

**INFLUJO DE FACTORES CONVERGENTES (BACE1, SCD1) SOBRE LA
COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE FOSFOLÍPIDOS EN EVENTOS
DEGENERATIVOS POR ISQUEMIA CEREBRAL *IN VIVO* Y TOXICIDAD POR
GLUTAMATO *IN VITRO***

POR:

FERLEY ALEJANDRO BEDOYA GUZMÁN

CORPORACIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

MEDELLÍN

2022

**INFLUJO DE FACTORES CONVERGENTES (BACE1, SCD1) SOBRE LA
COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE FOSFOLÍPIDOS EN EVENTOS
DEGENERATIVOS POR ISQUEMIA CEREBRAL *IN VIVO* Y TOXICIDAD POR
GLUTAMATO *IN VITRO***

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

**(Para obtener el grado de Magister en Ciencias Básicas Biomédicas con énfasis en
Neurociencias)**

Por:

FERLEY ALEJANDRO BEDOYA GUZMÁN

Gloria Patricia Cardona Gómez Ph.D. (Tutora)

Rafael Andrés Posada Duque Ph.D. (Co-tutor)

Comité tutorial:

Johanna Gutierrez Vargas Ph.D.

Norman Balcazar Morales Ph.D.

Carlos Andrés Villegas Lanau Ph.D

CORPORACIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

MEDELLÍN

2022

...

A través de este proyecto espero aportar a la búsqueda de la resolución o disminución del impacto de un problema de salud pública, por medio de evidencia científica que permita direccionar a los investigadores y clínicos hacia la toma de decisiones correctas.

Alejandro Bedoya.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi madre por el amor que me ha entregado, sin él no tendría la fuerza suficiente para continuar. Le agradezco por ser la mujer más perseverante sobre la faz de la tierra y por seguir guardando la esperanza en mí de tener una vida mejor.

A mis compañeros de laboratorio Lina y Lucho por apoyarme en la realización de varios experimentos.

A mi compañero Pablo por su explicación en el manejo del software para la cuantificación de imágenes.

A Claudia, por estar siempre presta de la mejor manera a colaborar con todo lo necesario para avanzar con mis experimentos.

A Natalia Martínez que me impulsó en el primer semestre a escribir, entregándome los mejores consejos y guiándome para plasmar mis ideas de una forma adecuada.

A mi comité tutorial, el profesor Rafael que en varias ocasiones me llenó de consejos y me dijo en cierta ocasión: “ya pasó lo malo, ahora espera lo bueno”, muchas gracias por esas palabras. Al profesor Norman que me dió fuerte en el primer seminario, pero que me hizo sentir al final, que he logrado crecer académicamente. A la profesora Johanna que siempre me motivó al mencionar lo bien que estaba avanzando en la maestría. Al profesor Carlos Andrés por creer en que los objetivos logrados pueden tener un buen impacto científico. Y al profesor Herman que lastimosamente ya no está acompañándonos en esta vida, pero que en su momento me llenó de fuerzas y de aliento con sus palabras.

A mi novia Laura Camila, infinitas gracias por creer en mis capacidades y alentarme a seguir batallando.

A mis hijos Luciana y Maximiliano, por estar siempre conmigo a pesar de las dificultades, y darme la energía necesaria para continuar.

Y finalmente, a mi profesora Gloria Patricia, una de las personas que más admiro. Le agradezco en el alma haber depositado su confianza en mí, y creer que alguien un tanto desesperanzado podría sacar adelante este difícil proyecto. A ella definitivamente, MIL GRACIAS.

Contenido	
Lista de abreviaciones	8
Lista de figuras	10
Lista de anexos	11
1. ABSTRACT:	12
1. RESUMEN	14
2. MARCO TEÓRICO	16
2.1 Demencia	16
2.1.1 Demencia post infarto cerebral:	16
2.2 Neurodegeneración:	19
2.3 Unidad neurovascular:	21
2.3.1 Barrera hematoencefálica:	22
2.3.2 Endotelio:	23
2.3.3 Astrocito:	26
2.3.4. Neurona:	30
2.4. LÍPIDOS	33
2.4.1 Colesterol	34
2.4.2 Esfingolípidos	35
2.4.3 Fosfolípidos	37
2.4.4 Lípidos y neurodegeneración:	38
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:	42
4. HIPÓTESIS:	43
5. OBJETIVOS:	43
5.1 Objetivo general:	43
5.2 Objetivos específicos:	43
6. MATERIALES Y MÉTODOS:	44
6.1 Análisis de lípidos	45
6.1.1 Análisis de lípidos de muestras de animales y cultivos celulares:	48

6.1.2 Espectrometría de masas	48
6.2 Cultivos celulares.....	49
6.2.1 Cultivo primario de astrocitos.....	49
6.2.2 Cultivo de línea celular endotelial bEnd.3	49
6.2.3 Cultivo primario de neuronas	50
6.2.4 Cocultivo de astrocitos y endotelio.....	50
6.2.5 Cocultivo de astrocitos y neuronas	51
6.2.6 Tratamientos con inhibidores de BACE1 y SCD1 <i>in vitro</i> e inducción de toxicidad con glutamato	51
6.2.7 Evaluación de citotoxicidad por liberación de LDH	52
6.2.8 Inmunofluorescencia <i>in vitro</i>	52
6.2.9 Análisis morfológico	53
6.3 Análisis estadístico.....	54
7. RESULTADOS:	55
7.1 El doble silenciamiento de BACE1-SCD1 induce cambios en el perfil fosfolipídico del hipocampo asociado a ácido araquidónico y ácidos grasos saturados:	56
7.2 El doble silenciamiento de BACE1-SCD1 generó cambios en el perfil fosfolipídico del líquido cefalorraquídeo, principalmente en PLs asociados a PUFAs y ácidos grasos saturados:	58
7.3 El doble silenciamiento de BACE1-SCD1 produjo cambios en el perfil lipídico del suero, principalmente en LPC con monoinsaturaciones:.....	60
7.4 El doble silenciamiento de BACE1-SCD1 generó un efecto inverso sobre el porcentaje molar de LPC y PC y un aumento en LPC de 16C y 18C:	61
7.5 El doble silenciamiento de BACE1-SCD1 produjo un aumento significativo en el porcentaje molar de ácidos grasos saturados asociados a LPC y una reducción de ácido araquidónico asociado a PC en suero.	62
.....	64
7.6 El astrocito inhibido para SCD1 y BACE1-SCD1 cambia el patrón de distribución de SCD1 y reduce la reactividad astrocitaria asociados a la protección de la neurona bajo la excitotoxicidad por glutamato:.....	64

7.7 El astrocito inhibido para SCD1 y BACE1-SCD1 protege a la neurona bajo la excitotoxicidad por glutamato:	67
7.8 La inhibición de BACE1, SCD1 y BACE1-SCD1 reduce la reactividad astrocitaria, reduce la IF y cambia el patrón de distribución de SCD1 asociados a la protección del endotelio bajo la toxicidad por glutamato:	69
7.9 El astrocito inhibido para SCD1 y BACE1-SCD1 reduce la presencia de SCD1 en endotelio y reestablece la integridad de las uniones estrechas perdidas bajo la toxicidad por glutamato:	72
7.10 La inhibición de BACE1-SCD1 en el astrocito, revierte el balance entre LPC y PC en la neurona y en el endotelio tras la toxicidad por glutamato:	74
8. DISCUSIÓN:	76
9. CONCLUSIÓN:	83
10. PERSPECTIVAS:	84
11. BIBLIOGRAFÍA	85
12. ANEXOS	114
Anexos finales:	115

Lista de abreviaciones

APP	Proteína precursora amiloide
BACE1	Beta-secretasa
3xTg-AD	Ratón triple transgénico para la enfermedad de Alzheimer
p-Tau	Fosfo-Tau
SCD1	Stearoyl Coenzima A Desaturasa 1
LCR	Líquido ceforraquideo
LPC	Liso-fosfatidilcolina
PC	Fosfatidilcolina
EA	Enfermedad de Alzheimer
NFT	Ovillos neurofibrilares
ACV	Accidente cerebrovascular
IC	Isquemia cerebral
IL	Interleuquina
TGF- β	Factor de crecimiento tumoral beta
SNC	Sistema Nervioso Central
GLT	Transportador de glutamato
ROS	Radicales libres del oxígeno
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos
BHE	Barrera hematoencefalica
MMPs	Metaloproteinasas
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
ZO	Zonula Occludens
VCAM	Moléculas de adhesión al endotelio vascular
ICAM	Moléculas de adhesión intercelular
ATP	Adenosina de trifosfato
GABA	Ácido gamma amino butírico
DHA	Ácido docohexaenoico
AA	Ácido araquidonico
ApoE	Apolipoproteína E
CHO	Colesterol
ABCA	Cassette transportador de unión a ATP
BL	Balsa lipídica
PSN	Presenilina
PS	Fosfatidil serina

PE	Fosfatidil etanolamina
PI	Fosfatidil inositol
MUFA	Ácido graso monoinsaturado
PUFA	Ácido graso poli-insaturado
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
LDH	Lactato deshidrogenasa

Lista de figuras

- Figura 1 Isquemia y consecuencia en el parénquima cerebral
- Figura 2 Dinámica en la unidad neurovascular
- Figura 3 Fosfolípidos, balsas lipídicas y producción de péptidos tóxicos
- Figura 4 Flujograma de la metodología
-
- Figura 5 PLS-DA de especies fosfolipídicas en hipocampo sometido al silenciamiento de SCD1 y BACE1 en un modelo de isquemia cerebral en ratas.
- Figura 6 PLS-DA de especies fosfolipídicas en LCR sometido al silenciamiento de BACE1 y SCD1 en un modelo de isquemia cerebral en ratas
- Figura 7 PLS-DA de especies fosfolipídicas en suero sometido al silenciamiento de BACE1 y SCD1 en un modelo de isquemia cerebral en ratas.
- Figura 8 Porcentaje molar de familias fosfolipídicas y %mol según el número de carbonos de PLs en el suero de ratas isquémicas tratadas con silenciamiento de BACE1 y SCD1
- Figura 9 Porcentaje molar de familias fosfolipídicas según el número de insaturaciones en el suero de ratas isquémicas tratadas con silenciamiento de BACE1 y SCD1
- Figura 10 Porcentaje molar de especies de LPC y PC en suero de ratas sham e isquémicas
- Figura 11 Astrocitos inhibidos para BACE1-SCD1 y cocultivados con neuronas expuestos a estrés por glutamato hippocampus after cerebral ischemia
- Figura 12 Neuronas expuestas a estrés por glutamato, cocultivadas con astrocitos inhibidos para BACE1 y SCD1 expuestos
- Figura 13 Astrocitos inhibidos para BACE1-SCD1 y cocultivados con endotelio expuestos a estrés por glutamato
- Figura 14 Endotelio cocultivado con Astrocitos inhibidos para BACE1-SCD1, y expuestos a estrés por glutamato
- Figura 15 Porcentaje molar de familias fosfolipídicas en astrocitos, neuronas y endotelio
- Figura 16 Esquema final propuesto

Lista de anexos

Anexo 1 Representación de la proyección de fosfolípidos con mayor discriminación según PLS--DA

Anexos finales

1. ABSTRACT:

The homeostasis of the Central Nervous System (CNS) is based on the interaction of neurons, astrocytes and endothelium, which together, are the foundation of the Neurovascular Unit (NVU). Mainly, the astrocyte regulates the interaction of lipid components within the NVU, such as cholesterol and sphingolipids, which allows the assembly of membranous compartments known as lipid rafts, where the overactivity of the enzyme β -secretase (BACE1) on the amyloid precursor protein (APP) is favored, generating toxic peptides that disrupt intercellular communication and propitiate an inflammatory environment mediated mainly by the astrocyte, which is consequent with neuronal death and the dementia.

In a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease (3xTg-AD), BACE1 silencing recovered from cognitive impairment associated with restoration of lipid balance. In primary cultured neurons under glutamate stress, this silencing required the involvement of SCD1 monounsaturase to reduce markers of inflammation such as hyperphosphorylated Tau. In human brain samples with different types of dementia: vascular (CADASIL) and Alzheimer's type (familial and sporadic) BACE1 and SCD1 were overexpressed. Furthermore, hippocampal double silencing of these two enzymes resulted in the recovery of motor and spatial memory capacity in an *in vivo* cerebral infarction model.

Therefore, in the present study we hypothesize that the astrocyte inhibited for the BACE1 and SCD1, can recover neurons and endothelium after a toxic event by glutamate, whose mechanism could be explained by the modification of the lipid profile in the neurovascular unit and the decrease of the cellular origin of the inflammatory process. This opens a possibility for the design of therapies in early stages of the disease. In this sense, the main objective of our research is: To determine the relationship of BACE1 and SCD1 on the differential profile of phospholipids in astrocytes, neurons and endothelium. As a methodological approach, using hippocampal, cerebrospinal fluid (CSF) and serum samples obtained from an ischemic stroke model in rats evaluated at the level of learning, memory and motor capacity, we performed an analysis of the differences in the lipid profile after silencing of BACE1 and SCD1 at the hippocampal level.

Also, we inhibited BACE1 and SCD1 in astrocytes exposed in cocultures with endothelium and neurons exposed to glutamate stress to induce neural degeneration processes. In addition, on these cocultures we performed LDH cytotoxicity assay, fluorescence microscopy to observe morphological and expression pattern changes of the enzymes of interest; which was complemented with the analysis by mass spectrometry to identify the phospholipid profile and composition of each cell type.

We have observed that the double silencing of BACE1 and SCD1 in the *in vivo* ischemic model induces a significant change in the lipid profile of the hippocampus, CSF and serum, especially in phospholipid species associated with arachidonic acid. The results obtained in serum suggest that the cognitive recovery of animals under the ischemic event and after double silencing may be associated with the degradation or non-incorporation of fatty acids composed of arachidonic derivatives to phosphatidylcholine (PC) and the increase of its metabolic product lysophosphatidylcholine (LPC) composed of palmitic (16:0) and stearic (18:0) acid in blood circulation.

Neurons and endothelial cells affected under a toxic glutamate event can recover when cocultured with astrocytes inhibited for BACE1 and SCD1, whose explanation may be associated with an inverse relationship between LPC/PC in a differential manner among astrocytes, endothelium and neurons, presenting a reduction of LPC in the neuron and an increase in astrocytes and endothelial cells. Together, the above data suggest astrocyte BACE1 and SCD1 enzymes as therapeutic target that regulates brain parenchymal homeostasis producing changes in the dynamics between LPC and PC at the brain and circulation.

Keywords: Neurovascular unit, BACE1, SCD1, Dementia, Alzheimer disease, cerebral ischemia, lipids.

1. RESUMEN

La homeostasis del sistema nervioso central se basa en la interacción de neuronas, astrocitos y endotelio, que, en conjunto, son el fundamento de la unidad neurovascular (UNV). Principalmente, el astrocito regula la interacción de componentes lipídicos dentro de la UNV, como el colesterol y los esfingolípidos, los cuales permiten el ensamblaje de compartimentos membranosos conocidos como balsas lipídicas, donde se favorece la sobreactividad de la enzima β -secretasa (BACE1) sobre la proteína precursora amiloide (APP), generando péptidos tóxicos que interrumpen la comunicación intercelular y propician un ambiente inflamatorio mediado principalmente por el astrocito, lo que es consecuente con la muerte neuronal y la demencia.

En un modelo de ratón triple transgénico de la enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD), el silenciamiento de BACE1 recuperó el deterioro cognitivo asociado al restablecimiento del equilibrio lipídico. En neuronas primarias cultivadas bajo estrés por glutamato, este silenciamiento requirió la participación de la monosaturasa SCD1 para reducir marcadores de inflamación como la proteína Tau hiperfosforilada (p-Tau). En muestras de cerebro humano con diferentes tipos de demencia: vascular (CADASIL) y de tipo Alzheimer (familiar y esporádica) BACE1 y SCD1 estaban sobreexpresados. Además, el doble silenciamiento de estas dos enzimas en el hipocampo permitió recuperar la capacidad motora y de memoria espacial en un modelo *in vivo* de infarto cerebral. A partir de lo anterior, en el presente estudio hipotetizamos que el astrocito inhibido para BACE1 y SCD1, puede recuperar a neuronas y endotelio tras un evento tóxico por glutamato, cuyo mecanismo podría estar asociado a la modificación del perfil lipídico en la unidad neurovascular, abriendo una posibilidad al diseño de terapias en etapas tempranas de la enfermedad. En este sentido, el objetivo principal de nuestra investigación es: Determinar la relación de BACE1 y SCD1 sobre el perfil diferencial de fosfolípidos en Astrocitos, Neuronas y Endotelio.

Cómo aproximación metodológica, a partir de muestras de hipocampo, LCR y suero obtenidos de un modelo de infarto cerebral isquémico en ratas evaluado a nivel de aprendizaje, memoria y capacidad motora, realizamos un análisis de las diferencias en el perfil lipídico luego del silenciamiento de BACE1 y SCD1 a nivel hipocampal.

También, inhibimos BACE1 y SCD1 en astrocitos expuestos en cocultivos con endotelio y neuronas, sometidos a estrés por glutamato para inducir procesos de degeneración neural. Además, sobre estos cocultivos realizamos prueba colorimétrica de muerte celular por LDH, microscopía de fluorescencia para observar cambios morfológicos y cambios en el patrón de expresión de enzimas de interés; lo que fue complementado con el análisis por espectrometría de masas para identificar el perfil y composición de fosfolípidos en cada tipo celular.

Hemos observado que el doble silenciamiento de BACE1 y SCD1 en el modelo *in vivo* isquémico, induce un cambio significativo en el perfil lipídico de hipocampo, LCR y suero, en especial, en especies fosfolipídicas asociadas a ácido araquidónico. Los resultados obtenidos en suero, sugieren que la recuperación cognitiva de los animales bajo el evento isquémico y tras el doble silenciamiento, puede estar asociada a la degradación o no incorporación de ácidos grasos compuestos por derivados araquidónicos a la fosfatidil colina (PC) y al aumento de su producto metabólico lisofosfatidil colina (LPC) compuesto por ácido palmítico (16:0) y esteárico (18:0) en circulación.

Las neuronas y las células endoteliales afectadas bajo un evento tóxico por glutamato pueden recuperarse cuando se cocultivan con astrocitos inhibidos para BACE1 y SCD1, cuya explicación puede estar asociada a una relación inversa entre LPC/PC de manera diferencial entre astrocito, endotelio y neuronas, presentando una reducción de LPC en la neurona y a su aumento en las células astrocitarias y en las endoteliales. En conjunto, todo lo anterior sugiere a las enzimas BACE1 y SCD1 en astrocitos como un blanco terapéutico que regula la homeostásis del parénquima cerebral que conlleva a cambios en la dinámica entre LPC y PC en el cerebro y en circulación.

Palabras clave: Unidad neurovascular, BACE1, SCD1, Demencia, enfermedad de Alzheimer, isquemia cerebral, lípidos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Demencia

La demencia es considerada un síndrome con declive progresivo en la capacidad cognitiva de las personas, con una pérdida de la independencia para realizar las tareas cotidianas (Gale, S. A, 2018). Se estima que alrededor del mundo su prevalencia se encuentra por encima de los 45 millones de personas afectadas, de las cuales, más de la mitad pertenecen a países de escasos recursos (Crous-Bou M, et al, 2017). El cuadro clínico es más frecuente en personas mayores de 65 años, lo que se considera demencia de inicio tardío, sin embargo, un 1 % de los casos se manifiesta por debajo de esta edad, considerados como demencia de inicio temprano (Prince M, et al, 2015-2017). Y a pesar de que el envejecimiento es un factor de riesgo determinante, un estilo de vida saludable puede evitar su aparición (OMS, 2019).

