by Dunn's *post hoc* test.

5. Limitations

Our study has several limitations. The small number of biological replicates per group ($n = 3\text{--}4$) limits statistical power and generalizability; therefore, findings should be interpreted with caution. Metabolic flux, enzymatic activity, and microglial functional responses were not directly assessed, and interpretations rely on transcriptional and morphological associations. Only female 3xTg-AD mice were included, and a single TPP dose and treatment duration were evaluated. Future studies incorporating larger cohorts, dose–response analyses, and functional approaches will be required to further define the role of thiamine-dependent pathways in neurodegenerative contexts.

6. Conclusions

In summary, this study describes region-specific hippocampal patterns involving microglial heterogeneity, amyloid burden, and thiamine-associated transcriptional profiles in 3xTg-AD female mice. While descriptive, these findings provide a framework for future investigations addressing metabolic regulation within AD-related neuroinflammatory contexts.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms27115022/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, N.J.P.-C., H.M.-O., G.Y.G.-S., and H.L.H.-M.; methodology, N.J.P.-C., G.Y.G.-S., H.M.-O., J.P.M.-A., and I.P.-P.; software, J.P.M.-A., H.M.-O., and I.P.-P.; validation, N.J.P.-C., H.M.-O., and S.Y.D.-M.; formal analysis, N.J.P.-C., J.P.M.-A., and H.M.-O.; investigation, N.J.P.-C., P.G.-S., and S.Y.D.-M.; resources, N.J.P.-C., P.G.-S., and S.Y.D.-M.; data curation, N.J.P.-C., H.M.-O., and S.Y.D.-M.; writing—original draft preparation, N.J.P.-C.; writing—review and editing, N.J.P.-C., H.M.-O., S.Y.D.-M., P.G.-S., and H.L.H.-M.; visualization, N.J.P.-C., H.M.-O., and G.Y.G.-S.; supervision, S.Y.D.-M., P.G.-S., and H.L.H.-M.; project administration, N.J.P.-C., P.G.-S., and S.Y.D.-M.; funding acquisition, N.J.P.-C., P.G.-S., and S.Y.D.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ) through FOPER projects 2021-FME02355 and 2022-FME02688. This work was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) and Programa de Posgrado en Psicología UNAM, México (PAPIIT IN-209325), Grant of Ciencia Básica y de Frontera 2025 SECIHTI (CBF-2025-G-35). Humberto Martínez received a Postdoctoral fellowship from SECIHTI (No. 2330239). Nelly Jovana Pastén received a grant from SECIHTI (No. CB-2020/764489). Juan Pablo Maya received a grant from SECIHTI (Programa de ayudantes de SNII III).

Institutional Review Board Statement: This protocol was carried out in accordance with standard No. 313 for the Presentation of Research Projects and Technical Reports in Health Care Institutions (FM-UAQ protocol code 12853, date of approval 28 October 2021). The animal study protocol was approved too by the Institutional Ethics Committees of Instituto de Neurobiología-UNAM Campus Juriquilla (protocol code 057, approved on 28 February 2013) and following the guidelines of the international standards for the care and use of laboratory animals established by the National Research Council (2010) and the Official Mexican Standard of the Ministry of Agriculture, Livestock, Rural Development, Fisheries and Food (SAGARPA) NOM-062 ZOO-1999 were followed, which establishes the measures for the care and use of laboratory animals for research or teaching purposes. We used the ARRIVE reporting guideline (1) to draft this manuscript, and the ARRIVE reporting

checklist (2) when editing, which is included in the Supplementary Information. Available from <https://resources.equator-network.org/reporting-guidelines/arrive/arrive-checklist.docx> (accessed on 8 February 2026).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All data generated or analyzed during this study are included in this published article. Supplemental Information can be found online. Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the lead contact, S.D.-C. (yoldi@unam.mx) or P.G.-S. (pablo.garcia@uaq.mx).

Acknowledgments: The authors would like to thank M.C. García Gutiérrez, A.G. Hernández Puga, A.A. Sánchez Tusie, A. Varela Echavarría, I. Vargas Rodríguez, A.R. Aguilar Vázquez, C. Lozano Flores, and D. Poblano Paez for their technical support. We also thank the staff of the INb technical units, including A. Castilla León, M. García Servín, and M.A. Carbajo Mata (Vivarium); E. de los Ríos Arellano and E.N. Hernández Ríos (Microscopy); A. González Gallardo (Proteogenomics); and D. Gasca Martínez (Behavioral Analysis).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. WHO Dementia. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> (accessed on 15 August 2025).
2. Blurton-Jones, M.; LaFerla, F.M. Pathways by Which A β Facilitates Tau Pathology. *Curr. Alzheimer Res.* **2006**, *3*, 437–448. [CrossRef]
3. Cole, L.; Kramer, P.R.; Henry, W.; Querfurth, H.W.; LaFerla, F.M. Mechanisms of Disease Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *362*, 329–344. [CrossRef]
4. Wu, H.; Wei, S.; Huang, Y.; Chen, L.; Wang, Y.; Wu, X.; Zhang, Z.; Pei, Y.; Wang, D. A β Monomer Induces Phosphorylation of Tau at Ser-214 through B2AR-PKA-JNK Signaling Pathway. *FASEB J.* **2020**, *34*, 5092–5105. [CrossRef]
5. Calsolaro, V.; Edison, P. Neuroinflammation in Alzheimer's Disease: Current Evidence and Future Directions. *Alzheimer's Dement.* **2016**, *12*, 719–732. [CrossRef] [PubMed]
6. Song, W.M.; Colonna, M. The Identity and Function of Microglia in Neurodegeneration. *Nat. Immunol.* **2018**, *19*, 1048–1058. [CrossRef]
7. Baligács, N.; Albertini, G.; Borrie, S.C.; Serneels, L.; Pridans, C.; Balusu, S.; De Strooper, B. Homeostatic Microglia Initially Seed and Activated Microglia Later Reshape Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease. *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 10634. [CrossRef]
8. Fruhwürth, S.; Zetterberg, H.; Paludan, S.R. Microglia and Amyloid Plaque Formation in Alzheimer's Disease—Evidence, Possible Mechanisms, and Future Challenges. *J. Neuroimmunol.* **2024**, *390*, 578342. [CrossRef] [PubMed]
9. Ulland, T.K.; Colonna, M. TREM2—A Key Player in Microglial Biology and Alzheimer Disease. *Nat. Rev. Neurol.* **2018**, *14*, 667–675. [CrossRef]
10. Ulland, T.K.; Song, W.M.; Huang, S.C.-C.; Ulrich, J.D.; Sergushichev, A.; Beatty, W.L.; Loboda, A.A.; Zhou, Y.; Cairns, N.J.; Kambal, A.; et al. TREM2 Maintains Microglial Metabolic Fitness in Alzheimer's Disease. *Cell* **2017**, *170*, 649–663. [CrossRef]
11. Shi, Q.; Chang, C.; Saliba, A.; Bhat, M.A. Microglial MTOR Activation Upregulates Trem2 and Enhances β -Amyloid Plaque Clearance in the 5XFAD Alzheimer's Disease Model. *J. Neurosci.* **2022**, *42*, 5294–5313. [CrossRef]
12. Valiukas, Z.; Tangelakis, K.; Apostolopoulos, V.; Feehan, J. Microglial Activation States and Their Implications for Alzheimer's Disease. *J. Prev. Alzheimers Dis.* **2025**, *12*, 100013. [CrossRef]
13. Franco-Bocanegra, D.K.; Gourari, Y.; McAuley, C.; Chatelet, D.S.; Johnston, D.A.; Nicoll, J.A.R.; Boche, D. Microglial Morphology in Alzheimer's Disease and after A β Immunotherapy. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 15955. [CrossRef]
14. Baik, S.H.; Kang, S.; Lee, W.; Choi, H.; Chung, S.; Kim, J., II; Mook-Jung, I. A Breakdown in Metabolic Reprogramming Causes Microglia Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Cell Metab.* **2019**, *30*, 493–507.e6. [CrossRef]
15. Boza-Serrano, A.; Ruiz, R.; Sanchez-Varo, R.; García-Revilla, J.; Yang, Y.; Jimenez-Ferrer, I.; Paulus, A.; Wennström, M.; Vilalta, A.; Allendorf, D.; et al. Galectin-3, a Novel Endogenous TREM2 Ligand, Detrimentally Regulates Inflammatory Response in Alzheimer's Disease. *Acta Neuropathol.* **2023**, *145*, 509–510, Correction in *Acta Neuropathol.* **2023**, *145*, 509–510. [CrossRef] [PubMed]
16. Venegas, C.; Heneka, M.T. Danger-Associated Molecular Patterns in Alzheimer's Disease. *J. Leukoc. Biol.* **2017**, *101*, 87–98. [CrossRef] [PubMed]