La demencia más común es la enfermedad de Alzheimer (EA), que, de acuerdo a sus características neuropatológicas, se destacan la acumulación de placas β -amiloide ($A\beta$) y ovillos neurofibrilares (NFT) constituidos de proteína Tau hiperfosforilada (p-Tau) generando desensamble de los microtúbulos. Otras demencias comunes son la demencia con cuerpos de Lewy (DLB), donde hay una acumulación anormal de la proteína α -sinucleína que forma los llamados cuerpos de Lewy y la atrofia cerebral posterior; la demencia frontotemporal (FTD), también presenta inclusiones de p-Tau principalmente en la corteza frontal; y la demencia vascular (VaD) que se caracteriza por la reducción de la circulación sanguínea, hipoxia y aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Raz L, et al, 2016). No obstante, a pesar de las diferentes características neuropatológicas, todas estas patologías comparten la afección cerebrovascular como factor común (Iadecola, C., et al, 2019; Arvanitakis, Z., et al, 2019; Vipin, A., et al, 2021; Seo, S. W., et al, 2018; Fieldhouse, J., et al, 2021; Thal, D. R., et al, 2012).

2.1.1 Demencia post infarto cerebral:

El infarto cerebral isquémico surge de la reducción del fluido sanguíneo hacia el cerebro. Cada año la isquemia cerebral (IC) afecta alrededor de 700.000 personas tan solo en los Estados Unidos, y en los países en desarrollo, la IC es la tercera causa de muerte generando

costos de billones de dólares al sistema de salud (Benjamin, E. J., et al, 2019). La IC causa reducción en la capacidad cognitiva, y de acuerdo a los diferentes factores clínicos de base en cada persona afectada, la susceptibilidad al deterioro cognitivo puede ser de menor o de mayor impacto (Pendlebury, S. T., et al, 2019). Los accidentes cerebrovasculares (ACV) pueden ser de tipo hemorrágico o de tipo isquémico, teniendo los segundos una prevalencia de más del 80% de los casos (Rosamond, W., et al, 2007); estos aumentan la incidencia de demencia 50 veces más respecto a la población general, mientras que ataques isquémicos transitorios y accidentes cerebrovasculares menores tienen un menor riesgo de deterioro cognitivo, por lo que, del grado de la lesión tras el infarto cerebral, depende el riesgo de padecer demencia (Pendlebury, S. T., et al, 2019).

La causa de la IC pueden ser trombosis, embolias y la hipoperfusión sanguínea, que impiden al tejido cerebral recibir oxígeno y glucosa suficiente para mantenerse en homeostasis (Benjamin, E. J., et al, 2019). Esto despliega una respuesta inflamatoria por parte de células circulantes como monocitos y neutrófilos que son atraídos por la producción de interleuquinas 1 y 6 (IL-1, IL-6) y el factor de crecimiento tumoral beta (TGF- β) por parte de células endoteliales, glia y neuronas inestables (Doyle, K. P., et al, 2008). Finalmente, el tejido afectado comienza a reducir la población neuronal a través de dos mecanismos de muerte celular que dependen de la ubicación en el foco o en la penumbra de la lesión. En el primero, la carencia de oxígeno y glucosa es tal, que impide a las bombas ATPasas recibir energía para mantener el equilibrio iónico, la acumulación de Ca^{++} intracelular dispara la actividad de enzimas ADNasas, lipasas y proteasas que catabolizan las macroestructuras celulares con la consecuente necrosis del tejido; mientras que las células ubicadas en la penumbra de la lesión tienen una mayor resistencia gracias a la reperfusión sanguínea aportada por los vasos circundantes, pero a pesar de ello, muchas entran en muerte celular por apoptosis (Doyle, K. P., et al, 2008) (Figura 1). Bajo estas circunstancias de elevación de Ca^{++} intracelular, las neuronas liberan glutamato, el principal neurotransmisor excitatorio dentro del SNC (Allen, P., et al, 2015), y, además, bajo la IC, los astrocitos sufren edema y activan canales que también liberan de manera masiva este neurotransmisor (Mongin A. A. et al 2016) (Figura 1B). Tras estos eventos, la neurona sufre una sobre activación de los receptores de glutamato, cuya sobre-excitabilidad termina en la programación de la muerte neuronal por excitotoxicidad (Fiacco, T. A., et al, 2007), a causa de la liberación de radicales

libres de mitocondrias dañadas y la inhibición de fosfolipasas específicas de fosfatidilcolina (PC) (Tymianski M., et al, 1996; Li Y., et al, 1998). En este sentido, el glutamato en exceso pasa de ejercer su rol como neurotransmisor para ser un elemento tóxico dentro del cerebro jugando un papel importante dentro de las enfermedades neurodegenerativas (Lewerenz J., et al, 2015; Zhou Y., et al, 2014). Por otro lado, el glutamato utilizado por el SNC es sintetizado dentro de este tejido porque el glutamato circulante no puede atravesar las barreras que limitan el sistema nervioso del torrente sanguíneo, por lo cual, perder esta integridad puede recargar el parénquima cerebral con un exceso de glutamato aportado desde la circulación (Cooper A.J., et al, 2016). De hecho, la pérdida del balance entre la producción de glutamato por parte de la microbiota intestinal, el hígado y el cerebro, repercute sobre su carga en el SNC, desde lo cual ha sido posible relacionar la asociación de estos sistemas con el desarrollo de alteraciones neurológicas (Onaolapo, A. Y., & Onaolapo, O. J. 2021).

En condiciones normales, la concentración de glutamato cerebral a nivel extracelular se encuentra en un rango de 25 a 90 nM, mientras que a nivel intracelular puede alcanzar los 90.2 μ M (Herman M.A., et al, 2007; De Bundel D., et al, 2011). Las elevaciones por encima de estos valores también pueden ser explicadas por la carencia de niveles adecuados de receptores celulares de glutamato como el transportador de glutamato-1 (GLT-1) en astrocitos, o la pérdida en el equilibrio de la interconversión molecular del glutamato con sus precursores y derivados, la glutamina y el neurotransmisor ácido-gama-amino-butírico (GABA), respectivamente, cuyo desbalance se ha observado en modelos animales de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y la esclerosis lateral amiotrófica (Martinez-Lozada Z., et al, 2016; Mazaud D., et al, 2019).

neurodegeneración. Sucede con el fallo de algunos procesos celulares, como los mecanismos de aclaramiento a través del sistema de autofagia y el sistema proteasoma dependiente de ubiquitina, además de otros desencadenantes como el estrés oxidativo, la neuroinflamación y la muerte celular programada (Dugger BN, et al, 2017). El sistema de autofagia se encarga de la degradación de restos de organelas estropeadas y agregados de proteínas, lo cual es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis celular (Mariño G, et al, 2011). Sin embargo, este mecanismo puede verse alterado por fallas en la expresión de factores de transcripción, lo que impide la activación de genes necesarios para la regulación del proceso (Schäffner I, et al, 2018). De manera similar, el sistema proteasoma dependiente de ubiquitina se encarga de la degradación de proteínas defectuosas o mal plegadas, estas características hacen que las proteínas se marquen con ramificaciones de ubiquitina, que eventualmente conducirán las moléculas a su degradación en el complejo proteasoma; alteraciones en este sistema disminuyen la degradación de proteínas tóxicas y en consecuencia aumentan la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Yau R, et al, 2017). Por su parte, el estrés oxidativo se presenta por la formación de radicales libres del oxígeno (ROS), producto de la actividad de enzimas oxidantes de NAD(P)H, que a su vez aumentan su dinamismo a partir de alteraciones en los mecanismos antioxidantes de células del sistema inmune, microglia y los astrocitos (Mossakowski AA, et al, 2015). Estos eventos provocan una respuesta neuroinflamatoria que desencadena el proceso neurodegenerativo (Aguilera G, et al, 2017). La neuroinflamación ha sido atribuida especialmente a la activación de células gliales, particularmente los astrocitos como principales reguladores de procesos proinflamatorios y antiinflamatorios (. Jia J, et al, 2018); dicha respuesta puede materializarse a causa de dietas altas en grasas que disparan la expresión de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias como la IL-6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) (Pistell PJ, et al, 2010). A pesar de que aún no se conoce en profundidad cómo estos procesos están asociados al daño cognitivo y a un mayor riesgo de padecer demencia (Wang R, et al, 2018), bajo estas condiciones, las neuronas activan rutas de señalización que conducen a la muerte celular programada (Chi H, et al, 2018).

Para impedir la neurodegeneración, se requiere de la participación dinámica entre diferentes células que acompañan o mantienen la estabilidad neuronal, ya sea a través de la provisión

de nutrientes o del reciclaje de moléculas potencialmente tóxicas, como el glutamato (Andersen, J. V., et al, 2021).

2.3 Unidad neurovascular:

Existe una estrecha interdependencia entre la vasculatura y el parénquima cerebral (Librizzi, L., et al, 2018). El flujo sanguíneo hacia el cerebro debe ser constante y un cese de tan solo segundos puede implicar el daño irreversible de sus constituyentes celulares. Por eso desde la conexión parénquima-vasos sanguíneos y a través del mecanismo de hiperemia funcional, se establecen líneas de defensa que aseguran el control de la llegada de nutrientes y la remoción de subproductos del metabolismo, asegurando la homeostasis del microambiente cerebral (Iadecola, C. 2004). Dichas funciones homeostáticas dependen entonces, no solo de la participación vascular y de la llegada de nutrientes a través del torrente sanguíneo, sino también de elementos celulares desde la intimidad parenquimatosa estrechamente relacionados con los componentes celulares de los vasos sanguíneos. De esta asociación surge el concepto de unidad neurovascular (UNV) (Figura 2), un nicho celular desde el cual se coordinan las actividades fundamentales del sistema nervioso central. Desde el parénquima hacia la vasculatura, la UNV está compuesta por neuronas, astrocitos, pericitos, células endoteliales, células de músculo liso, lámina basal y matriz extracelular (Harder D R, et al, 2012). Estas células interactúan entre sí a través de uniones tipo “gap” y por medio de compuestos químicos con función neuromoduladora (Simard M, et al, 2003). Ligeras variaciones de glucosa y oxígeno son registradas por las neuronas, activando señales que dirigen al endotelio a través de los astrocitos para obtener abastecimiento nutricional. El astrocito es la célula más versátil de la unidad y establece un puente de conexión entre la neurona y el endotelio a modo de recibir información de una célula para transmitirla a la otra. El endotelio responde a esos mensajes regulando la tonicidad del vaso para que el flujo sanguíneo pueda abastecer adecuadamente la demanda neuronal. En esta tarea, los pericitos rodean al endotelio para brindarles soporte estructural, vasodinámico y de barrera protectora hacia el parénquima cerebral (Muoio, V., et al, 2014). Finalmente, la composición particular de la matriz extracelular de la UNV permite la transmisión de mensajes entre las neuronas, los astrocitos y el endotelio (Gulbenkian S, et al, 2001). Por lo anterior, cada uno de los

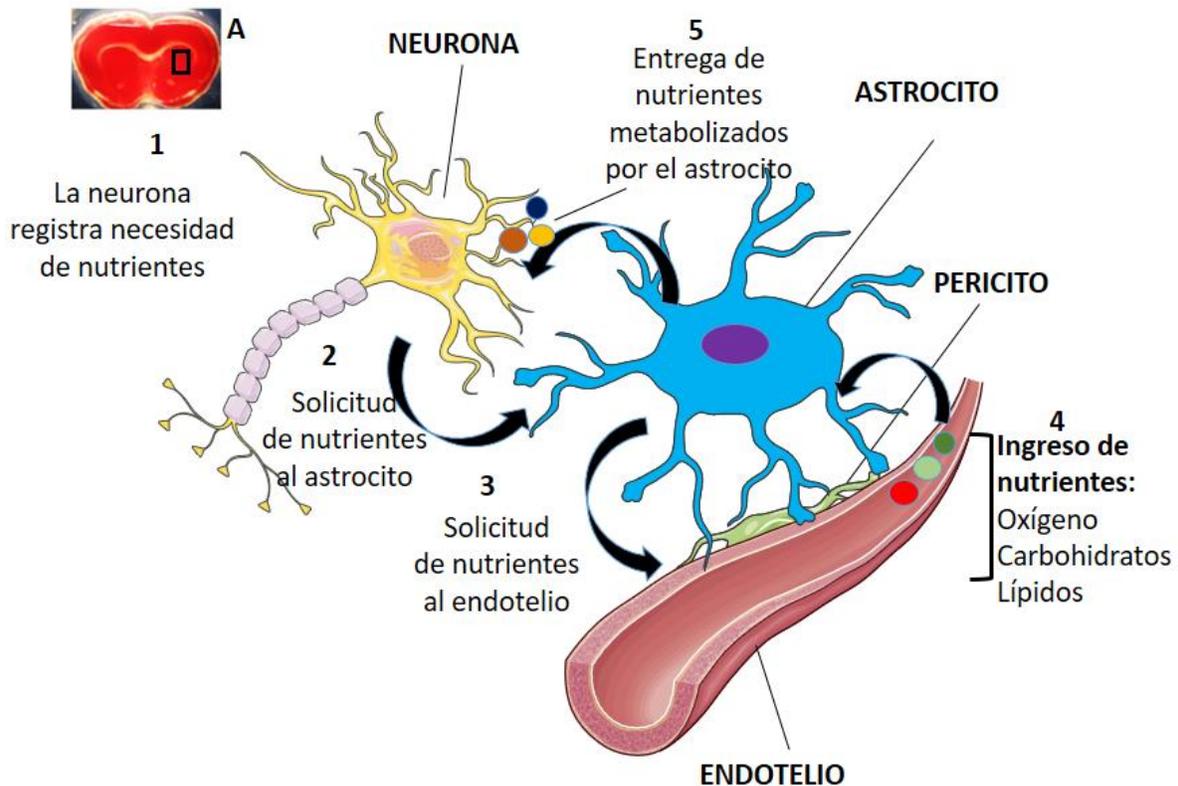


Figura 2. Dinámica en la Unidad Neurovascular (UNV): (A) Corte coronal de corteza de rata (el recuadro representa el esquema general). (1) La neurona sensa los cambios en la concentración de nutrientes y (2) envía señales al endotelio a través del astrocito para abastecerse. (3) La cercanía del astrocito con el endotelio, le permite entregar la señal de parte de la neurona para abastecer de nutrientes el parénquima. (4) El endotelio responde a través de mecanismos vasodinámicos para permitir el paso de sustancias hacia el parénquima cerebral. (5) Al ingresar, estas sustancias pasan por el metabolismo del astrocito para finalmente ser enviadas a la neurona. El astrocito media la comunicación entre la neurona y el endotelio, su contacto directo con la vasculatura le permite estimular estas células provocando la neurona y así suplir sus necesidades básicas.

Material gráfico disponible en: [Servier Medical Art de Servier est mis à disposition selon les termes de la licence Creative Commons Attribution 3.0 France](#)

componentes celulares cumple con funciones indispensables en la homeostasis cerebral, sin embargo, en situaciones de estrés celular pueden presentar comportamientos bifásicos que contribuyen tanto en la reparación como en la exacerbación de un daño (Xing C, et al, 2012) siendo esta última posición un desencadenante de procesos neurodegenerativos.

2.3.1 Barrera hematoencefálica:

Retomando la participación entre la vasculatura y el parénquima en relación a las enfermedades neurodegenerativas, es preciso entender los mecanismos implícitos en el transporte de sustancias entre los vasos sanguíneos y el tejido parenquimatoso. Por lo tanto, la funcionalidad de la UNV depende de los componentes que resguardan la integridad del

parénquima y evita el ingreso de agentes nocivos que pueda transportarse e ingresar desde el torrente sanguíneo al cerebro. Esta propiedad genera el concepto de “Barrera Hematoencefálica” (BHE), la cual cuenta con vasos continuos y no fenestrados que controlan estrictamente el paso de iones y moléculas desde el torrente sanguíneo al interior del SNC (Daneman, R., et al, 2015) (Zlokovic B. V. 2008). La pérdida de continuidad de estos vasos permite la infiltración de células del sistema inmune, que, a pesar de fagocitar restos de células averiadas, también promueven la exacerbación del daño e inducen a varias células de la UNV como astrocitos y pericitos a sellar la ruptura de la BHE con la consecuente interrupción de la reperusión sanguínea (Huang, Y., et al, 2020).

Además, algunas condiciones especiales como el envejecimiento influyen en el aumento de la expresión de péptidos de señalización como la fracción C3a del complemento, que acoplado su receptor C3aR en las células del endotelio vascular, desencadenan inflamación y cambios en la tonicidad e integridad de la vasculatura (Propson, N. E., et al, 2021). Circunstancias en las que el cerebro adquiere una mayor pérdida del flujo circulatorio, con eventual sufrimiento de edema (Jiang, X., et al, 2018), y disrupción de la BHE bajo los accidentes cerebrovasculares, cuyo manejo médico es bastante limitado debido a la susceptibilidad de la vasculatura, recurriendo a la utilización del activador de plasminógeno tisular, con pocas horas de ventana de uso (Keep, R. F., et al, 2014). El riesgo de disrupción de la BHE se encuentra asociada a comorbilidades, como la hipertensión, la aterosclerosis, la obesidad, la diabetes, el tabaquismo, entre otras, donde la anoxia y vasoconstricción disrumen la integridad de esta barrera (Jiang, X., et al, 2018). Así el ingreso de sustancias desde el torrente hacia el parénquima y la desregulación en el ingreso de nutrientes como la glucosa, debido a la pérdida de transportadores de glucosa 1 (GLT1) y de aminoácidos, además de la pérdida de otros transportadores dependientes de sodio, el cerebro se hace deficiente para evacuar el exceso de aminoácidos desde el intersticio, lo cual se presta para la acumulación excesiva de precursores de moléculas excitatorias (Cederberg, H. H., et al, 2014) generando aún más procesos inflamatorios y activación de los programas de muerte neuronal.

2.3.2 Endotelio:

Las células del endotelio vascular se pueden considerar como el primer anillo de seguridad de la BHE y la UNV. Monitorean y controlan el paso de patógenos y toxinas que puedan

afectar a las neuronas. Por ende, a pesar de que la neurodegeneración aún es considerada un evento de origen multifactorial y que aún no se dilucida por completo la relación entre el daño de la vasculatura y la neurodegeneración; el endotelio podría considerarse como un punto de partida que explique el origen de las enfermedades neurodegenerativas, tal vez desde su papel disparador de cascadas inflamatorias que disparan sus efectos en diferentes regiones del SNC; lo que podría explicar la pérdida de circuitos por generación y acumulación de péptidos tóxicos relacionados con la manifestación clínica de la EA (Iadecola C. 2010).

El deterioro endotelial también responde a la reducción del suplemento de nutrientes, defendiendo la hipótesis que relaciona las enfermedades neurodegenerativas con la deficiencia energética y el déficit metabólico (Szablewski L. (2010). Explicado también por la supresión energética tras los ACV, que, cómo se explicó anteriormente, provocan que el endotelio de la microvasculatura cerebral se convierta en la primera línea de la BHE en ser afectado, lo que explica en cierta medida el hecho de que los accidentes cerebrovasculares sean la mayor causa de desarrollo de demencia. Del mismo modo, las lesiones cerebrales traumáticas terminan por afectar el parénquima, pero comenzando por alterar el endotelio vascular desde donde se desencadena una serie de eventos que terminan por la afección celular y molecular de la UNV. En muchos de los casos, como una consecuencia a largo tiempo de la lesión inicial. Estas alteraciones provocadas por la pérdida de la integridad del endotelio, teóricamente podrían ser recuperadas con la reparación del mismo, lo que se ha demostrado a través de la restauración de la microvasculatura, que es capaz de retornar a la homeostasis de la UNV, luego de un daño isquémico, como producto de la plasticidad intrínseca (Abdulkadir, R. R., et al, 2020) y (Sandsmark, D. K., et al, 2019). Sin embargo, debe ser acompañado de fisioterapias, y terapias farmacológicas protectoras, que ayuden a una adecuada reconexión de los circuitos, y recuperación neurológica funcional (Jang, M., et al, 2021; Zhang, J., et al, 2017; Tater, P., & Pandey, S., 2021; Lee, D., & Lee, G., 2019).