17. Keren-Shaul, H.; Spinrad, A.; Weiner, A.; Matcovitch-Natan, O.; Dvir-Szternfeld, R.; Ulland, T.K.; David, E.; Baruch, K.; Lara-Astaiso, D.; Toth, B.; et al. A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell* **2017**, *169*, 1276–1290.e17. [\[CrossRef\]](#)
18. Ye, X.; Chen, L.; Wang, H.; Peng, S.; Liu, M.; Yao, L.; Zhang, Y.; Shi, Y.S.; Cao, Y.; Yang, J.-J.; et al. Genetic Inhibition of PDK1 Robustly Reduces Plaque Deposition and Ameliorates Gliosis in the 5X-FAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2022**, *48*, e12839. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Zhou, M.; Qin, Z.; Zhu, X.; Ruan, Y.; Ling, H.; Li, C.; Gan, X. Pyruvate Dehydrogenase Kinases: Key Regulators of Cellular Metabolism and Therapeutic Targets for Metabolic Diseases. *J. Physiol. Biochem.* **2025**, *81*, 21–34. [\[CrossRef\]](#)
20. Szeleszczuk, Ł.; Pisklak, D.M.; Grodner, B. Thiamine and Thiamine Pyrophosphate as Non-Competitive Inhibitors of Acetylcholinesterase—Experimental and Theoretical Investigations. *Molecules* **2025**, *30*, 412. [\[CrossRef\]](#)
21. Butterworth, R.F. Thiamin Deficiency and Brain Disorders. *Nutr. Res. Rev.* **2003**, *16*, 277–284. [\[CrossRef\]](#)
22. Liu, H.; Sang, S.; Lu, Y.; Wang, Z.; Yu, X.; Zhong, C. Thiamine Metabolism Is Critical for Regulating Correlated Growth of Dendrite Arbors and Neuronal Somata. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 5342. [\[CrossRef\]](#)
23. Marcé-Grau, A.; Martí-Sánchez, L.; Baide-Mairena, H.; Ortigoza-Escobar, J.D.; Pérez-Dueñas, B. Genetic Defects of Thiamine Transport and Metabolism: A Review of Clinical Phenotypes, Genetics, and Functional Studies. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2019**, *42*, 581–597. [\[CrossRef\]](#)
24. Peterson, C.T.; Rodionov, D.A.; Osterman, A.L.; Peterson, S.N. B Vitamins and Their Role in Immune Regulation and Cancer. *Nutrients* **2020**, *12*, 3380. [\[CrossRef\]](#)
25. Gibson, G.E.; Blass, J.P. Thiamine-Dependent Processes and Treatment Strategies in Neurodegeneration. *Antioxid. Redox Signal.* **2007**, *9*, 1605–1620. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Pan, X.; Ren, Z.; Liang, W.; Dong, X.; Li, J.; Wang, L.; Bhatia, M.; Pan, L.-L.; Sun, J. Thiamine Deficiency Aggravates Experimental Colitis in Mice by Promoting Glycolytic Reprogramming in Macrophages. *Br. J. Pharmacol.* **2025**, *182*, 1897–1911. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Cheng, X.; Zhao, R.; Qiu, H.; Song, P.; Kou, L.; Sang, S.; Xia, Y.; Cai, W.; Jin, B.; Huang, Q.; et al. The Mechanism and Consequences of Amyloid- β Modulating Thiamine Pyrophosphokinase-1 Expression in Microglia. *bioRxiv* **2024**. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Bautista-Hernández, V.M.; López-Ascencio, R.; Del Toro-Equihua, M.; Vasquez, C. Effect of Thiamine Pyrophosphate on Levels of Serum Lactate, Maximum Oxygen Consumption and Heart Rate in Athletes Performing Aerobic Activity. *J. Int. Med. Res.* **2008**, *36*, 1220–1226. [\[CrossRef\]](#)
29. Tapias, V.; Jainuddin, S.; Ahuja, M.; Stack, C.; Elipenahli, C.; Vignisse, J.; Gerges, M.; Starkova, N.; Xu, H.; Starkov, A.A.; et al. Benfotiamine Treatment Activates the Nrf2/ARE Pathway and Is Neuroprotective in a Transgenic Mouse Model of Tauopathy. *Hum. Mol. Genet.* **2018**, *27*, 2874–2892. [\[CrossRef\]](#)
30. Gibson, G.E.; Feldman, H.H.; Zhang, S.; Flowers, S.A.; Luchsinger, J.A. Pharmacological Thiamine Levels as a Therapeutic Approach in Alzheimer's Disease. *Front. Med.* **2022**, *9*, 1033272.