La liberación de moléculas tras las lesiones del endotelio, como endotelina-1, activa rutas inflamatorias a través de la sobrerregulación de metaloproteínasas (MMPs) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) con la consecuente disrupción de la BHE (Chatfield, D. A., et al, 2011; Koyama, Y., et al, 2012). Además de estas rutas de señalización de inflamación activadas desde el endotelio, la pérdida de su integridad

estructural influye sobre la pérdida de la integridad del parénquima, cuando la interacción entre célula y célula endotelial se reduce, se distancian y se eleva la permeabilidad de la BHE (Jang, M., et al, 2021). Además, la reducción en la expresión de proteínas esenciales de uniones estrechas y adherentes entre células adyacentes son determinantes para controlar el paso de sustancias desde el torrente sanguíneo (Winkler, L., et al, 2021). Dichas proteínas de unión estrecha (claudinas y ocludinas) y de las uniones adherentes (VE-caderina), y las que conectan estas uniones al citoesqueleto (ejm, zonula occludens – ZO), también están asociadas a rutas de inflamación, y la pérdida de su expresión favorece la sobre expresión de NADPH oxidasa 2 (Nox-2), llevando a la hiperproducción de especies reactivas del oxígeno (ROS) con el consecuente estrés oxidativo del endotelio vascular (Fan, L. M., et al, 2019). A su vez, esto genera un desequilibrio en el control sobre la vasodilatación, el óxido nítrico (NO) disminuye, favoreciendo la vasoconstricción y la pérdida de la retención de moléculas de adhesión del endotelio vascular (VCAM) y moléculas de adhesión intercelular (ICAM) que se expresan en la superficie del endotelio, estimulando el anclaje de leucocitos que posteriormente se infiltran al parénquima cerebral (Kvietys, P. R., et al, 2012). Mientras esto sucede, el endotelio libera más mediadores inflamatorios, como las interleuquinas IL-1 β e IL-6, la proteína quimioatrayente de monocitos, el factor de crecimiento del endotelio vascular VEGF y las metaloproteínas de la matriz extracelular (MMP-9) soportando la extravasación del endotelio vascular y disrupción del parénquima cerebral (Grammas, P., & Ovase, R. 2001; Thirumangalakudi, L., et al, 2006). En resumen, los componentes del endotelio, no solo influyen de manera estructural sobre la BHE y la protección del parénquima cerebral, sino que también, se vuelve un epicentro para el inicio de procesos inflamatorios que liberan numerosas moléculas atrayentes de células del sistema inmune desde el torrente sanguíneo, en cuyo estado, el endotelio es un arma de doble filo, que libera moléculas de adhesión hacia la luz del vaso, y que envía y recibe señales de inflamación desde el pericito como segunda línea celular de la BHE (Kozma, M., et al, 2021). Este último evento es de suma importancia cuando asumimos que el pericito es la célula inmediatamente adyacente al endotelio en la dirección del lumen hacia el parénquima, lo que implica que una alteración endotelial impulsa eventos en cadena que finalmente llevan el mensaje de deterioro íntimo de la UNV. Lo anterior refuerza la propuesta del endotelio como el tipo celular de afectación inicial en las enfermedades neurodegenerativas, y que tal vez, la acumulación de

péptidos tóxicos A β y los agregados de fosfo-Tau (p-Tau), sean una consecuencia del daño vascular y no la causa primaria de la neurodegeneración en la demencia tipo Alzheimer o sean consecuencia del infarto cerebral isquémico (Nation, D. A., et al, 2019).

2.3.3 Astrocito:

Tras la disrupción del endotelio de la microvasculatura, debe limitarse el ingreso de toxinas y leucocitos al parénquima, en donde el pericito participa como segundo anillo de seguridad; pero, bajo la injuria, entre el endotelio y el pericito se facilita el disparo de moléculas que participan en la formación del inflammasoma, un sistema acoplado a sensores y moléculas que efectúan la muerte celular por apoptosis (Kozma, M., et al, 2021; Malik, A., & Kanneganti, T. D. 2017)

Por ende, aquí se necesita de otro interventor celular para defender la integridad de la BHE y por supuesto del parénquima. Esta célula es el astrocito, que, en compañía de los oligodendrocitos, hacen parte de la macroglia (Vasile, F., et al, 2017). Mientras los oligodendrocitos cumplen con la función de soportar el embalaje de mielina en los axones neuronales, los astrocitos cuentan con una mayor variedad de funciones, entre ellas, hacer parte de la BHE, regular la sinaptogénesis, controlar la concentración de iones, metabolizar neurotransmisores y secretar moléculas para utilidad de las neuronas (Dallérac, G., & Rouach, N.,2016). De acuerdo a esto, los astrocitos están en contacto con todas las demás células dentro de la UNV, a través de dos presentaciones morfológicas que son los astrocitos protoplásmicos y los astrocitos fibrosos. Los primeros presentan “bipolaridad” estructural, es decir, por un polo se conectan al endotelio a través de una estructura denominada pie astrocitario, y por el otro a aproximadamente más de 90.000 sinapsis, como es el caso de los astrocitos hipocampales (Chai, H., et al, 2017). En este sentido, dada la ubicación central de los astrocitos en medio de la neurona y el endotelio, su papel de intermediario metabólico entre ambas células y el efecto regulatorio que ejerce tras los eventos adversos sobre el SNC estas células podrían considerarse como el eje central de la UNV (Patabendige, A., et al, 2021) con la responsabilidad pivotal de mantener la integridad del parénquima cerebral.

2.3.3.1 Astrocitos y regulación de la sinapsis:

Aunque el estudio clásico de la neurobiología celular posicionó a los astrocitos como entidades celulares con función básicamente de soporte estructural; la ardua tarea en investigación ha venido desentrañando la relevancia del astrocito en la comunicación neuronal. Ahora se sabe que esta célula es requerida para afinar la comunicación entre neuronas, tomar y metabolizar neurotransmisores como el glutamato y regular las concentraciones de potasio extracelular. Además, se ha evidenciado que el astrocito también es una célula excitable, y que los neurotransmisores inducen en estos, la propagación de ondas de calcio, reconociéndose como células que también hacen parte de una red integrada de señales dentro del SNC (Bergles, D. E., & Jahr, C. E. 1997; Hertz L. 1965; Cornell-Bell, A. H., et al, 1990).

Se puede decir ahora que la sinapsis es más que un asunto entre dos neuronas, y que involucra neuronas y astrocitos, a lo que ahora se le atañe el concepto de sinapsis tripartita; incluso, algunos autores sugieren que la sinapsis debe ser denominada tetrapartita por la participación de la matriz extracelular, incluso otros, además añaden la participación de procesos microgliales denominando finalmente esta comunicación intercelular cómo sinapsis pentapartita (Schafer, D. P., et al, 2013). Hasta ahora, ha sido compleja la determinación exacta de cómo se distribuyen los componentes en los procesos astrocitarios para acompañar la sinapsis, pero la microscopía electrónica ha permitido observar en cierta medida la acomodación de complejos moleculares pre y post-sinápticos de las neuronas y los receptores astrocitarios de neurotransmisores que permiten modular su liberación en la sinapsis, donde se resalta la alta concentración y ubicación estratégica de los receptores glutamatérgicos (Heller, J. P., & Rusakov, D. A. 2017). Estos receptores en los astrocitos presinápticos de las colaterales de Schaffer (axones de neuronas que interconectan regiones dentro del hipocampo) se activan prácticamente al mismo tiempo en que se estimulan las neuronas hipocámpales, apoyando el papel crucial del astrocito en la sinapsis (Bergles, D. E., & Jahr, C. E. 1997). La estimulación con glutamato ejerce una respuesta a través de la propagación de calcio libre intracitoplasmático a nivel interastrocitario, conformando una señal de respuesta cerebral cómo consecuencia de la actividad sináptica (Cornell-Bell, A. H., et al, 1990). Además, la respuesta del astrocito no se limita a la recepción y metabolismo de neurotransmisores de origen sináptico, también, cuentan con la maquinaria de liberación de

“gliotransmisores” cómo el glutamato, ATP y D-serina, cuya desregulación es un causal de desórdenes neuropsiquiátricos cómo la epilepsia y la esquizofrenia (Halassa, M. M., et al, 2009). Es de resaltar que estos gliotransmisores son liberados a través de los mismos mecanismos utilizados por la neurona, donde las proteínas de fijación soluble SNARE son requeridas para fusionar vesículas a la membrana y liberar glutamato, dependiendo del aumento de la concentración de calcio intracitoplasmático estimulado por la demanda de la actividad sináptica (Zhang, Q., et al, 2004). Incluso, se ha reportado que los astrocitos responden prácticamente a todos los sistemas de neurotransmisores como el glutamato, acetilcolina, ATP, GABA, endocannabinoides, dopamina, histamina, serotonina y opioides, que pueden estimular simultáneamente al astrocito con respuestas dependientes de la integración de señalizaciones intracelulares, para que finalmente el astrocito pueda modular la actividad sináptica, ya sea excitandola o deprimiendola, según sea el requerimiento del tejido, tipo de sinapsis y tipo de receptores activados en las membranas pre y pos-sinápticas (Durkee, C. A., & Araque, A., 2019).

Los astrocitos también secretan moléculas de adhesión celular (CAM) y moléculas de matriz extracelular que son requeridas para la comunicación intercelular (astrocito-astrocito, astrocito-neurona), cómo parte del sostén estructural de la hendidura sináptica. Estas moléculas son requeridas para conducir y guiar la comunicación entre axón, dendrita y astrocito, clave para el establecimiento de la sinapsis (Frei, J. A., & Stoeckli, E. T., 2014). Entre estas CAM, el silenciamiento de la expresión de cadherinas y protocadherinas impide la formación de sinapsis inhibitorias y sinapsis excitatorias (Garrett, A. M., & Weiner, J. A., 2009). Estas moléculas, sumadas a la matriz extracelular (compuesta por fibronectina, tenascina, trombospondinas, laminina), forman una red de intercambio molecular entre membrana presináptica, post-sináptica, astroglia y matriz, conformando lo que anteriormente denominamos cómo sinapsis tetrapartita. Desde allí se modula la movilidad de neurotransmisores y el anclaje de sus receptores postsinápticos, de lo cual depende la formación, la función y la consolidación sináptica (Frischknecht, R., et al, 2009). El origen de la matriz extracelular en la hendidura sináptica es consecuencia de la secreción de una amplia variedad de compuestos provenientes tanto de neuronas como de astrocitos, lo que refleja la importancia de la comunicación astrocito-neurona para mantener la homeostasis de la UNV (Dityatev, A., & Rusakov, D. A. 2011).

2.3.3.2. Astrocitos y neurodegeneración:

La astrogliosis es un mecanismo de respuesta de los astrocitos que se hiperreactivan ante estados de enfermedad o daños mecánicos del SNC, es decir, sufren una serie de cambios transcripcionales, morfológicos y funcionales (Kumar, A., et al, 2021; Makarava N, et al, 2019) de respuesta a estrés, necesarios para la protección de la UNV. Sin embargo, este mecanismo se puede convertir en gatillador de respuesta inflamatoria. Razón por la cual, esta defensa astrocitaria sigue siendo bastante controversial, reconociendo la astrogliosis como un recurso necesario para la resolución de accidentes cerebrovasculares hemorrágicos e isquémicos a través del aclaramiento de detritos de sinapsis perdidas tras el insulto. Pero con el inconveniente de que su falta de regulación puede generar fagocitosis astrocitaria, no sólo de detritos de sinapsis perdidas, sino también de sinapsis de neuronas funcionales, como se ha documentado para el caso de la EA (Savage, J. C., et al, 2015; Shi, X., et al, 2021). Tal vez, parte de la solución sea identificar el momento de la intervención de los astrocitos reactivos, permitir su función de aclaramiento y finalmente, prevenir la propagación de la reactividad, impidiendo la fagocitosis sináptica y la formación de la cicatriz glial; otro evento que resulta en la acumulación de astrocitos en sectores dañados de la BHE con el objetivo de proteger la integridad del parénquima, pero que también su cicatriz obstaculiza el ingreso de nutrientes, y la reconectividad tras los ACV (Dong, C., et al, 2021).

Es posible que este control pueda llevarse a cabo a través de la supresión de proteínas astrocitarias relacionadas con vías de señalización de fagocitosis como MEGF10 y MERTK ó factores de transcripción que se disparan tras un accidente cerebrovascular, como ZEB2 (Vivinetto, A. L., et al, 2020; Zhao, Z., et al, 2021); además de la inhibición del complemento para prevenir la participación fagocítica de otras células inmunes del SNC (Werneburg, S., et al, 2020) e incluso la reducción de la actividad enzimática que polimeriza los filamentos intermedios GFAP+ favoreciendo la liberación de factores tróficos protectivos (Becerra-Calixto, A., et al 2018). De hecho, la astrogliosis se está convirtiendo en un importante biomarcador y pilar terapéutico de múltiples enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, Huntington, Taupatías y epilepsia (Harada, R., et al 2022; Wei, Y., et al, 2021; Hou, L., et al, 2021; Small, C., et al, 2022; Patel, H., 2022).

La necesidad de intercomunicación astrocito-neurona es imprescindible para la actividad del SNC. El intercambio molecular entre ambas células requiere la inversión constante de energía por medio de ATP. La deprivación energética, por ejemplo, en accidentes cerebrovasculares isquémicos, resulta en la pérdida del funcionamiento de bombas de $\text{Na}^{++}/\text{K}^{++}$ en las neuronas con acumulación de glutamato en la hendidura sináptica, que, en estas condiciones pobres de energía, supera la capacidad de retoma del astrocito; a su vez, la concentración de calcio aumenta en ambas células y el Na^{++} intracitoplasmático neuronal promueve el ingreso de Cl^{-} para neutralizarlo; luego, hay edema celular y muerte neuronal. La neurona puede recuperarse tras estos eventos mientras el tiempo de depresión energética no se prolongue y los astrocitos cuenten con buena capacidad morfológica y funcional. Estas últimas cualidades del astrocito se van perdiendo con el envejecimiento, lo que en parte podría explicar la susceptibilidad de un cerebro senil a la deprivación energética y al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Kalia, M., et al, 2021; Verkhratsky A, et al, 2016), como es explicado también por la acumulación de glutamato (Martinez-Lozada Z., et al, 2016; Mazaud D., et al, 2019).

2.3.4. Neurona:

Además de la relevancia del astrocito en la UNV, desde los inicios en las investigaciones de las enfermedades neurodegenerativas, la neurona ha sido el foco celular principal para tratar de explicar el origen y/o la causa de la patología. Tal vez por el hecho de que la deficiencia cognitiva sea una respuesta a la reducción de la población neuronal y a la pérdida de su intercomunicación (Coleman P.D., et al, 1987; Mountjoy C., et al, 1983). La neurona es una célula altamente especializada y su disposición polarizada le permite tener extremos pre y post- sinápticos a través de procesos que se extienden hasta alcanzar incluso un metro de longitud. Esta disposición morfológica obliga a la neurona a tener mecanismos altamente sofisticados para recibir, procesar y enviar mensajes intra e intercelularmente (Terenzio, M., et al, 2017). La conexión entre dos neuronas para llevar a cabo su comunicación es conocida como sinapsis, un evento que requiere la direccionalidad entre axones, dendritas y soma a través de moléculas de adhesión sináptica que permiten el enfrentamiento de un lado presináptico encargado de la liberación de neurotransmisores, luego del estímulo por iones de calcio y un lado post sináptico dedicado a la recepción de esos neurotransmisores. Entre

ambos extremos se forma un espacio denominado hendidura sináptica presto para la liberación y recepción neurotransmisora (Südhof TC., 2021). Sin embargo, estos espacios sinápticos son susceptibles de la acumulación de restos proteicos tóxicos que marcan los complejos pre y post sinápticos (Reddy, P. H., et al, 2018), con la consecuente pérdida de la maquinaria necesaria para llevar a cabo la comunicación del sistema nervioso, tanto a nivel excitatorio como a nivel inhibitorio; esta reducción de la funcionalidad sináptica se correlaciona fuertemente con el declive cognitivo en las personas que padecen demencia, ya que la acumulación de estos péptidos tóxicos dispara la producción de moléculas proinflamatorias que resulta en la activación fagocítica de la microglia en el giro medio de la corteza temporal y en la corteza visual primaria, dos tejidos cerebrales caracterizados por verse afectados en etapas tempranas y en etapas tardías de la EA, respectivamente (Kurucu, H., et al, 2022; Akhter, R., et al, 2021).

La acumulación de estos péptidos tóxicos en aglomeraciones extracelulares fue observada por Alois Alzheimer en el tejido cerebral post- mortem de uno de sus pacientes que padeció déficit cognitivo, cuyas estructuras denominó como placas seniles (Grøntvedt, G. R., et al, 2018) al día de hoy se conoce que la procedencia de estas estructuras viene de la alteración catabólica de la proteína precursora amiloide (APP) anclada a membranas (Hardy J., Allsop D. 1991; Selkoe D. J. 1991). En condiciones regulares, esta proteína es conducida por la vía no amiloidogénica y escindida por la enzima alfa secretasa (α -secretasa) produciendo fragmentos proteicos que posteriormente son abordados por la enzima gamma secretasa (γ -secretasa) generando péptidos solubles que no alteran la integridad celular, mientras que en condiciones adversas, el corte inicial sobre APP es realizado por la enzima que cliva a la proteína amiloide en el sitio beta, β -secretasa 1 (BACE1) dejando segmentos que γ -secretasa corta con la producción final de los residuos tóxicos amiloides $A\beta$ 1-40 y $A\beta$ 1-42 (Hardy J., Allsop D. 1991; Selkoe D. J. 1991). La conformación estructural de estos residuos les permite aglomerarse de manera tal que forman placas seniles que se acumulan en el espacio extracelular. Hasta el momento, estos procesos moleculares han sido el evento de mayor asociación con la demencia tipo Alzheimer; sin embargo, los esfuerzos terapéuticos dirigidos al control de los péptidos tóxicos no han sido satisfactorios (Hardy, J. & Selkoe, D. J., 2002; Aisen, P. S., et al, 2013). Otro de los procesos que ha sido pilar en el afán de explicar la biología molecular de la patología, es la acumulación de la proteína Tau hiperfosforilada; la

proteína Tau forma complejos con los microtúbulos del citoesqueleto y se encarga de mantenerlos dinámicos, pero bajo condiciones de estrés celular, esta proteína es hiperfosforilada, promoviendo su aglomeración en estructuras neurofibrilares que se acumulan intracelularmente; esto irrumpe los procesos intracelulares de la neurona tales como la conducción y liberación de vesículas cargadas de neurotransmisores, y eventualmente la sinapsis (DeKosky ST, Scheff SW. 1990; Jadhav S, et al, 2015). La acumulación de estos aglomerados proteicos tanto a nivel intra como a nivel extracelular, supone la alteración o sobrecarga de los elementos organocelulares encargados de la degradación proteica. Uno de estos es el sistema de autofagia, el cual requiere la maduración de un fagóforo hacia la forma de autofagosoma y posteriormente hacia la fusión con el lisosoma para formar el autofagolisosoma y degradar cargos proteicos. Sin embargo, la acumulación de los residuos de A β y fibrillas de p-Tau genera una sobrecarga para este sistema e interfiere con el transporte del fagosoma y su maduración, impidiendo la posterior fusión con el lisosoma; por lo tanto, la siguiente acumulación de agregados amiloides y de fibrillas de p-Tau tendrán menos chance de ser degradados a través de este sistema (Pickford, F., et al, 2008; Tammineni, P., et al, 2017; Fang, C., et al, 2021; Chen, X., Li, Y., et al, 2020). En consideración con lo anterior, muchos esfuerzos terapéuticos se han enfocado en direccionar estas proteínas hacia la degradación, a través de marcajes que conducen al sistema proteasoma el ingreso de agregados extracelulares de A β hacia el interior celular y del transporte de residuos de APP hacia el sistema de autofagia con la ayuda de moléculas chaperonas, que en principio prometen “limpiar” el parénquima cerebral de compuestos tóxicos y la recuperación de la homeostasis de la UNV (Medina M. 2018; Han, B. H., et al, 2022; Xu, X., et al, 2021). No obstante, los numerosos esfuerzos han fracasado en prevenir la patología, probablemente porque demencias como el Alzheimer o demencia vascular, son difíciles de explicar desde la biología de una sola célula en particular, y, por el contrario, se necesite entender la interacción de un circuito celular compuesto por células endoteliales vasculares, astrocitos, microglia y neuronas. Esa reducción de las “basuras proteicas” tal vez deba ir de la mano con el entendimiento de una variedad de actores celulares que deben ser comprendidos en conjunto para detectar las posibles causas de la pérdida del mantenimiento de las actividades básicas del SNC.

2.4. LÍPIDOS

Además de la neurodegeneración asociada a la amiloidosis y tauopatía, Alois Alzheimer describió otro marcador neuropatológico del deterioro cognitivo y la demencia, una particular acumulación de gránulos lipídicos inestables en células gliales (Foley P. 2010), cuyo hallazgo abrió la posibilidad de relacionar la bioquímica lipídica con el trastorno neurodegenerativo.

Los lípidos aportan el 50% del peso seco del cerebro, convirtiéndolo en el tejido más rico en lípidos luego del tejido adiposo (Sastry P.S. 1985). Estos se conforman por un grupo de moléculas heterogéneas caracterizadas por su composición de cadenas cortas o largas hidrocarbonadas que pueden ser simples o estar acompañadas de otras estructuras para formar triglicéridos, fosfolípidos y esteroides (Burdge, G. C., & Calder, P. C. 2015). Desde que se propuso el modelo del mosaico fluido, se sabe que estas moléculas son el componente fundamental de la estructura de la membrana celular y de sus compartimentos organelos celulares (Casares, D., et al., 2019).

Además de determinar la formación de las membranas celulares, los lípidos gobiernan el balance energético, el sistema de endomembranas, el aclaramiento de proteínas y las cascadas de señalización celular (Martinez-Gardeazabal J., et al, 2017). De los lípidos que componen el SNC, un 50% son fosfolípidos, un 40% glicolípidos, y un 10% colesterol, ésteres de colesterol y trazas de triglicéridos. De las cadenas carbonadas unidas por enlaces covalentes simples o dobles denominadas *ácidos grasos*, como unos de los componentes que conforman los lípidos del cerebro, aproximadamente el 30% son ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFAs), de los cuales el ácido docohexaenoico (DHA) y el ácido araquidónico (AA) son algunos de sus principales representantes (Sastry P.S. 1985). Las observaciones de acúmulos lipídicos en los cerebros de “Alzheimer” y la asociación de genes relacionados con el metabolismo y la homeostasis lipídica con la patología, entre estos la apolipoproteína E (ApoE) (Mahley RW. 1988; Huang Y, et, 2004; Belloy M, et al, 2019) y el casete transportador de unión a ATP (ABCA), sugieren que los lípidos son moléculas clave en la función y patología neural (Boehm A, et al, 2016). A continuación, se describirán algunos más asociados con la neurodegeneración y enfermedades neurológicas:

2.4.1 Colesterol

El colesterol (CHO) cumple un rol central en las células de mamíferos, sintetizándose a partir de la ruta de Acetil coenzima A y aportando un 25% de la materia prima que sostiene la integridad de las membranas lipídicas (Ikonen E., 2008). Es uno de los componentes lipídicos fundamentales en la formación de las Balsas lipídicas (BLs) (estructuras membranosas enriquecidas en CHO y ácidos grasos saturados) (Cordy JM, et al, 2006).

La elevada concentración del colesterol aumenta la rigidez de las BLs y promueve el procesamiento de BACE1 sobre APP, estimulando la activación de astrocitos, cuyo evento es característico en el cerebro de personas con Alzheimer (Avila-Muñoz E, Arias C., 2015; Refolo LM, et al, 1995; Thinakaran G, et al, 1996); además, la deficiencia en el transporte intracelular del colesterol hacia la membrana citoplasmática, lo retiene en compartimentos endosomales, donde mantiene asociado a los componentes necesarios para llevar a cabo el proceso amiloidogénico (Ory DS, 2004) (Malnar M, et al, 2010; Malnar M, et al, 2012), generando un elevado procesamiento enzimático sobre APP (Bodovitz S, Klein L., 1996). La reducción del colesterol con ayuda de fármacos ha disminuido la concentración de A β y fragmentos carboxiterminales β -solubles (β -CTFs) que parten del proceso amiloide, mientras que la suplementación permite el aumento de estas subunidades y la disminución del producto de la vía no amiloidogénica sAPPa (APP soluble alfa) (Simons M, et al, 1998). Sumado a ello, el control del tamaño de los agregados A β está subordinado bajo el suministro de altas concentraciones de colesterol (Refolo L, et al, 2000), información que sugiere una relación directamente proporcional entre el colesterol y el daño neurovascular por amiloidosis (Morris MC, Tangney CC, 2014). Aunque esta relación podría no ser tan simple e ir más allá de asociaciones cuantificables, ya que la actividad de BACE1 y la producción de A β responden de manera diferencial a diversos productos del colesterol como los hidroxiesteros que provienen de su oxidación. Estos derivados estimulan el procesamiento de APP, el aumento de agregados A β , la hiperfosforilación de Tau y la formación de ovillos neurofibrilares (NFT) (Nelson TJ, Alkon DL., 2005; Melov S, et al, 2007). Por ejemplo, el 7B-hidroxicolesterol presenta actividad pro-apoptótica y es un potente neurotóxico (Farooqui AA., 2011) el 24(S)-hidroxicolesterol resulta de la oxidación del colesterol durante el proceso neurodegenerativo y es liberado desde las neuronas hasta estimular la producción de apolipoproteína-E (ApoE) por parte del astrocito, siendo este evento relacionado con un

mayor daño neuronal (Leoni V, et al, 2010). Por su parte, el 22(R)-hidroxicolesterol se comporta como un agente protector de la toxicidad de A β sobre células de teratocarcinoma neuronal (NT2N), mientras que el 27-hidroxicolesterol influye en el aumento de A β y la hiperfosforilación de Tau en roedores modelo de Alzheimer (Farooqui AA., 2011).

2.4.2 Esfingolípidos

Los esfingolípidos son otros componentes fundamentales para mantener la estabilidad de las balsas lipídicas, entre ellos se comparte la esfingosina como base estructural, formada por la unión de serina y palmitoil-CoA (Hanada K., 2003). Estos dos últimos son precursores de ceramidas, glicosfingolípidos, gangliósidos y esfingomielina; macromoléculas que se sintetizan de novo gracias a la actividad enzimática de la serina-palmitoil CoA transferasa (SPT) sobre la serina y el palmitoil-CoA. Se ha observado que la subunidad catalítica SPTLC2 de esta transferasa se ve afectada por la ausencia del dominio intracelular de APP (AICD), elevando la expresión de SPTLC2 y su actividad enzimática. Este fenómeno se evidenció en tejidos post-mortem de cerebros humanos con alteraciones en las subunidades catalíticas presenilinas 1 y 2 (PSN1/2) de γ -secretasa, mutaciones asociadas con Alzheimer del tipo familiar (FAD) (Hanada K, 2003).

La esfingosina 1 fosfato (S1P) es una presentación fosforilada de la esfingosina. Para alcanzar este estado se requiere de la actividad enzimática de la esfingosina quinasa 2 (SphK2). A causa del aumento de los péptidos A β , SphK2 migra de manera anormal desde el citoplasma hacia el núcleo neuronal donde es detectada en su forma escindida. Debido a que el aumento de S1P se ha asociado con protección, crecimiento y proliferación neuronal, la disminución de SphK2 en el citoplasma es un indicador de vulnerabilidad de la neurona (Hanada K., 2003). Del mismo modo, el isómero de SphK2, la esfingosina quinasa 1 (SphK1) también es afectada por el oligómero A β 1-42. La inhibición de SphK1 por parte de estos péptidos desencadena la expresión de proteínas proapoptóticas, ROS y la inviabilidad de células tumorales de roedor. A pesar de estos hallazgos, Takasugi y colaboradores, observaron que al utilizar inhibidores de SphK1 y S1P se disminuyeron los péptidos β -amiloides, y además concluyeron que S1P puede unirse al dominio transmembrana de BACE1 y así modular positivamente su actividad amiloidogénica. Este comportamiento fue

observado en tejidos cerebrales de Alzheimer esporádico. Estos resultados son contradictorios, pero podrían marcar diferencias entre diferentes tipos de Alzheimer, lo cual deberá ser estudiado al detalle (Cieślik M, et al, 2015).

Complementariamente, las ceramidas son un tipo de esfingolípido cuya estructura molecular es central en la vía de síntesis de las diferentes especies de esfingolípidos implicados en funciones celulares como numerosas vías de señalización (Mencarelli C, Martinez-Martinez P, 2013). Dichas moléculas sufren alteraciones desde los primeros estadios del progreso de la enfermedad a causa del incremento en la expresión de los genes que controlan su síntesis, acumulando y estimulando la producción de ROS, la activación de vías proapoptóticas y la disminución de factores protectores antiapoptóticos, como la S1P (Katsel P, et al, 2007). Las ceramidas son lípidos que responden positivamente al envejecimiento, y en las personas que padecen EA los niveles de ceramida cerebral suelen ser mucho más altos que los niveles presentes en las personas sanas (Han X, et al, 2002). Sumado a esto, estas moléculas tienen la capacidad de direccionar el corte de BACE1 sobre APP, promoviendo la síntesis de los péptidos A β a través de la estabilización de BACE1 ya expresada (Puglielli L, et al, 2003); probablemente la regulación positiva de la actividad de BACE1 por parte de las ceramidas se dé a partir del aumento de éstas a través de la hidrólisis de la esfingomielina (SM) porque, como lo plantean Slotte y colaboradores, la estabilidad del colesterol en las balsas lipídicas, requiere de SM, que al ser hidrolizada permite al colesterol desprenderse, y quizás viajar a dominios intracelulares, en donde estimula la actividad amiloidogénica (Cordy JM, et al, 2006; Refolo LM, et al, 1995; Thinakaran G, et al., 1996).

Además de potenciar la biogénesis de los péptidos amiloides, la interacción entre A β y los esfingolípidos estimula la formación de agregados A β . Esto se debe a que los fragmentos A β se unen a la cara externa de la membrana celular a través del gangliosido GM1, un tipo de esfingolípido de membrana cuya estructura presenta en el extremo que limita con el espacio extracelular, una ramificación de ácido siálico con afinidad por las subunidades A β . Las primeras subunidades A β del agregado sirven como plantilla para que más subunidades se reúnan y conformen los cúmulos fibrosos alrededor de las membranas neuronales (Hirano-Sakamaki W, et al, 2015). En ese sentido, podríamos pensar que GM1 es un promotor de la neurodegeneración, aunque esta sugerencia debe depender de un adecuado balance, ya que

su participación positiva en la formación de los agregados A β se ve reflejada cuando sus niveles neuronales están por encima de un nivel fisiológico, permitiendo que varias unidades de GM1 capturen péptidos A β que se van anexando entre sí para formar los agregados; mientras que los niveles fisiológicos de GM1, por el contrario, retienen pocas subunidades A β e impiden que los mismos se agreguen. Además, la ausencia de GM1 dejaría los fragmentos A β a merced de ser anexados a la membrana por medio de otros lípidos como SM. Considerando lo anterior, este gangliosido GM1, a niveles fisiológicos se comporta como un factor neuroprotector, pero por encima de estas cantidades, se comporta como un potente precursor de eventos neurodegenerativos (Amaro M, Šachl R, et al, 2016).

2.4.3 Fosfolípidos

Los fosfolípidos son los constituyentes fundamentales de las membranas celulares y organocelulares, y de sus características particulares se determina la curvatura, polaridad, rigidez y fluidez membranosa (Amaro M, et al, 2016). Están compuestos por una cabeza polar que le da su identidad: colina, serina, etanolamina, formando fosfatidilcolina (PC), fosfatidil serina (PS), fosfatidil inositol (PI) y fosfatidiletanolamina (PE), respectivamente; además, cuentan con un glicerol, y ácidos grasos cuyas cadenas carbonadas pueden estar totalmente saturadas o presentar insaturaciones o dobles enlaces entre sus carbonos (Vance J. E. 2015).

Cuando sectores de la membrana están constituidos en su mayoría por fosfolípidos ricos en ácidos grasos insaturados, su característica estructural tiende a ser flexible, mientras que los sectores ricos en ácidos grasos saturados conforman estructuras de consistencia más rígida (Ménesi D, et al, 2009). Estos sectores rígidos dentro de la membrana explican la formación de las BLs que en un sentido más estricto son definidas por el Simposio Keystone de 2006 específicamente como “Balsas de membrana de dominios pequeños de 10 a 200 nm, heterogéneos, altamente dinámicos, enriquecidos con esterol y esfingolípidos que compartimentan los procesos celulares, cuyas balsas pequeñas a veces se pueden estabilizar para formar plataformas más grandes a través de interacciones proteína-proteína y proteína-lípidos”(Pike LJ, 2006) (Figura 3).

2.4.4 Lípidos y neurodegeneración:

Las BLs enriquecidas en colesterol, esfingolípidos y fosfolípidos prestan un adecuado entorno para el anclaje, funcionalidad e interacción de múltiples proteínas (Ménési D, et al, 2009), entre estas, las proteínas que participan en la vía amiloidogénica, la APP, BACE1 y γ -secretasa, que encuentran en las BLs el ambiente adecuado para llevar a cabo la activación de la vía amiloidogénica e incluso el destino de sus productos catalíticos (Parkin ET, et al, 1999; Kalvodova L, et al, 2005; Cordy JM, et al, 2006) (Figura 3A). Los lípidos controlan entonces la formación de estas plataformas y a su vez la producción masiva de dímeros de A β tanto a nivel celular como sinaptosomal (Kawarabayashi, T., et al, 2022), gracias a que sus dominios son ricos en colesterol, donde se ancla la enzima BACE1 (Dai G., 2022), facilitando su acceso para cortar APP en compartimentos endosomales, donde su procesamiento es más acelerado, lo cual ha sido aprovechado como una base terapéutica para reducir la vía amiloidogénica a través de glicosilaciones para que su tráfico intracelular se vea truncado y no logre llegar a balsas lipídicas de ubicación en endosomas (Kwon, O. H., et al, 2021). Por su parte, otros modelos sugieren que la evolución de los estadios de la enfermedad, según Braak, se refleja en el aumento de tamaño y en la reducción del número de las balsas lipídicas, es decir, como si se tratase de la preparación de un extenso campo

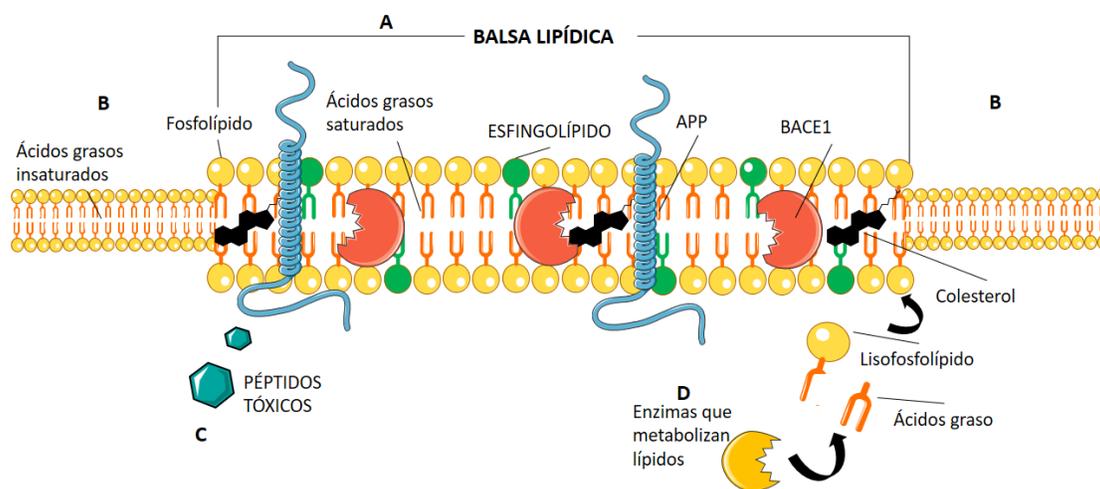


Figura 3. Fosfolípidos (PLs), balsas lipídicas y producción de péptidos tóxicos: (A) Balsa lipídica, sector enriquecido en fosfolípidos conformados por ácidos grasos saturados, también por esfingolípidos y colesterol que mantienen unidos a BACE1 y APP. (B) Sectores ricos en fosfolípidos con ácidos grasos insaturados donde es menos probable el anclaje de precursores de péptidos tóxicos. (C) Sobreproducción de péptidos tóxicos. (D) Enzimas (desaturasas, lipasas, elongasas) que participan en la formación lipídica de los sectores de membrana.

Material gráfico disponible en: [Servier Medical Art de Servier est mis à disposition selon les termes de la licence Creative Commons Attribution 3.0 France](#)

membranoso para la ubicación de los materiales precursores de los péptidos amiloides (Santos, G., & Díaz, M. 2021). El sistema de transporte entre retículo endoplásmico, red de trans Golgi y membrana citoplasmática, permiten que BACE1 y APP sean reciclados en la membrana luego de su traducción y posteriormente puedan ser endocitados. Una vez esto sucede, son llevados a endosomas tempranos y tardíos, cuyo pH ácido provee el ambiente idóneo donde BACE1 y γ -secretasa ejercen su catálisis sobre APP con la producción de péptidos A β ; el tráfico disfuncional de endomembranas entre estos compartimentos parece dar una explicación a la producción aberrante de A β y la disrupción sináptica (Selkoe D., 1994; Takami M, et al, 2009; Peters F, et al, 2018; Fourriere, L., & Gleeson, P. A. 2021; Maesako, M., et al, 2022).

La estabilidad de este sistema endosoma-autofagolisosoma ha permitido el aclaramiento y la reducción de los acúmulos de A β en modelos animales de Alzheimer (mutantes APP/PSN1) (Guo, X., et al, 2021; Androuin, A., et al, 2022). Se ha visto que el silenciamiento de BACE1 en cultivos primarios de neuronas reduce los agregados de p-Tau y que esta reducción depende del sistema de autofagia, dónde la formación del autofagosoma depende de la lipidación con fosfatidiletanolamina, cuya inhibición impide la reducción de p-Tau bajo el silenciamiento de BACE1 (Piedrahita, D., et al, 2016). Por otro lado, la fagocitosis de estos agregados de A β y también de p-Tau depende de la exposición de la microglia a ácidos grasos, como el alfa-linoleico que induce la fagocitosis y el aclaramiento intracelular de estos restos proteicos por parte de estas células. Además, la sobreactividad inflamatoria ejercida por la microglia requiere de la presencia de ácidos grasos omega-3, particularmente el ácido docohexanoico y el ácido eicosapentanoico (Desale, S. E., & Chinnathambi, S. 2021), lo que en cierta medida puede explicar las alteraciones inflamatorias del SNC bajo dietas pobres en ácidos grasos esenciales y la necesidad del balance lipídico en el sistema de endomembranas para mantener el aclaramiento de agregados proteicos y la homeostasis celular.