31. Karuppagounder, S.S.; Xu, H.; Shi, Q.; Chen, L.H.; Pedrini, S.; Pechman, D.; Baker, H.; Beal, M.F.; Gandy, S.E.; Gibson, G.E. Thiamine Deficiency Induces Oxidative Stress and Exacerbates the Plaque Pathology in Alzheimer's Mouse Model. *Neurobiol. Aging* **2009**, *30*, 1587–1600.
32. Pan, X.; Gong, N.; Zhao, J.; Yu, Z.; Gu, F.; Chen, J.; Sun, X.; Zhao, L.; Yu, M.; Xu, Z.; et al. Powerful Beneficial Effects of Benfotiamine on Cognitive Impairment and β -Amyloid Deposition in Amyloid Precursor Protein/Presenilin-1 Transgenic Mice. *Brain* **2010**, *133*, 1342–1351. [\[CrossRef\]](#)
33. Dorninger, F.; Zeitler, G.; Berger, J. Nestlet Shredding and Nest Building Tests to Assess Features of Psychiatric Disorders in Mice. *Bio. Protoc.* **2020**, *10*, e3863. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Deacon, R. Assessing Burrowing, Nest Construction, and Hoarding in Mice. *J. Vis. Exp.* **2012**, 2607. [\[CrossRef\]](#)
35. Maya-Arteaga, J.P.; Martínez-Orozco, H.; Díaz-Cintra, S. MorphoGlia, an Interactive Method to Identify and Map Microglia Morphologies, Demonstrates Differences in Hippocampal Subregions of an Alzheimer's Disease Mouse Model. *Front. Cell. Neurosci.* **2024**, *18*, 1505048. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Cummings, J.L.; Zhou, Y.; Van Stone, A.; Cammann, D.; Tonegawa-Kuji, R.; Fonseca, J.; Cheng, F. Drug Repurposing for Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders. *Nat. Commun.* **2025**, *16*, 1755. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Bozic, I.; Lavrnja, I. Thiamine and Benfotiamine: Focus on Their Therapeutic Potential. *Heliyon* **2023**, *9*, e21839. [\[CrossRef\]](#)
38. Murabe, Y.; Sano, Y. Thiaminepyrophosphatase Activity in the Plasma Membrane of Microglia. *Histochemistry* **1981**, *71*, 45–52.