Otro actor fundamental en los procesos lipídicos degenerativos son la desaturasas, entre estas, la enzima desaturasa de ácidos grasos monoinsaturados, la stearyl coenzima A desaturasa 1 (SCD1), es de gran importancia para el metabolismo lipídico dentro de la UNV. Cuenta con cuatro isoformas en el genoma del ratón (1-4) y sólo dos en el genoma humano (1 y 5),

siendo la isoforma 1 expresada en hígado, pulmones, corazón, cerebro, páncreas, tejido adiposo adulto y músculo esquelético, mientras que la isoforma 5 solo es expresada en cerebro y páncreas, siendo las enzimas SCD1 de ratón y humano compatibles en un 85% de homología, mientras que la isoforma 5 humana difiere considerablemente de todas las isoformas de roedores (Wang, J., et al, 2005). Esta enzima se encarga de tomar ácidos grasos saturados, en especial palmitoil-CoA (16:0) y estearoil-CoA (18:0) para introducirles un doble enlace cis en la posición delta 9 (entre los carbonos 9 y 10) de la cadena carbonada. De este modo, se obtienen los ácidos grasos monoinsaturados palmitoleico (16:1) y oléico (18:1) que son los más abundantes en fosfolípidos, esterios de colesterol y triglicéridos, y que sirven como plantilla para que otras enzimas poli-insaturadas puedan generar la extensa gama de PUFAs (Uto Y., 2016). Dentro de la asociación de la enfermedad de Alzheimer con desórdenes del metabolismo lipídico (Chan, R. B., et al, 2012), la enzima SCD1 ha entrado en escena (Astarita, G., et al, 2011), pero hasta ahora, los mecanismos moleculares por los cuales esta enzima se asocia con el desarrollo de la enfermedad, son desconocidos. Sin embargo, es posible que la identidad de los fosfolípidos ingresados a la neurona luego de ser procesados por la SCD1 astrocítica (Polo-Hernández, E., et al, 2014; Polo-Hernández, E., et al, 2010), sea un factor esencial en el establecimiento del balance lipídico neuronal. De hecho, en los tejidos de cerebro de pacientes con Alzheimer se ha logrado determinar que además de la elevación de MUFAs, también hay una sobreexpresión de mRNA que codifica para la SCD1 (Astarita, G., et al, 2011), mientras que en cultivos primarios de neuronas la disminución de marcadores de inflamación y de demencia como cPLA2, ciclooxigenasa 2 (COX2) y p-Tau, tras el silenciamiento de BACE1, requiere de la participación de esta desaturasa (Villamil-Ortiz, J. G., et al, 2018), y en macrófagos, los péptidos A β disparan moléculas de inflamación al parecer mediados por la sobreexpresión de SCD1 (Uryu, S., et al, 2003).

A pesar de que no es claro el papel que tiene la elevación de SCD1 en el desarrollo de la patología, ni el papel que pueden desempeñar estos MUFAs, se conoce que SCD1 es pieza fundamental en los desórdenes metabólicos periféricos, tales como la hiperlipidemia y la resistencia a la insulina (Antu, K. A., et al, 2016), cuyas consecuencias se ven reflejadas en la pérdida de la homeostasis energética y la conducción a eventos de hipoxia en el tejido cerebral (Szablewski L., 2017). De acuerdo al aumento de estos MUFAs asociados a la

enfermedad, se ha sugerido que podrían causar daño por afectar la proporción o reemplazar ácidos grasos esenciales poli-insaturados (PUFAS) como el DHA, cuya carencia está relacionada con desórdenes neurológicos (Starčević, K., et al, 2018). Se ha descrito que los MUFAs son precursores de otros ácidos grasos insaturados como mecanismo de protección de la función cognitiva, por lo menos, si consideramos que una dieta rica en estos PUFAs, puede prevenir la demencia durante el envejecimiento (Assmann, K. E., et al, 2018); así, por el contrario, las dietas ricas en SFAs se asocian con mayor susceptibilidad de padecer la enfermedad (Solfrizzi, V., et al, 2005). Lo que es consistente con los ácidos grasos saturados que ingresan desde la circulación al parénquima y una vez allí son insaturados por la SCD1 astrocitaria para formar ácido oleico, con el fin de alimentar el desarrollo de la sinaptogénesis, la migración, la axonogénesis y el crecimiento neuronal (Polo-Hernández, E., et al, 2014; Polo-Hernández, E., et al, 2010), indicando que en un escenario de crecimiento celular se requiere de la obtención tanto de MUFAs como de PUFAs. Esto explica porqué en los tumores cancerígenos se requiere el reclutamiento excesivo de nuevos ácidos grasos para formar sus estructuras celulares y por qué el tratamiento con inhibidores de SCD1 es prometedor en carcinomas renales, carcinomas anaplásicos de la tiroides y en cultivos de células cancerígenas donde el suplemento de suero rico en ácidos grasos reduce el éxito de la inhibición de SCD1.

Bajo esta premisa, la inhibición de SCD1 promete para el tratamiento de la carcinogénesis, además de enfermedades relacionadas con el envejecimiento, como el Alzheimer, dónde, a pesar de no haber un desarrollo celular masivo, hay una necesidad por mantener la integridad de las neuronas maduras, donde el ingreso de MUFAs y PUFAs al no ser una necesidad celular básica, se dá un exceso de lípidos que irrumpen la recuperación y forman material precursor de procesos inflamatorios (Roongta, U. V., et al, 2011; Xin, Z., et al, 2008). Con todo esto, la sobreexpresión de SCD1 apunta a ser un buen biomarcador de la agresividad de ciertos tipos de cancer y en un biomarcador de seguimiento a la respuesta a los tratamientos de la enfermedad. Y en cuanto a la EA, otras observaciones indican que SCD1 puede influir en la maduración del autofagosoma a través de la inducción en la transición de la proteína asociada a microtúbulos desde su forma citoplasmática LC3-I a su forma adherida a autofagosoma LC3-II, paso que se requiere para que el autofagosoma pueda madurar (Huang, G. M., et al, 2015). Mientras que la reducción de SCD1 en circulación disminuye la relación

18:1/18:0 en plasma y en especial en VLDL, lipoproteínas que pueden cruzar la BHE en condiciones de debilitamiento y que están presentes en tejidos cerebrales humanos o modelos animales neurodegenerativos (Peter, A., et al, 2009). Además, el índice de saturación (relación 16:1/16:0) está elevado en la corteza frontal media de pacientes que presentan los más bajos puntajes en test neurológicos (Astarita, G., et al, 2011), por lo que cobra sentido el hecho de que la elevación de SCD1 y sus productos metabólicos esten asociados con la enfermedad. Sin embargo, los mecanismos moleculares de la relación de SCD1 con la neurodegeneración siguen siendo un enigma porque es difícil explicar que la sobreexpresión de SCD1 en cultivos de neuronas con expresión de APP resulten en el aumento de secreción de de A β 1-42, cuando se supone que el fundamento de la vía amiloidogénica parte del sustento de sus precursores proteicos y enzimáticos en balsas lipídicas ricas en ácidos grasos saturados y no en ácidos grasos insaturados. De acuerdo a esto, la asociación de SCD1 con el daño neuronal podría deberse a una actividad tóxica de los MUFAs hacia neuronas comprometidas en medio de un evento adverso (Bartel, P.L., et al, 2007) y es por esto que el aumento en la diferencia entre la relación de MUFAs y SFA, sea directamente proporcional a la obtención de los puntajes más bajos en un test de competencia cognitiva en pacientes con Alzheimer (Astarita, G., et al, 2011). Finalmente, dentro de la UNV, el astrocito es la célula en especial, donde SCD1 lleva a cabo la desaturación de los ácidos grasos que eventualmente servirán de materia prima para las diferentes necesidades requeridas por la neurona (Polo-Hernández, E., et al, 2014; Polo-Hernández, E., et al, 2010), por lo que el metabolismo lipídico desde el astrocito es fundamental para el equilibrio homeostático dentro de la UNV. Además, el cambio en la firma lipídica tanto en el cerebro como en otros tejidos relacionados puede ser testigo de procesos patológicos en curso, y tal vez, procesos de recuperación. De acuerdo a lo anterior, nos planteamos la siguiente pregunta:

3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN:

¿Cuál es el efecto de la supresión de BACE1 y SCD1 en un contexto isquémico *in vivo* y la toxicidad por glutamato *in vitro* sobre la composición de ácidos grasos de fosfolípidos en componentes de la unidad neurovascular?

4. HIPÓTESIS:

La supresión de BACE1-SCD1 puede recuperar el perfil lipídico del hipocampo en un modelo *in vivo* de isquemia cerebral y esa inhibición BACE1-SCD1 en astrocitos puede recuperar el desbalance de fosfolípidos en neuronas y endotelio bajo un contexto de toxicidad por glutamato.

5. OBJETIVOS:

5.1 Objetivo general:

Determinar el efecto de la inhibición de BACE1 y SCD1 sobre el perfil diferencial de fosfolípidos en un modelo *in vivo* de isquemia cerebral y en el astrocito en cocultivo con neuronas y endotelio en un contexto de toxicidad por glutamato.

5.2 Objetivos específicos:

- Analizar el efecto de la supresión de BACE1 y SCD1 en un modelo *in vivo* isquémico sobre la composición de ácidos grasos de fosfolípidos en muestras de suero, hipocampo y LCR.
- Evaluar el efecto de la inhibición de BACE1 y SCD1 en los astrocitos sobre la viabilidad neuronal y endotelial, en un modelo de cocultivo astrocito-neurona y astrocito-endotelio, en un contexto de toxicidad por glutamato.
- Analizar el efecto de la inhibición de BACE1 y SCD1 en los astrocitos sobre la composición de ácidos grasos de fosfolípidos en un modelo de cocultivo astrocito-neurona y astrocito-endotelio en un contexto de toxicidad por glutamato.

6. MATERIALES Y MÉTODOS:

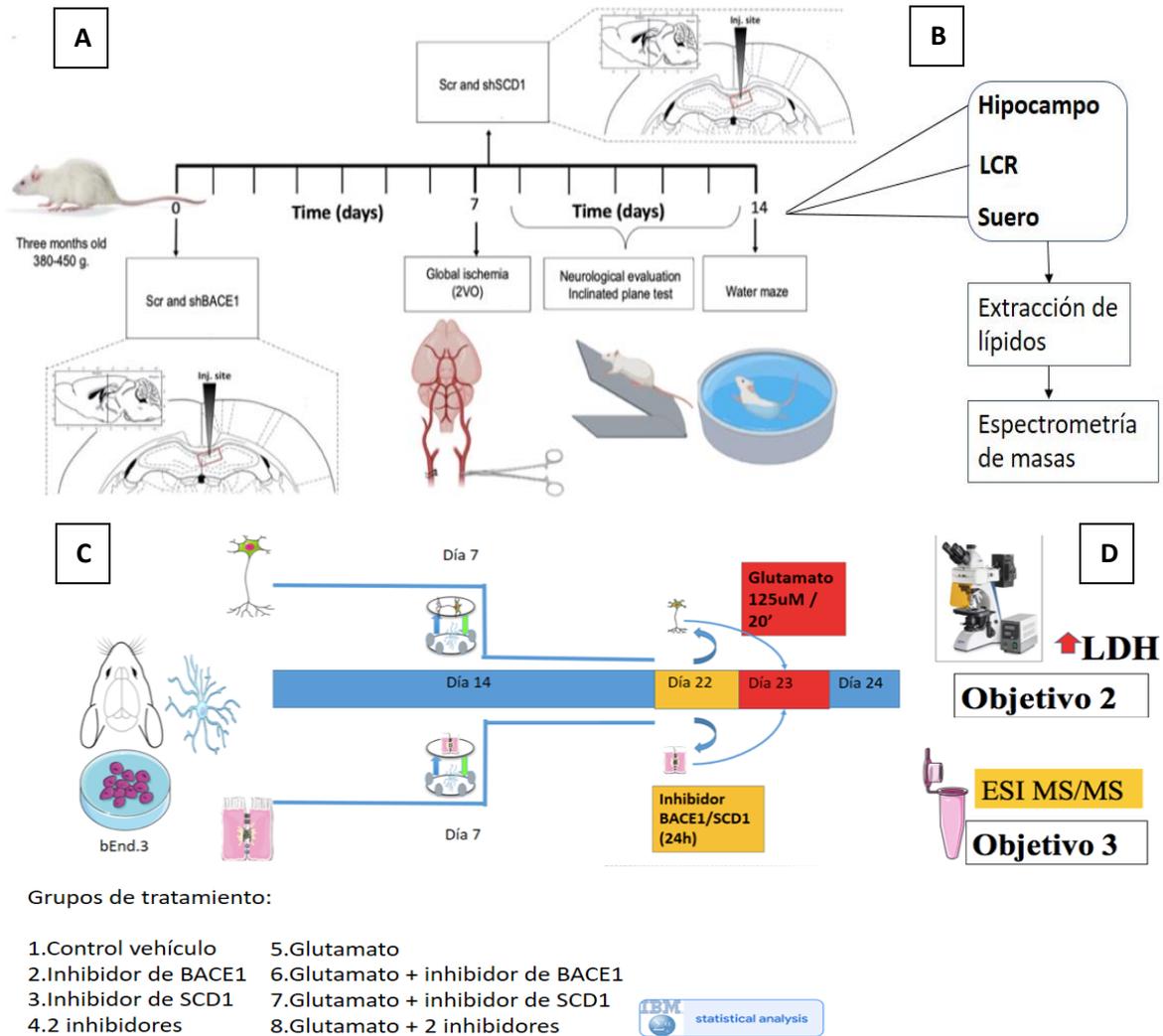


Figura 4. Flujograma de la metodología: (A) De animales isquémicos, silenciados para BACE1-SCD1 y sometidos a test neurológicos, (B) se extrajo el material lipídico de hipocampo, LCR y suero para ser analizado por espectrometría de masas. (C) Se cocultivaron neuronas y endotelio con astrocitos inhibidos para BACE1-SCD1 y se sometieron a estrés por glutamato, (D) para luego analizar las células por inmunofluorescencia, LDH y extraer su material lipídico, para ser evaluado por espectrometría de masas, y finalmente procesar los datos con el programa estadístico SPSS.

6.1 Animales:

Los procedimientos realizados en animales fueron llevados a cabo de acuerdo a las pautas ARRIVE, la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio 8th edición publicada en el NIH y los estándares colombianos según la ley 84/1989 y la resolución 8430/1993. Los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Se utilizaron ratas macho albinas Wistar, que fueron mantenidas en una colonia libre de patógenos en el vivario de la Sede de Investigación Universitaria -SIU, de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Fueron mantenidas en un ciclo luz/oscuridad 12:12 horas y recibieron alimentación y agua *ad libitum*, con cuidados especiales para minimizar el sufrimiento y reducir el número de animales usados. El peso de los animales osciló entre los 380 y 450 g.

6.2 Silenciamiento de BACE1 y silenciamiento de SCD1 *in vivo*

Los animales fueron anestesiados con ketamina al 5% y xilacina al 2%, en una dosis 50:5 mg/kg e inyectados con 1 μ L de un vector viral adenoasociado que expresa una secuencia corta desordenada AAV2-shSCRmiR (shSCRmiR) ó una secuencia corta dirigida contra el RNA de BACE1 AAV2-shBACE1miR (shBACE1miR) en las coordenadas bregma 2.52mm anteroposterior, 0.8 mm a la derecha y 3.6 mm dorsoventral del hipocampo derecho. Estas inyecciones fueron realizadas con una jeringa de 10 μ L (Hamilton, Reno, NV, USA) a 0.1 μ L/min y luego de 10 minutos transcurridos después de la infusión, se retiró la jeringa. Sumado a esto, después de 30 minutos de la isquemia cerebral global, los animales fueron inyectados con 2 μ L de lentivirus con secuencias cortas desordenadas de RNA (shSCR) o secuencias cortas de RNA contra SCD1 (shSCD1) (Santa Cruz, Biotech) en las coordenadas bregma 2.52mm anteroposterior, 0.8 mm a la derecha y 3.6 mm dorsoventral del hipocampo derecho, con una jeringa de 10 μ L (Hamilton, Reno, NV, USA) a 0.1 μ L/min y el retiro de la jeringa luego de 10 minutos transcurridos después de la infusión. Finalmente, se realizaron los test neurológicos y luego de transcurrido un mes pos-isquemia, los animales fueron sacrificados para realizar el análisis lipídico.

6.3 Isquemia cerebral global (2-VO)

Luego de una semana de haber realizado la inyección con el shBACE1miR, los animales fueron anestesiados usando ketamina (60 mg/kg) xilacina (5mg/kg) y recibieron isoflurano entre 2 y 4% mezclado con 96% de oxígeno a través de una máquina de inhalación para anestesia. Se implementó una variación del modelo de isquemia cerebral global, utilizando la oclusión de 2 vasos (2-VO) (Marosi et al., 2006). Se ocluyó de manera permanente la arteria carotida común (CCA) derecha usando una sutura de nylon calibre 6.0 (Corpaul, Bogotá, Colombia), y la CCA izquierda fue obstruida por 20 minutos usando un clip vascular, el cual fue retirado permitiendo la reperusión sanguínea. Mientras que las ratas control (sham) recibieron el mismo procedimiento sin la oclusión de CCA.

6.4 Evaluación neurológica

6.4.1 Test de García

El rendimiento neurológico fue evaluado 6 horas después de realizada la isquemia cerebral. Se trabajó sobre un puntaje total de 18 puntos basado en el test de García (García et al., 1995). El puntaje neurológico se dividió en 6 subtest diferentes: 1) Actividad espontánea, 2) simetría en el movimiento de las extremidades, 3) Estiramiento de la pata delantera, 4) Escalada, 5) Propiocepción del cuerpo y 6) Respuesta al tacto vibratorio. Cada test tuvo un máximo de 3 puntos basado en un set de criterios predeterminados, como fue descrito por García et al. Se sumó el puntaje de cada test, donde el máximo de 18 puntos indicaba ausencia de déficit neurológico, mientras que el puntaje más bajo posible sería de tres, indicando un daño severo. Las evaluaciones neurológicas se realizaron diariamente en el mismo orden.

6.4.2 Test del plano inclinado:

Seis horas después de la cirugía 2-VO y por los siguientes siete días, se evaluó la capacidad de cada animal para mantener la estabilidad de su postura usando el test del plano inclinado. Las ratas se colocaron sobre una superficie de madera lisa cubierta con una almohadilla de goma y se procedió a la inclinación del plano. El eje del cuerpo es paralelo al eje vertical del plano. El ángulo del plano fue incrementado 5 grados cada trial. El ángulo relativo al cual las

ratas no podían mantenerse en posición por 10 segundos fue anotado como el puntaje final y se consideró como una medida de daño funcional.

6.4.3 Test del laberinto acuático de Morris:

Los animales fueron evaluados usando el test del laberinto acuático de Morris dos semanas luego de la inyección con shBACEmiR y una semana luego de la isquemia 2-VO y la inyección de shSCD1. El test fue llevado a cabo en un tanque de plástico de color negro con agua entre los 22 ± 2 °C, donde una plataforma de 12 cm de diámetro fue sumergida 3 cm bajo la superficie durante las pruebas de aprendizaje espacial, memoria y re-aprendizaje, y 1.5 cm por encima de la superficie del agua durante la prueba de visibilidad. Se mantuvieron señales visuales alrededor del cuarto durante el experimento. Seis sesiones fueron realizadas para el desarrollo de la evaluación de aprendizaje. Y cada sesión consistió en cuatro subtriales sucesivos (cada trial duró 90 segundos y el tiempo entre trials fue de 30 segundos), cada subtrial comenzó con cada rata situada de manera aleatoria en una de cuatro localizaciones de inicio (N, S, W, E). Los animales fueron entonces provistos de 48 horas como periodo de retención, seguido de una prueba de referencia espacial de la memoria, en la cual los animales fueron situados en el tanque sin la plataforma por 90 segundos. La latencia, fue grabada como el tiempo que tardaba el animal en pasar por el sitio exacto donde estaba ubicada la plataforma. Sunsecuentemente, la plataforma fue movida a una nueva localización. La habilidad de cada animal para aprender la nueva localización fue medida como la latencia en cuatro sesiones llevadas a cabo de la misma manera que la fase de aprendizaje. La latencia para llegar a la plataforma fue evaluada usando una plataforma visible para controlar otros posibles factores de intervención como habilidades visual-motoras o de motivación entre los grupos experimentales. El comportamiento de los animales fue grabado usando un sistema automatizado (Viewpoint, Lyon, France).

6.5 Análisis de lípidos

6.5.1 Análisis de lípidos de muestras de animales y cultivos celulares:

Aproximadamente 0.5 g de hipocampo, 0.01 ml de fluido cerebroespinal (CSF) y 0.5 ml de suero de ratas isquémicas silenciadas para BACE1-SCD1 directamente sobre el hipocampo (coordenadas bregma: 2,52 mm anteroposterior, 0.8 mm derecha, y 3,6 mm dorsoventral), y 1.5×10^5 neuronas y células endoteliales cocultivadas con astrocitos inhibidos para BACE1-SCD1 y suspendidas en buffer salino fosfatado al 1% (PBS 1%) fueron procesados individualmente de acuerdo a la técnica de Folch para la extracción de lípidos (Folch et al., 1957) usando una mezcla de 2 ml de cloroformo (CHCl_3) y 1 ml de metanol (CH_3OH) en una relación 2:1 (v/v). Luego se adicionó 0.005% de hidroxitolueno butilado y con esta mezcla se homogenizaron las muestras. Luego, 1 ml de cloruro de sodio (NaCl) al 0.9% fue adicionado y la mezcla total fue centrifugada a 3000 rpm por 3 minutos. La fase orgánica (la fase más baja) fue removida y transferida a un tubo de vidrio. El solvente orgánico fue evaporado y a los extractos liofilizados restantes se les removió el exceso de humedad. Estos lípidos secos fueron en promedio 7,1 mg para el hipocampo derecho, 0,28 mg para el CSF y 2.9 mg para el suero. Finalmente, los lípidos fueron analizados por espectrometría de masas.

6.5.2 Espectrometría de masas

Se utilizó un método automatizado (ESI-MS/MS). La adquisición de los datos fue realizada por el Centro en Investigación Lipidómica de la Universidad de Kansas usando un sistema de detección API 4000™ y QTRAP (4000 QTRAP) como fue descrito por Zhou et al., 2012. El protocolo permitió la detección y cuantificación de bajas concentraciones de componentes lipídicos polares. La identidad de las moléculas fue determinada por la razón masa/carga que luego fue comparada con sus estándares internos respectivos para definir cada una de las especies lipídicas que se encontraban en el extracto evaluado: 0.30 nmol de 14:0 LPG (liso-fosfatidilglicerol), 0.30 nmol de 18:0 LPG, 0.30 nmol de 14:0 PG (fosfatidilglicerol), 0.30 nmol de 14:0 LPE (liso-fosfatidiletanolamina), 0.30 nmol de 18:0 LPE, 0.60 nmol de 13:0 LPC (liso-fosfatidilcolina), 0.60 nmol de 19:0 LPC, 0.60 nmol de 12:0 PC (fosfatidilcolina),

0.60 nmol de 24:1 PC, 0.30 nmol de 14:0 LPA (liso-ácido fosfatídico), 0.30 nmol de 18:0 LPA, 0.30 nmol de 14:0 PA (ácido fosfatídico), 0.30 nmol de 20:0 (phytanoyl)-PA, 0.20 nmol de 14:0 PS (fosfatidilserina), 0.20 nmol de Phy PS, 0.28 nmol de 16:0-18:0 PI (fosfatidilinositol), and 0.10 nmol de 18:0 PI. El sistema identificó 13 especies diferentes de lípidos y sus respectivas subespecies, las cuales fueron reconocidas por su número de carbonos y el grado de insaturación de sus cadenas carbonadas. La concentración de lípidos fue normalizada a la concentración molar para todas las especies según el peso de cada muestra. Los datos finales fueron presentados como % mol promedio.

6.6 Cultivos celulares

6.6.1 Cultivo primario de astrocitos de neonatos de rata Wistar

Los astrocitos fueron obtenidos desde cultivos primarios de astrocitos corticales del cerebro de ratas Wistar con una edad post-natal de un día, como fue descrito previamente (Posada-Duque et al., 2015). Las cortezas fueron diseccionadas utilizando una mezcla de tripsina/EDTA al 0.25% (Gibco, 15400054, Waltham, Massachusetts, USA) por 15 minutos. Luego fueron centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos y se retiró la mayor cantidad posible de la solución tripsina/EDTA. El material celular restante fue resuspendido en DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, US), cultivado en frascos T75 (superficie de área de 75 cm²) y mantenido en el medio DMEM suplementado con suero bovino fetal (SBF 10%) y con una mezcla de antibióticos al 1% de penicilina-streptomina (Gibco). Luego, las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. El medio de cultivo fue cambiado con una frecuencia de dos días. Aproximadamente entre el día *in vitro* (DIV) 8 a 10, los frascos fueron sometidos a agitación de 350 rpm por tres días con cambios intermedios de medio nuevo DMEM para retirar la mayor cantidad posible de microglía y oligodendrocitos contaminantes. Y en estas condiciones se mantuvieron hasta subcultivarlos en platos de 12 pozos.

6.6.2 Cultivo de células endoteliales, línea celular bEnd.3

La línea celular endotelial de microvasculatura de cerebro murino bEnd.3 (ATCC CRL-2299, Manassas, Virginia, US) se utilizó como un modelo de endotelio vascular como fue descrito

previamente (Becerra-Calixto et al., 2018). Las células bEnd.3 fueron descongeladas en cajas de cristal de poliestireno (petri) de 100 mm (p100) en DMEM (Sigma-Aldrich) suplementado con suero bovino fetal (SBF 20%) y con una mezcla de antibióticos al 1% de penicilina-streptomina (Gibco), y llevadas a 37°C con 5% de CO₂. Luego de 24 horas el medio fue reemplazado por medio de mantenimiento (DMEM con 10% SBF y 1% penicilina-streptomina) y mantenidas en 37°C con 5% de CO₂.

Luego se realizaron subcultivos utilizando tripsina/EDTA al 0.25% (Gibco, 15400054) por 5 minutos y entonces fueron subcultivadas en platos de 12 pozos con cristales cubiertos con un polímero de gelatina y llevadas a una densidad de 1.5×10^5 células por pozo.

6.6.3 Cultivo primario de neuronas de embriones de rata Wistar

Las neuronas fueron obtenidas de la corteza de ratas Wistar con una edad embrionaria entre el día 18 y 19 (E18-19). Estas cortezas fueron diseccionadas utilizando una mezcla de tripsina/EDTA al 0.25% (Gibco, 15400054) por 15 minutos. Luego fueron centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos y se retiró la mayor cantidad posible de la solución tripsina/EDTA. El material celular resultante fue resuspendido en medio plating (DMEM, suero de caballo 10% y penicilina-streptomina 1%) y cultivado en platos de 12 pozos con cristales recubiertos de poly-L-lysina (Sigma-Aldrich, St, Louis, Missouri, USA) y con cuatro puntos de parafina en sus extremos, la concentración celular fue llevada a 1.5×10^5 células por pozo. Luego de dos horas, el medio plating fue cambiado por medio neurobasal (Gibco™ 21103049, Rockville, Maryland, USA), el cual contenía suplemento B-27 (Sigma-Aldrich), albúmina de huevo de pollo (Sigma-Aldrich) y una mezcla de antibióticos al 1% de penicilina-streptomina (Gibco) y citosina arabinósido (AraC) a una concentración 500nm para impedir el crecimiento de células gliales. Al día siguiente el AraC fue diluído a 50nm y las células fueron mantenidas en estas condiciones hasta realizar el cocultivo con los astrocitos.

6.6.4 Cocultivo de astrocitos y endotelio

En el DIV11 los astrocitos se tripsinizaron nuevamente utilizando la mezcla de tripsina/EDTA al 0.25% (Gibco, 15400054) por 5 minutos y entonces fueron subcultivados en cristales en platos de 12 pozos, a una densidad de 1.5×10^5 células por pozo.

Las células bEnd.3 fueron también subcultivadas en cristales gelatinizados con cuatro puntos de parafina en sus extremos y allí se mantuvieron hasta que los astrocitos alcanzaran el DIV15, fecha en la cual se realizó el cocultivo. Los puntos de parafina permiten superponer el cristal de los astrocitos sobre el cristal de las células endoteliales sin que ambas células estuviesen en contacto directo para evitar el daño mecánico y permitir compartir el medio de cultivo. En el DIV15 de los astrocitos se hizo el montaje del cocultivo y ambas células se mantuvieron en 37°C con 5% de CO₂. En el DIV21 de los astrocitos, el cocultivo fue desensamblado para inhibir BACE1 y SCD1 solamente en los astrocitos y luego de 24 horas, el cocultivo fue ensamblado y tratado con glutamato 125 μM (Becerra-Calixto et al., 2018). Al DIV23 se recolectó el medio de cultivo para medir citotoxicidad y ambos tipos de células fueron fijadas para realizar tinción de inmunofluorescencia.

6.6.5 Cocultivo de astrocitos y neuronas

En el DIV11 los astrocitos se tripsinizaron nuevamente utilizando la mezcla de tripsina/EDTA al 0.25% (Gibco, 15400054) por 5 minutos y entonces fueron subcultivados sobre cristales en platos de 12 pozos, a una densidad de 1.5 X10⁵ células por pozo. Así fueron mantenidos hasta el DIV14 en el cual se les cambió el medio DMEM por medio neurobasal. En el día DIV15 de los astrocitos y DIV7 de las neuronas, ambos cristales fueron ensamblados y ambas células se mantuvieron en medio neurobasal a 37°C con 5% de CO₂. En el DIV21 de los astrocitos, el cocultivo fue desensamblado para inhibir BACE1 y SCD1 solamente en los astrocitos y luego de 24 horas, el cocultivo fue ensamblado y tratado con glutamato 125 μM (Becerra-Calixto et al., 2018). Al DIV23 se recolectó el medio de cultivo para medir citotoxicidad y ambos tipos de células fueron fijadas para realizar tinción de inmunofluorescencia.

6.6.6 Tratamientos con inhibidores de BACE1 y SCD1 *in vitro* en los astrocitos e inducción de toxicidad con glutamato en los diferentes tipos de células

Los astrocitos fueron tratados en el DIV21 con el inhibidor IV de β-secretasa (797035-11-1) a 1 μM y con el inhibidor de SCD1 (CAY 10566) a 10 μM. Veinticuatro horas más tarde, ambas células (astrocitos-neuronas y astrocitos-endotelio) fueron tratadas con glutamato a 125 μM por 20 minutos. Finalmente, al DIV23 de los astrocitos se recolectó el medio para

medir citotoxicidad y se desensambló el cocultivo para fijar ambas células y realizar inmunotinción.

6.6.7 Evaluación de citotoxicidad por liberación de LDH en el medio de los cocultivos

La citotoxicidad se midió a través del porcentaje de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) con el Kit de Detección de Citotoxicidad LDH (Roche Diagnostics GmbH). El ensayo se llevó a cabo mezclando el medio con dos soluciones del kit; esta mezcla se incubó por 30 minutos en ausencia de luz y posteriormente se midieron las absorbancias de cada una de las muestras a una longitud de onda de 490 nm en un lector de microplaca (BIO RAD iMARK™, Hercules, California, US). El valor de las absorbancias fue utilizado para calcular el porcentaje de liberación de LDH con la siguiente fórmula: % Liberación LDH= ((A-control bajo)/(control alto-control bajo)) * 100, de donde A fue el valor de la absorbancia indicando el nivel de actividad de LDH para cada muestra, el control bajo fue el valor de la absorbancia que indica la actividad basal de LDH liberado por las células sin tratamiento y el control alto fue la medida máxima de liberación de LDH por las células tratadas con 1% de Tritón X-100.

6.6.8 Inmunofluorescencia *in vitro* para astrocitos, neuronas y células endoteliales

Los cultivos celulares fueron fijados con paraformaldehído al 4% en buffer de citoesqueleto con sucrosa (CBS) (Posada-Duque et al., 2017). La autofluorescencia fue eliminada utilizando cloruro de amonio (NH₄Cl) 50 mM por 10 minutos. Luego, las células fueron permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.2% preparado en CBS y posteriormente se trataron con SBF al 2.5% en CBS para bloquear las uniones antígeno-anticuerpo inespecíficas. Los cultivos se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpo monoclonal de ratón contra SCD1 1:500 (E-8 Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, US) para astrocitos neuronas y endotelio, anticuerpo policlonal de conejo contra GFAP 1:250 (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, US) para los astrocitos y anticuerpo monoclonal de rata contra zónula ocludens (ZO-1) 1:400 (Santa Cruz Biotechnology) en células bEnd.3. Al día siguiente, los cultivos fueron incubados por 30 minutos en ausencia de luz con anticuerpos secundarios Alexa 488 ó Alexa 594 1:500 (Molecular Probes, Eugene, Oregon, United States), el citoesqueleto fue teñido con la sonda phalloidin conjugada con Alexa 594 1:500 (Molecular

Probes) para las neuronas y el núcleo fue teñido con Hoechst 33258 1:5000 (Invitrogen) para los tres tipos de células. Finalmente se realizaron tres lavados seriados con buffer fosfato salino (PBS) y los cristales con las células inmunomarcadas fueron fijadas a portaobjetos con FluorSave. Las células se observaron con un microscopio de epifluorescencia Olympus IX 81 y se capturaron 20 imágenes con aceite de inmersión en el objetivo de 60X, NA 1.42 para cada uno de los grupos de tratamiento. Cada imagen estuvo compuesta por tres canales: azul, rojo y verde, más un “merge” compuesto por las anteriores. Finalmente, las imágenes fueron cuantificadas utilizando el software ImageJ (NIH).

6.6.9 Análisis morfológico de astrocitos, neuronas y células endoteliales

6.6.9.1 Núcleos condensados

El promedio de núcleos condensados fue cuantificado con la ayuda de la herramienta “Count and measure objects” del software Image-Pro Plus, donde los núcleos con un diámetro entre 3.0 y 6.0 μm fueron definidos como condensados. El porcentaje de núcleos condensados fue calculado con la fórmula: $\% \text{ núcleos condensados} = [(\text{núcleos condensados} / (\text{núcleos condensados} + \text{núcleos normales})) \times 100$.

6.6.9.2 Cuantificación de la intensidad de fluorescencia

Primero se sustrajo el background de cada imagen a partir de un sector arbitrario que no contenía células utilizando la herramienta “sustraer” del software ImageJ (NIH). Luego se midió la intensidad de fluorescencia (IF) para SCD1 en neuronas, astrocitos y endotelio, y para GFAP en astrocitos, de acuerdo al valor de intensidad usando la herramienta “Measure tool” en el software ImageJ (NIH) para el respectivo canal de color, y el valor fue relativizado sobre el área de la célula.

6.6.9.3 Fluorogramas

Para determinar la distribución de SCD1 en los tres tipos celulares, se trazó una línea blanca de 50 μm a través de las células, pasando por la membrana, citoplasma y núcleo con la ayuda de la herramienta “Line profile” del software ImageJ (NIH). Este procedimiento fue realizado

en 20 células para cada uno de los 4 n experimentales y finalmente se eligió el perfil más representativo para cada tratamiento.

7 Análisis estadístico

Para el análisis de lipidómica, los niveles de cada lípido se calcularon como el % Mol de la sumatoria del total de número de moles de todas las especies lipídicas, y luego, a estos datos se les determinó la normalidad usando la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los datos no paramétricos fueron comparados usando el Test de Kruskal-Wallis y en el caso de encontrar diferencias estadísticamente significativas, se procedió a usar la prueba post hoc T3 Dunnett para determinar entre cuales grupos de tratamiento se encontraban dichas diferencias. Además, sobre la lipidómica se realizó un análisis multivariado usando el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) (Lee et al., 2018). Esta técnica permite trabajar con pocas muestras y muchas variables (Ruiz-Perez et al., 2020) como fue el diseño para los experimentos *in vivo*. La importancia de cada variable fue determinada de acuerdo a la proyección de importancia de la variable (VIP) (Mehmood et al., 2012). Esta es una proporción de la varianza ponderada explicada por la covarianza entre las variables predictoras y la variable dependiente. También se incluyó el índice de significancia de correlación multivariante (sMC) (Than et al., 2014), que es similar al VIP pero que descarta la varianza residual en la variable predictora, lo cual podría ser información no relevante para discriminar entre los grupos.

Los datos de las inmunofluorescencias de los cocultivos también fueron analizados por la prueba Kolmogorov-Smirnov para determinar la naturaleza de su distribución, de manera que los datos no paramétricos fueron comparados usando el Test de Kruskal-Wallis con la prueba T3 Dunnett y los datos paramétricos se compararon usando ANOVA de una vía y la prueba HSD Tukey.

Los resultados se consideraron bajo un nivel de significancia del 95% ($p < 0.05$), donde * indica $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ y los datos de la estadística univariada fueron expresados como la media \pm SEM. El análisis de los datos fue realizado utilizando el software estadístico SPSS-IBM Statistics 27.

7. RESULTADOS:

7.1 El doble silenciamiento de BACE1-SCD1 en el hipocampo de las ratas, recupera la actividad de la memoria, luego de sufrir el evento isquémico global:

El evento de isquemia global (2VO), produce daño cognitivo y taupatía (Villamil-Ortiz et al., 2016; Gutierrez-Vargas et al., 2015). El test de evaluación de función neurológica fue llevado a cabo en una serie de pruebas que suman en total 18 puntos, siendo éste el valor que indica la ausencia de daño neurológico, y el valor más bajo, la lesión más grave (García et al., 1995). A las 6 horas pos isquemia, los animales isquémicos presentaron los puntajes más bajos (líneas gris, roja, púrpura y verde oscuro), contrario a los animales control (líneas rosa, azul claro, verde claro y marrón) (* $p < 0.05$). Los animales bajo el doble silenciamiento (shBACE1- shSCD1) (línea verde oscura) presentaron reducción en el daño neurológico, diferenciándose significativamente de los demás grupos isquémicos en los días 5, 6 y 7 posteriores a la isquemia (* $p < 0.05$) (Figura 5A). Sumado a lo anterior, tras la isquemia, los animales presentaron el mayor déficit para resistir la inclinación de la plataforma (34.4° y 34.2° a los 6 y 7 días) (línea gris), mientras que el grupo isquémico doblemente silenciado mejoró sustancialmente la resistencia en estos animales (línea verde oscura). Además, la reducción para BACE1 o SCD1 individualmente tras la isquemia, dejó mayor resistencia que los animales isquémicos sin tratar, sugiriendo un efecto sinérgico entre ambos genes (línea roja y línea púrpura). Incluso, la doble inhibición, presentó una mejoría en los animales control (línea marrón) (Figura 5B). En el test de aprendizaje, no se observaron diferencias entre los diferentes grupos de tratamiento (Figura 5C). Luego de una semana de la isquemia, los animales con el silenciamiento dual presentaron una mejora en la habilidad de la memoria espacial (línea verde oscura) comparado con los animales isquémicos sin tratamiento (línea gris) (* $p < 0.05$) (Figura 5D). En la prueba de re-aprendizaje, tampoco se encontraron diferencias entre los diferentes grupos (Figura 5E). Mientras que en la prueba de memoria de transferencia, se observó nuevamente la mejor habilidad para los animales con el silenciamiento dual (barra verde oscura) (Figura 5F). Finalmente, no se observaron diferencias visuales, motoras o motivacionales entre los diferentes grupos experimentales (Figura 5H).