39. García-Revilla, J.; Boza-Serrano, A.; Espinosa-Oliva, A.M.; Soto, M.S.; Deierborg, T.; Ruiz, R.; de Pablos, R.M.; Burguillos, M.A.; Venero, J.L. Galectin-3, a Rising Star in Modulating Microglia Activation under Conditions of Neurodegeneration. *Cell Death Dis.* **2022**, *13*, 628. [\[CrossRef\]](#)
40. Gibson, G.E.; Luchsinger, J.A.; Cirio, R.; Chen, H.; Franchino-Elder, J.; Hirsch, J.A.; Bettendorff, L.; Chen, Z.; Flowers, S.A.; Gerber, L.M.; et al. Benfotiamine and Cognitive Decline in Alzheimer's Disease: Results of a Randomized Placebo-Controlled Phase IIa Clinical Trial. *J. Alzheimer's Dis.* **2020**, *78*, 989–1010. [\[CrossRef\]](#)

41. Lepiarz-Raba, I.; Gbadamosi, I.; Florea, R.; Paolicelli, R.C.; Jawaid, A. Metabolic Regulation of Microglial Phagocytosis: Implications for Alzheimer's Disease Therapeutics. *Transl. Neurodegener.* **2023**, *12*, 48. [\[CrossRef\]](#)
42. Sadeghdoust, M.; Das, A.; Kaushik, D.K. Fueling Neurodegeneration: Metabolic Insights into Microglia Functions. *J. Neuroinflamm.* **2024**, *21*, 300. [\[CrossRef\]](#)
43. Ke, Z.-J.; Degiorgio, L.A.; Volpe, B.T.; Gibson, G.E. Reversal of Thiamine Deficiency-Induced Neurodegeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2003**, *62*, 195–207. [\[CrossRef\]](#)
44. Belfiore, R.; Rodin, A.; Ferreira, E.; Velazquez, R.; Branca, C.; Caccamo, A.; Oddo, S. Temporal and Regional Progression of Alzheimer's Disease-like Pathology in 3xTg-AD Mice. *Aging Cell* **2019**, *18*, e12873. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Leyh, J.; Paeschke, S.; Mages, B.; Michalski, D.; Nowicki, M.; Bechmann, I.; Winter, K. Classification of Microglial Morphological Phenotypes Using Machine Learning. *Front. Cell. Neurosci.* **2021**, *15*, 701673. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. del Mar Fernández-Arjona, M.; Grondona, J.M.; Granados-Durán, P.; Fernández-Llebrez, P.; López-Ávalos, M.D. Microglia Morphological Categorization in a Rat Model of Neuroinflammation by Hierarchical Cluster and Principal Components Analysis. *Front. Cell. Neurosci.* **2017**, *11*, 235. [\[CrossRef\]](#)
47. Reddaway, J.; Richardson, P.E.; Bevan, R.J.; Stoneman, J.; Palombo, M. Microglial Morphometric Analysis: So Many Options, so Little Consistency. *Front. Neuroinform.* **2023**, *17*, 1211188. [\[CrossRef\]](#)
48. Javonillo, D.I.; Tran, K.M.; Phan, J.; Hingco, E.; Kramár, E.A.; da Cunha, C.; Forner, S.; Kawauchi, S.; Milinkeviciute, G.; Gomez-Arboledas, A.; et al. Systematic Phenotyping and Characterization of the 3xTg-AD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front. Neurosci.* **2022**, *15*, 785276. [\[CrossRef\]](#)
49. Oddo, S.; Caccamo, A.; Shepherd, J.D.; Murphy, M.P.; Golde, T.E.; Kaye, R.; Metherate, R.; Mattson, M.P.; Akbari, Y.; LaFerla, F.M. Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A β and Synaptic Dysfunction. *Neuron* **2003**, *39*, 409–421. Correction in *Neuron* **2024**, *114*, 1878. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2026.04.039>. [\[CrossRef\]](#)
50. Ana, B. Aged-Related Changes in Microglia and Neurodegenerative Diseases: Exploring the Connection. *Biomedicines* **2024**, *12*, 1737. [\[CrossRef\]](#)
51. Bernier, L.-P.; York, E.M.; Kamyabi, A.; Choi, H.B.; Weiling, N.L.; MacVicar, B.A. Microglial Metabolic Flexibility Supports Immune Surveillance of the Brain Parenchyma. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1559. [\[CrossRef\]](#)
52. Bozic, I.; Savic, D.; Laketa, D.; Bjelobaba, I.; Milenkovic, I.; Pekovic, S.; Nedeljkovic, N.; Lavrnja, I. Benfotiamine Attenuates Inflammatory Response in LPS Stimulated BV-2 Microglia. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0118372. [\[CrossRef\]](#)
53. Xia, Y.; Qian, T.; Fei, G.; Cheng, X.; Zhao, L.; Sang, S.; Zhong, C. Low Expression of Thiamine Pyrophosphokinase-1 Contributes to Brain Susceptibility to Thiamine Deficiency. *Neuroreport* **2024**, *35*, 1000–1009. [\[CrossRef\]](#)