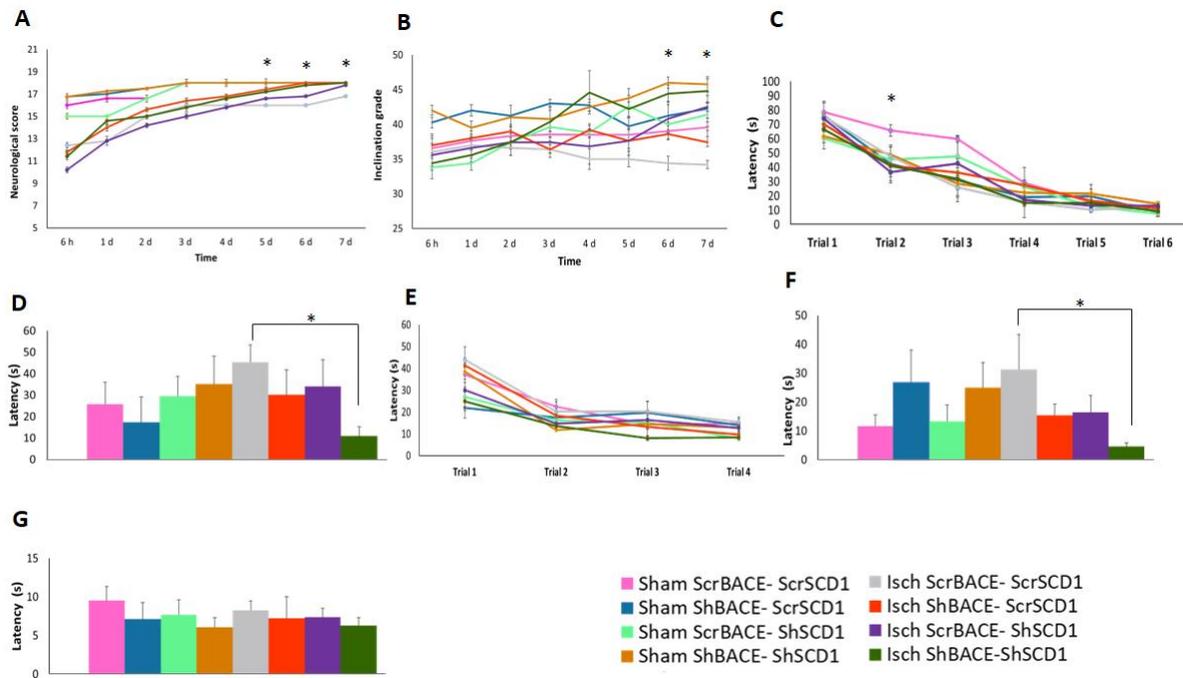


Figura 5. Resultados de recuperación neurológica, de aprendizaje y de memoria pos-isquemia en ratas silenciadas para BACE1 y SCD1 en el hipocampo. (A) Test neurológico de García, basado en: 1- actividad espontánea, 2- simetría en el movimiento de las extremidades, 3- estiramiento de la pata delantera, 4- escalada, 5- propiocepción del cuerpo y 6- respuesta al tacto vibratorio. Cada prueba tiene un valor de 3 puntos, siendo 18 el máximo puntaje que indica la ausencia de déficit neurológico. (B) Test del plano inclinado. Y el laberinto acuático de Morris basado en: (C) prueba de aprendizaje, (D) Memoria, (E) Re-aprendizaje, (F) Evocación de la memoria y (G) Test visual. La convención de colores correspondientes a cada uno de los grupos de tratamiento se encuentra en la parte inferior derecha del recuadro. * $p < 0.05$.

7.2 Tras la isquemia, el doble silenciamiento de BACE1-SCD1 induce cambios en el perfil fosfolipídico del hipocampo asociado a ácido araquidónico y ácidos grasos saturados:

A partir de los resultados de recuperación neurológicos y de aprendizaje y memoria observados después de un evento isquémico en ratas, mostrado en la Figura 5, se realizó extracción de lípidos de hipocampo, líquido cefalorraquídeo y suero de ratas sham y ratas isquémicas sometidas al silenciamiento individual y dual de BACE1 y SCD1, con el fin de establecer los principales cambios fosfolipídicos que respaldaban dicha recuperación. Para ello se empleó PLS-DA como herramienta estadística para discriminar las especies de fosfolípidos con mayor aporte diferencial según la importancia de proyección de la variable (VIP) y la significancia de correlación multivariante (sMC) entre grupos experimentales. En la figura 6A se observan óvalos con colores respectivos a cada uno de los grupos control y

tratamiento, y cada n está representado por un punto dentro de un óvalo cuyo tamaño es directamente proporcional a la desviación estándar de los resultados para ese tratamiento. Esta figura muestra solapamiento entre los óvalos de todos los grupos, dos componentes no son suficientes para mostrar separabilidad entre estos. Sin embargo cuando se comparan entre sí los grupos sham, se observa que el grupo Sh BACE1- SCR SCD1 (Sh hace referencia a la secuencia corta de ARN que se utilizó para el silenciamiento, y SCR a una versión desordenada de ARN que no genera silenciamiento) y el grupo Sh BACE1- Sh SCD1 difieren de los grupos sham SCR BACE1-SCR SCD1 y SCR BACE1- Sh SCD1, resaltando con la cabeza de flecha negra que el doble silenciamiento de BACE1-SCD1 (óvalo azul) muestra una marcada separación del grupo control sham SCR BACE1- SCR SCD1 (óvalo verde oscuro), promoviendo la discriminación de especies fosfolípídicas, presentadas con mayor índice VIP y sMC: PC(34:0), PS(36:2), ePC(36:3), PS(38:4), PC(38:3) en el hipocampo (Figura 6B).

No obstante en los grupos isquémicos, el tratamiento con Sh BACE1- SCR SCD1 no fue suficiente para dispersarse respecto al grupo isquémico control, y el análisis por PLS-DA presentó mayor discriminación del grupo doblemente silenciado (flecha negra, óvalo rosado) respecto a los demás grupos isquémicos, resaltando las principales especies lipídicas discriminantes según el VIP y sMC: SM(18:0), PS(38:4), PS(36:1), LPE(16:0) y PA(38:4) (Figura 6C). Es de señalar que dos de estas especies PS(38:4) y PA(38:4) poseen ácidos grasos asociados con ácido araquidónico y ácidos grasos saturados (18:0) (SM 18:0). Cuando se generó el análisis entre dos grupos isquémicos, el de mayor afección neurológica (SCR BACE1-SCR SCD1) respecto al tratamiento dual Sh BACE1-Sh SCD1; se observó que un solo componente explica en un 92,66% la separación espacial entre los dos óvalos de manera significativa, presentando según el VIP y sMC los fosfolípidos que más aportan a dicha discriminación: SM(18:0), PA(38:4), PS(38:4), ePE(32:0) y PC(38:5). De nuevo encontramos que algunos de estos fosfolípidos cargan ácidos grasos que contienen araquidónico y ácidos grasos saturados (18:0) (Figura 6D). Ver figura suplementaria 2 para la representación de la proyección de los fosfolípidos con mayor discriminación.

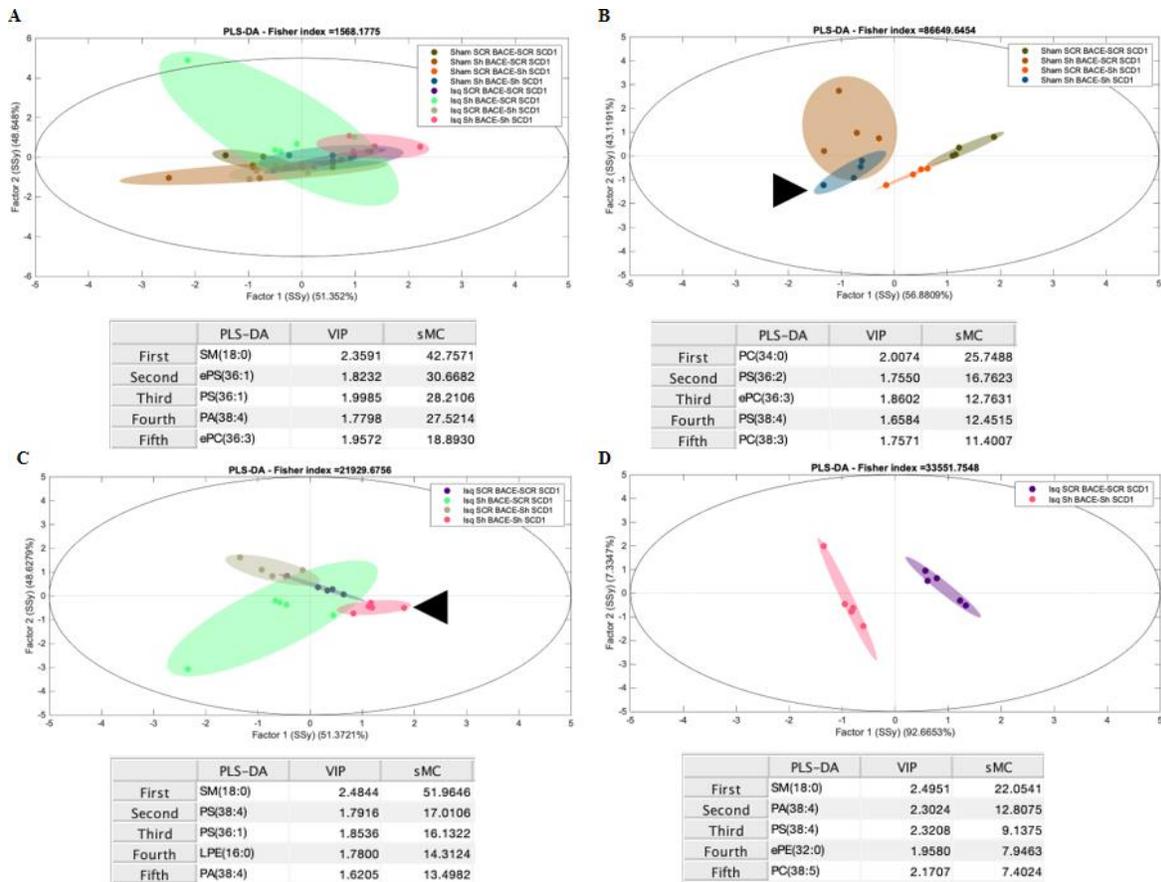


Figura 6: PLS-DA de especies fosfolípídicas en hipocampo sometido al silenciamiento de SCD1 y BACE1 en un modelo de isquemia cerebral en ratas. (A) Análisis discriminante de parciales mínimos cuadrados (PLS-DA) para especies fosfolípídicas entre todos los grupos de tratamiento en ratas sham e isquémicas. (B) PLS-DA para las especies fosfolípídicas entre los grupos de tratamiento en ratas sham. (C) PLS-DA para las especies fosfolípídicas entre los grupos de tratamiento en ratas isquémicas. (D) PLS-DA para las especies fosfolípídicas entre los grupos de tratamiento SCR BACE1- SCR SCD1 y Sh BACE1- Sh SCD1 en las ratas isquémicas. La cabeza de flecha indica la discriminación del grupo doblemente silenciado para BACE1-SCD1. En la parte inferior de cada figura se especifican los fosfolípidos más discriminantes según los puntajes de proyección de importancia de la variable (VIP) y la significancia de correlación multivariante (sMC). (n=4-5).

7.3 Tras la isquemia, el doble silenciamiento de BACE1-SCD1 generó cambios en el perfil fosfolípídico del líquido cefalorraquídeo, principalmente en PLs asociados a PUFAs y ácidos grasos saturados:

Cuando evaluamos el LCR, encontramos que se presentó mayor dispersión entre grupos a diferencia del hipocampo. Particularmente, el grupo isquémico doblemente silenciado presenta mayor separación de los demás grupos (Figura 7A). Tanto en los grupos Sham (Figura 7B), como en los grupos isquémicos (Figura 7C), los tratamientos mostraron cambios claramente discriminantes de los grupos control (Sham e Isch SCR BACE1- SCR SCD1).

Donde los silenciamientos para cada enzima generaron separación respecto al control y a su vez el tratamiento dual fue discriminante de cada efecto individual, generando los principales cambios sobre especies lipídicas con ácidos grasos saturados PG(30:0), PS(32:0) y ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) PI(36:6), PS(38:5) y PS(42:5) en los sham; y sobre especies lipídicas con ácidos grasos mono (MUFAs) y poli-insaturados (PUFAs) como el PC 32:1 y el PC(36:4) en los isquémicos (Figura 7C). Al comparar el grupo isquémico respecto al grupo con doble silenciamiento se marca una clara discriminación con mayor VIP (2.2733) y sMCs (18.9425) en especies asociadas a PUFAs y ácidos grasos saturados: PC(38:6), PA(32:0), PA(38:3), PC(36:4) y ePC(36:0) (Figura 7D, Figura suplementaria 1).

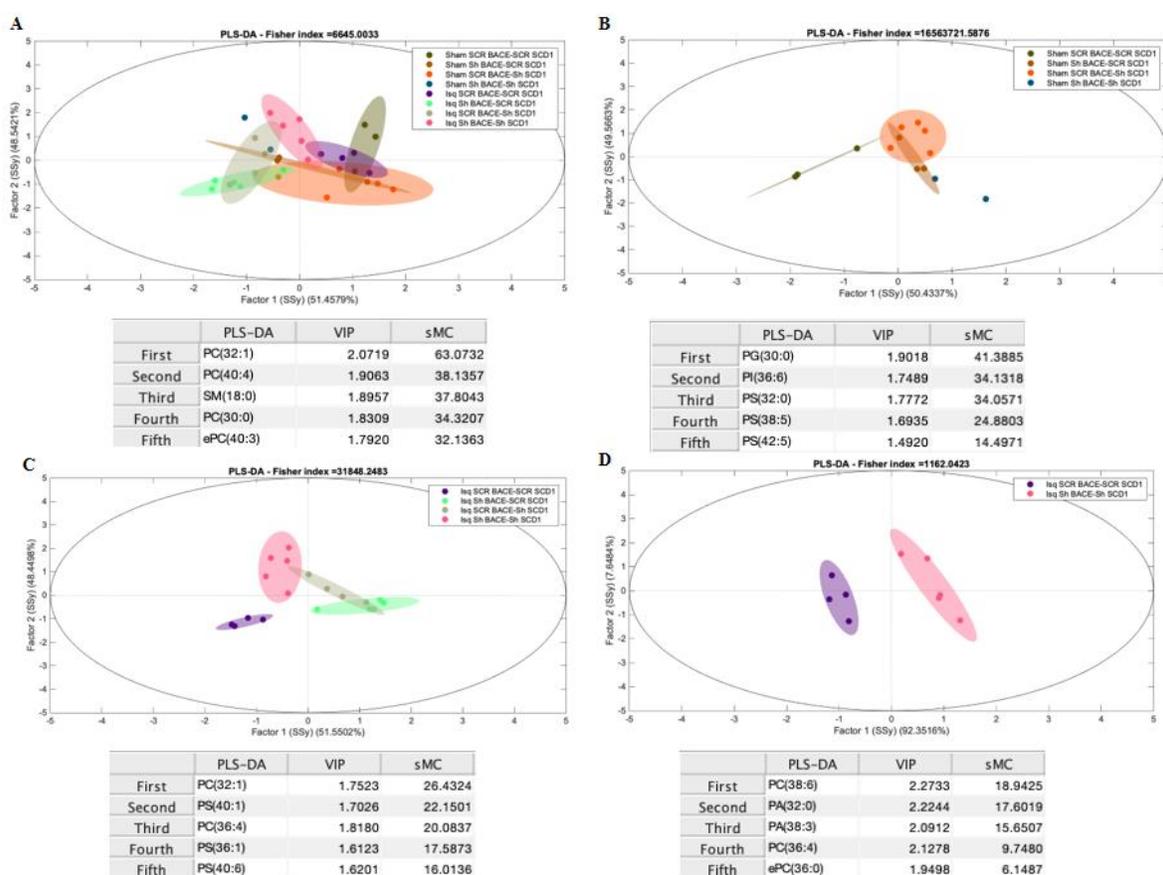


Figura 7: PLS-DA de especies fosfolipídicas en LCR sometido al silenciamiento de BACE1 y SCD1 en un modelo de isquemia cerebral en ratas. (A) Análisis discriminante de parciales mínimos cuadrados (PLS-DA) para especies fosfolipídicas entre todos los grupos de tratamiento en ratas sham e isquémicas. (B) PLS-DA para las especies fosfolipídicas entre los grupos de tratamiento en ratas sham. (C) PLS-DA para las especies fosfolipídicas entre los grupos de tratamiento en ratas isquémicas. (D) PLS-DA para las especies fosfolipídicas entre los grupos de tratamiento SCR BACE1- SCR SCD1 y Sh BACE1- Sh SCD1 en las ratas isquémicas. En la parte inferior de cada figura se especifican los fosfolípidos más discriminantes según los puntajes de proyección de importancia de la variable (VIP) y la significancia de correlación multivariante (sMC). (n=4-5).

7.4 Tras la isquemia, el doble silenciamiento de BACE1-SCD1 produjo cambios en el perfil lipídico del suero, principalmente en LPC con monoinsaturaciones:

Luego de observar el comportamiento del perfil lipídico en el hipocampo y el LCR, se evaluó si esta intervención desde el hipocampo tenía un efecto sobre la composición fosfolipídica en el suero de las ratas. Los resultados muestran que el efecto del doble silenciamiento de BACE1-SCD1 generó la mayor discriminación del perfil lipídico (óvalos rosa y azul, Figuras 8A a 8D), lo cual es claramente acentuado en comparación con los otros grupos isquémicos (Figura 8C) e isquémico control (Figura 8D), resaltándose como principales especies discriminantes LPC y su precursor PC, asociado a ácidos grasos de 16, 18 y 20 carbonos (figuras 8A a 8D) y predominantemente saturados y monoinsaturados.