54. Barber, A.J.; Del Genio, C.L.; Swain, A.B.; Pizzi, E.M.; Watson, S.C.; Tapiavala, V.N.; Zanazzi, G.J.; Gaur, A.B. Age, Sex and Alzheimer's Disease: A Longitudinal Study of 3xTg-AD Mice Reveals Sex-Specific Disease Trajectories and Inflammatory Responses Mirrored in Postmortem Brains from Alzheimer's Patients. *Alzheimers Res. Ther.* **2024**, *16*, 134. [\[CrossRef\]](#)
55. Christensen, A.; Pike, C.J. Age-Dependent Regulation of Obesity and Alzheimer-Related Outcomes by Hormone Therapy in Female 3xTg-AD Mice. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0178490. [\[CrossRef\]](#)
56. Oddo, S.; Caccamo, A.; Kitazawa, M.; Tseng, B.P.; LaFerla, F.M. Amyloid Deposition Precedes Tangle Formation in a Triple Transgenic Model of Alzheimer's Disease. *Neurobiol. Aging* **2003**, *24*, 1063–1070. [\[CrossRef\]](#)
57. Roda, A.R.; Esquerda-Canals, G.; Martí-Clúa, J.; Villegas, S. Cognitive Impairment in the 3xTg-AD Mouse Model of Alzheimer's Disease Is Affected by A β Immunotherapy and Cognitive Stimulation. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 944. [\[CrossRef\]](#)
58. Byers, S.L.; Wiles, M.V.; Dunn, S.L.; Taft, R.A. Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e35538. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Hernández-Montiel, H.L.; Lopez, V.; González-Loyola, J.G.; Vega-Anaya, G.C.; Villagrán-Herrera, M.E.; Gallegos-Corona, M.A.; Saldaña, C.; Ramos Gómez, M.; García Horshman, P.; García Solís, P.; et al. Chronic Administration of Thiamine Pyrophosphate Decreases Age-Related Histological Atrophic Testicular Changes and Improves Sexual Behavior in Male Wistar Rats. *Histol. Histopathol.* **2014**, *29*, 785–795. [\[PubMed\]](#)
60. Marzolla, V.; Armani, A.; Mammi, C.; Feraco, A.; Caprio, M. Induction of Atherosclerotic Plaques through Activation of Mineralocorticoid Receptors in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *J. Vis. Exp.* **2018**, 58303. [\[CrossRef\]](#)
61. Paxinos, G.; Franklin, K.B.J. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*; Academic Press: Oxford, UK, 2001; Volume 200.
62. Young, K.; Morrison, H. Quantifying Microglia Morphology from Photomicrographs of Immunohistochemistry Prepared Tissue Using ImageJ. *J. Vis. Exp.* **2018**, 57648. [\[CrossRef\]](#)
63. Kamphuis, W.; Kooijman, L.; Schetters, S.; Orre, M.; Hol, E.M. Transcriptional Profiling of CD11c-Positive Microglia Accumulating around Amyloid Plaques in a Mouse Model for Alzheimer's Disease. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)—Mol. Basis Dis.* **2016**, *1862*, 1847–1860. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Monif, M.; Reid, C.A.; Powell, K.L.; Drummond, K.J.; O'Brien, T.J.; Williams, D.A. Interleukin-1 β Has Trophic Effects in Microglia and Its Release Is Mediated by P2X7R Pore. *J. Neuroinflamm.* **2016**, *13*, 173. [\[CrossRef\]](#)

65. Recasens, M.; Almolda, B.; Pérez-Clausell, J.; Campbell, I.L.; González, B.; Castellano, B. Chronic Exposure to IL-6 Induces a Desensitized Phenotype of the Microglia. *J. Neuroinflamm.* **2021**, *18*, 31.
66. Raffaele, S.; Lombardi, M.; Verderio, C.; Fumagalli, M. TNF Production and Release from Microglia via Extracellular Vesicles: Impact on Brain Functions. *Cells* **2020**, *9*, 2145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Maksoud, M.J.E.; Tellios, V.; An, D.; Xiang, Y.-Y.; Lu, W.-Y. Nitric Oxide Upregulates Microglia Phagocytosis and Increases Transient Receptor Potential Vanilloid Type 2 Channel Expression on the Plasma Membrane. *Glia* **2019**, *67*, 2294–2311. [[CrossRef](#)]
68. Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. Accurate Normalization of Real-Time Quantitative RT-PCR Data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes. *Genome Biol.* **2002**, *3*, research0034.1. [[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.