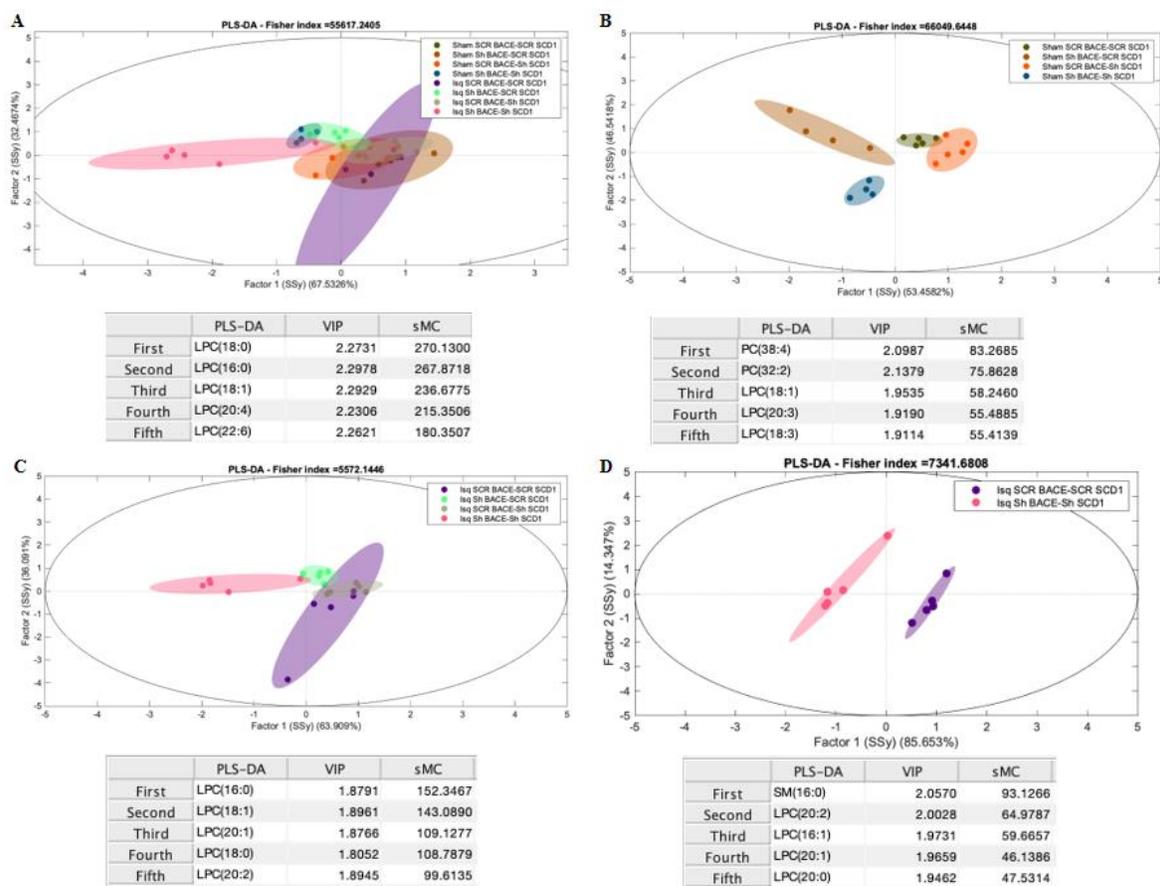


Figura 8: PLS-DA de especies fosfolipídicas en suero sometido al silenciamiento de BACE1 y SCD1 en un modelo de isquemia cerebral en ratas. (A) Análisis discriminante de parciales mínimos cuadrados (PLS-DA) para especies fosfolipídicas entre todos los grupos de tratamiento en ratas sham e isquémicas. (B) PLS-DA para las especies fosfolipídicas entre los grupos de tratamiento en ratas sham. (C) PLS-DA para las especies fosfolipídicas entre los grupos de tratamiento en ratas isquémicas. (D) PLS-DA para las especies fosfolipídicas entre los grupos de tratamiento SCR BACE1- SCR SCD1 y Sh BACE1- Sh SCD1 en las ratas isquémicas. En la parte inferior de cada figura se especifican los fosfolípidos más discriminantes según los puntajes de proyección de importancia de la variable (VIP) y la significancia de correlación multivariante (sMC). (n=4-5).

7.5 El doble silenciamiento de BACE1-SCD1 generó un efecto inverso sobre el porcentaje molar de LPC y PC y un aumento en LPC de 16C y 18C:

Los diferentes tratamientos mostraron una evidente discriminación en el suero en las especies lipídicas LPC y PC. Al analizar de manera detallada se observa que el doble silenciamiento para ambas enzimas en condiciones control cómo en condiciones de isquemia generó un efecto significativo en ambas especies, aumentando el % mol de LPC y un efecto inverso al reducir el % mol de PC. El doble silenciamiento en el grupo isquémico indujo la mayor elevación de LPC diferenciándose significativamente de los demás grupos de tratamiento (valor $p < 0.05\%$), especialmente del grupo Sham SCR BACE1- SCR SCD1 ($p=0.031$) y del grupo Isch SCR BACE1- SCR SCD1 ($p=0.036$), con efectos similares a los de los grupos Sham Sh BACE1- Sh SCD1 ($p=0.974$) e Isch Sh BACE1- SCR SCD1 ($p=0.235$). Del mismo modo, el doble silenciamiento enzimático en los animales isquémicos fue el que tuvo un mayor efecto sobre la reducción de PC, diferenciándose significativamente de los grupos Sham SCR BACE1- SCR SCD1 ($p=0.026$), Sham Sh BACE1- SCR SCD1 ($p=0.036$), Isch SCR BACE1- SCR SCD1 ($p=0.046$) e Isch SCR BACE1- Sh SCD1 ($p=0.029$) (Figura 9A).

Otras de las familias en que el porcentaje molar respondió a los diferentes tratamientos fueron SM/DSM y ePC, sin embargo, no consideramos un patrón apreciable en la respuesta por parte de cada uno de los grupos. Por su parte, la respuesta de LPC según la longitud de carbonos (16, 18, 20 y 22C) de sus ácidos grasos también mostró una tendencia al aumento frente al doble silenciamiento en los grupos sham e isquémicos, y de modo más sutil al silenciamiento de BACE1 en el grupo isquémico; a pesar de esto, solo se evidenció una diferenciación estadísticamente significativa para 16 y 18 carbonos, manteniendo el mayor efecto bajo el doble silenciamiento (Figura 9B). Mientras que la longitud de carbonos de PC no arrojó resultados estadísticos significativos, pero sí hubo una tendencia a la reducción en las especies con 34, 36 y 38 carbonos bajo el doble silenciamiento. Los datos fueron analizados con el test de Kruskal-Wallis ó ANOVA de una vía según se observó la normalidad de su distribución a través de la prueba de Kolmogorov smirnov.

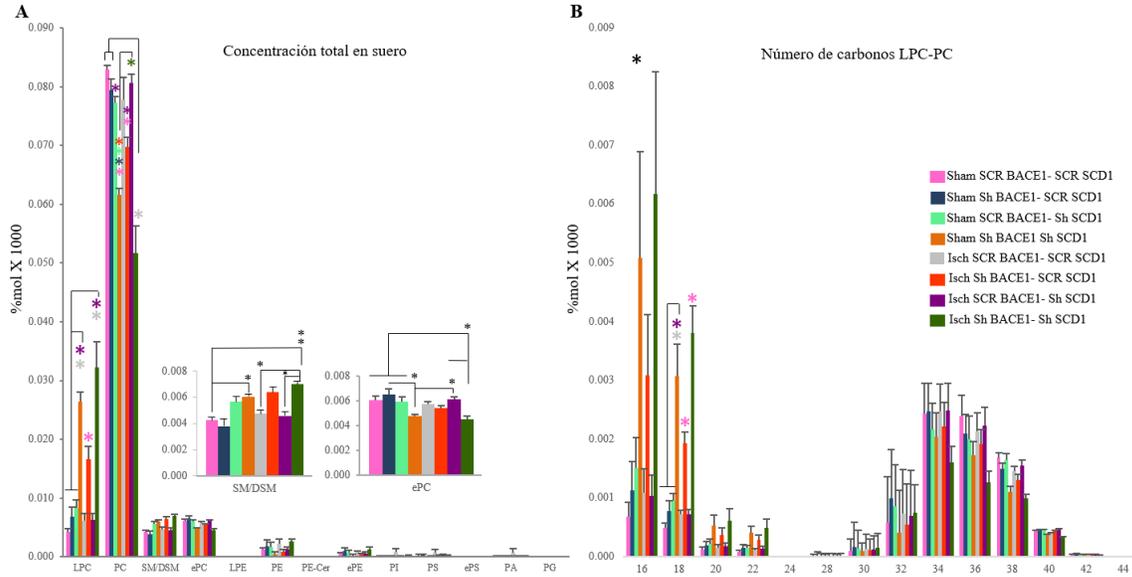


Figura 9: Porcentaje molar de familias fosfolipídicas y %mol según el número de carbonos de PLs en el suero de ratas isquémicas tratadas con silenciamiento de BACE1 y SCD1. (A) % mol de cada familia fosfolipídica por grupo de tratamiento en ratas sham e isquémicas. (B) % mol de fosfolípidos según el número de carbonos de sus ácidos grasos, por grupo de tratamiento en ratas sham e isquémicas. (n=4-5) * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$. El color del asterisco sobre la barra indica el grupo con el cual se tiene diferencia estadísticamente significativa. Datos son presentados como la media \pm SEM.

7.6 El doble silenciamiento de BACE1-SCD1 produjo un aumento significativo en el porcentaje molar de ácidos grasos saturados asociados a LPC y una reducción de ácido araquidónico asociado a PC en suero.

Una vez observado el efecto de los tratamientos sobre el número de carbonos en LPC y PC, evaluamos si las insaturaciones de sus ácidos grasos también estaban respondiendo a los silenciamientos de BACE1 Y SCD1. En efecto, las especies fosfolipídicas de LPC con 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 insaturaciones fueron elevadas bajo el doble silenciamiento en ambas condiciones control y de isquemia, y de manera moderada bajo el silenciamiento de BACE1 bajo la condición isquémica. El grupo isquémico con doble silenciamiento (Isch Sh BACE1-Sh SCD1) presentó un aumento significativo de LPC saturados respecto a los grupos Sham SCR BACE1- SCR SCD1 ($p=0,027$), Isch SCR BACE1- SCR SCD1 ($p=0,045$) e Isch SCR BACE1- Sh SCD1 ($p=0.043$). Similarmente, los LPC con 4 insaturaciones fueron significativamente diferentes al resto de los grupos de tratamiento (valor $p < 0.01$) (Figura 10A). Mientras que las insaturaciones en PC no presentaron cambios la isquemia y tratamientos respectivos (Figura 10B). Los datos fueron analizados con el test de Kruskal-

Wallis ó ANOVA de una vía según se observó la normalidad de su distribución a través de la prueba de Kolmogorov smirnov.

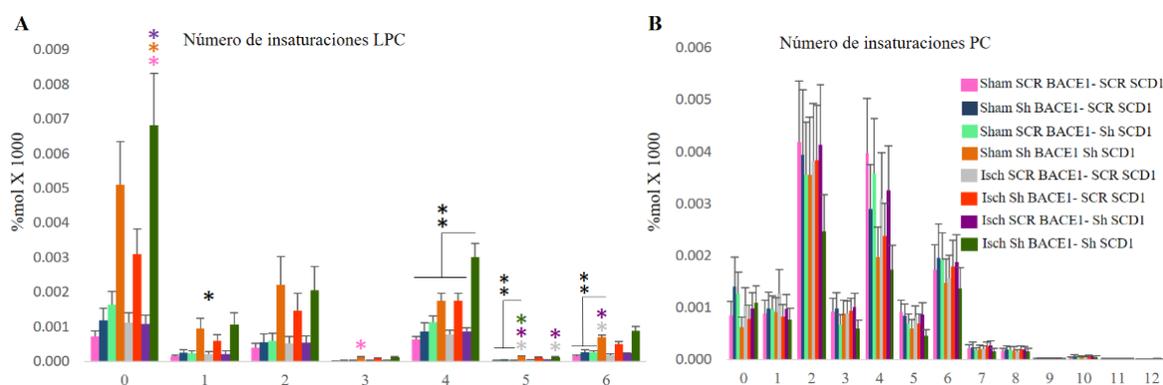


Figura 10: Porcentaje molar de familias fosfolipídicas según el número de insaturaciones en el suero de ratas isquémicas tratadas con silenciamiento de BACE1 y SCD1. (A) % mol de LPC según el número de insaturaciones en sus ácidos grasos, por grupo de tratamiento en ratas sham e isquémicas. (B) % mol de PC según el número de insaturaciones de sus ácidos grasos, por grupo de tratamiento en ratas sham e isquémicas. (n=4-5) * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$. El color del asterisco sobre la barra indica el grupo con el cual se tiene diferencia estadísticamente significativa. Datos son presentados como la media \pm SEM. LPC: liso-fosfatidilcolina, PC: fosfatidilcolina

Finalmente, al investigar sobre las especies específicas de PLs en LPC y PC que están generando un mayor impacto sobre los cambios en estas dos familias lipídicas en el suero debido a los tratamientos, se encontraron cambios significativos en el aumento de LPC (16:0), (18:0) bajo el doble silenciamiento respecto a los demás grupos Sham ($p < 0.01$) y bajo el doble silenciamiento en el grupo isquémico respecto a los otros grupos isquémicos (Figura 11A), además de la reducción de PC (36:4) y (38:4) ($p < 0.01$) (Figura 11B), apoyados por el respectivo mapa de calor (Figura 11A, 11B). De manera muy notoria el silenciamiento de BACE1 en el grupo isquémico generó efectos similares, aunque más sutiles que el doble silenciamiento, lo cual fue apoyado por un análisis de dos vías el cual rescató como principal tratamiento mayor efecto al shBACE1. Los datos fueron analizados con el test de Kruskal-Wallis ó ANOVA de una vía según se observó la normalidad de su distribución a través de la prueba de Kolmogorov smirnov.

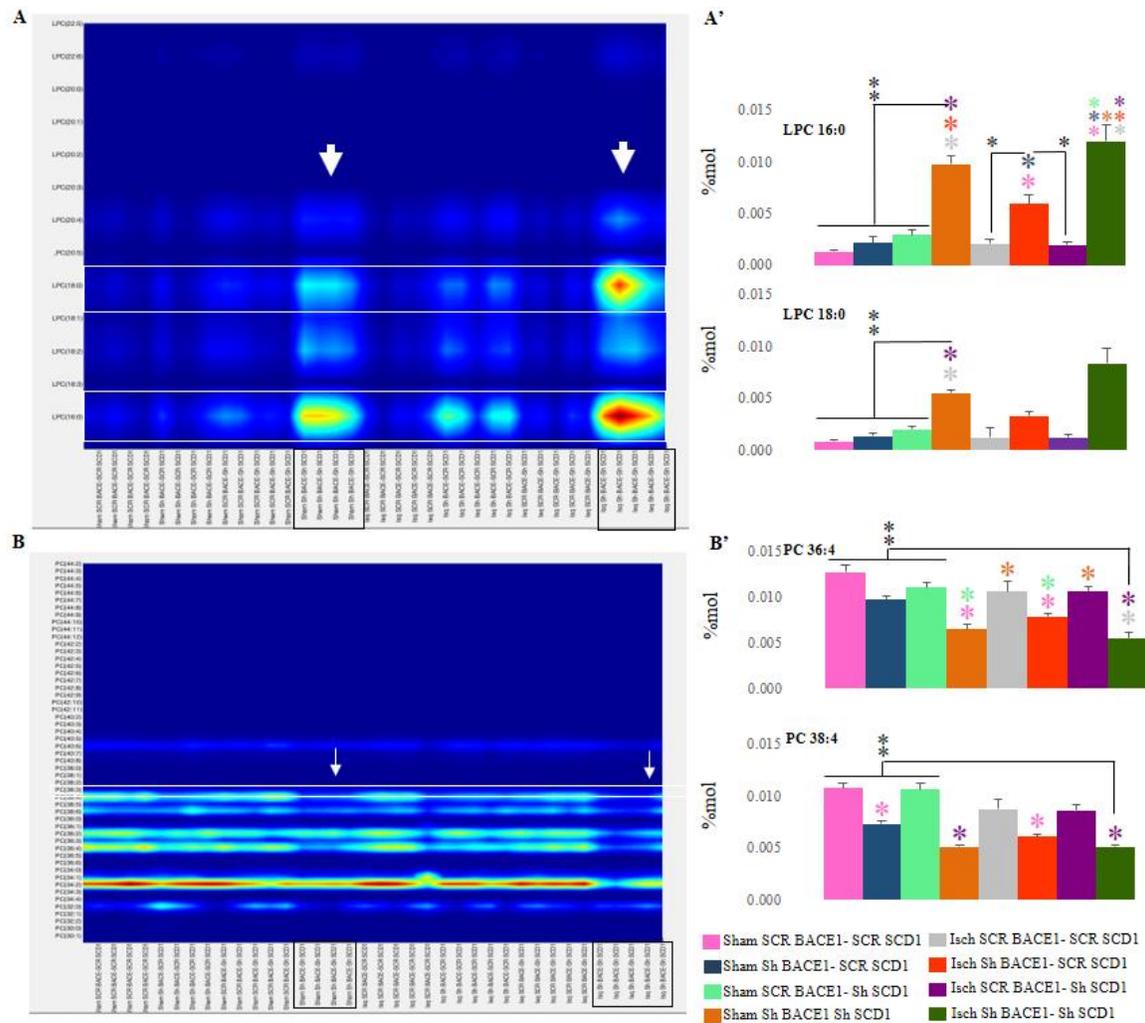


Figura 11. Porcentaje molar de especies de LPC y PC en suero de ratas sham e isquémicas: (A y B) Mapas de calor para especies de LPC y PC en los diferentes grupos de tratamiento en las ratas sham e isquémicas. (A') % mol para LPC 16:0 y LPC 18:0 por grupo de tratamiento en ratas sham e isquémicas. (B') % mol para PC 36:4 y PC 38:4 por grupo de tratamiento en ratas sham e isquémicas. (n=4-5) * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$. El color del asterisco sobre la barra indica el grupo con el cual se tiene diferencia estadísticamente significativa. Datos son presentados como la media \pm SEM.

7.7 El astrocito inhibido para SCD1 y BACE1-SCD1 cambia el patrón de distribución de SCD1 y reduce la reactividad astrocitaria asociados a la protección de la neurona bajo la excitotoxicidad por glutamato:

Con base en los resultados anteriores, se inhibió BACE1 y SCD1 usando inhibidores farmacológicos específicamente en el astrocito como célula mediadora dentro de la UNV para evaluar el efecto sobre otros tipos celulares en cocultivo como neuronas y endotelio bajo estrés por glutamato. Los astrocitos cocultivados con neuronas y bajo la inhibición individual

y conjunta de BACE1 y SCD1 se muestran en el primer bloque de la figura 12A en condiciones control (sin glutamato). En la primera columna se observaron núcleos en azul, en la segunda la proteína ácida fibrilar glial GFAP en rojo, en la tercera la enzima SCD1 en verde y en la cuarta la combinación de las tres anteriores (merge). El astrocito en condiciones control (vehículo) presentó un marcaje de GFAP difuso en el citoplasma (rojo) con un núcleo sano (no condensado, ovalado) en marcaje azul, y la distribución de la inmunofluorescencia (IF) de SCD1 (verde) se observó en “puntos” alrededor del espacio perinuclear (verde) (Figura 12A, primera fila), soportado por el fluorograma de la figura 12A'. Bajo el efecto del inhibidor de BACE1 se observó el núcleo sano, el GFAP se presentó mas reactivo y la distribución de SCD1 fue difusa en el citoplasma. Respecto al inhibidor de SCD1 y los inhibidores de BACE1-SCD1 en conjunto, el patrón de distribución de la IF de SCD1 fue difusa en el citoplasma, pero conservando algunos puntos perinucleares y sin cambios en el núcleo y en el GFAP (figura 12A y 12A'). Por su parte, el estímulo tóxico del glutamato indujo condensación nuclear, mostró leve tendencia a la condensación nuclear, reactividad astrocitaria incrementando la IF del GFAP y redistribución nuclear de la IF de SCD1 (Figuras 12B y 12B'). La depleción de BACE1 o SCD1 logró proteger parcialmente al astrocito al reducir la intensidad de fluorescencia de GFAP, además de distribuir a la IF SCD1 en el citoplasma (Figuras 12B y 12B'). De manera interesante, la inhibición dual de SCD1 y BACE1 protegió al astrocito manteniendo reducida la intensidad de fluorescencia de GFAP, distribuyó el SCD1 de manera homogénea por el espacio citoplasmático y generó algunos puntos perinucleares (Figuras 12B y 12B'). Las anteriores observaciones fueron apoyadas por el efecto de la doble inhibición de BACE1 y SCD1 que mantuvo el porcentaje de liberación de LDH similar al liberado por las células en condiciones control (Figura 12C); la condensación nuclear de los astrocitos, con tendencia a aumentar en los grupos con presencia de glutamato, fue llevada a un porcentaje cercano al grupo control (Figura 12D). Del mismo modo, la intensidad de fluorescencia de GFAP también aumenta significativamente con el glutamato en comparación al grupo control ($p=0.002$) y la inhibición de BACE1-SCD1 y SCD1 por sí sólo la reducen ($p=0.030$) (Figura 12E). Finalmente, en la mayoría de los grupos se mantiene la intensidad de fluorescencia de SCD1, pero es reducida en aquellos grupos donde se utiliza su inhibidor, tanto en condiciones control como en la presencia de glutamato (Figura 12F). Los datos fueron analizados con el test de Kruskal-Wallis ó ANOVA de una

vía según se observó la normalidad de su distribución a través de la prueba de Kolmogorov smirnov.

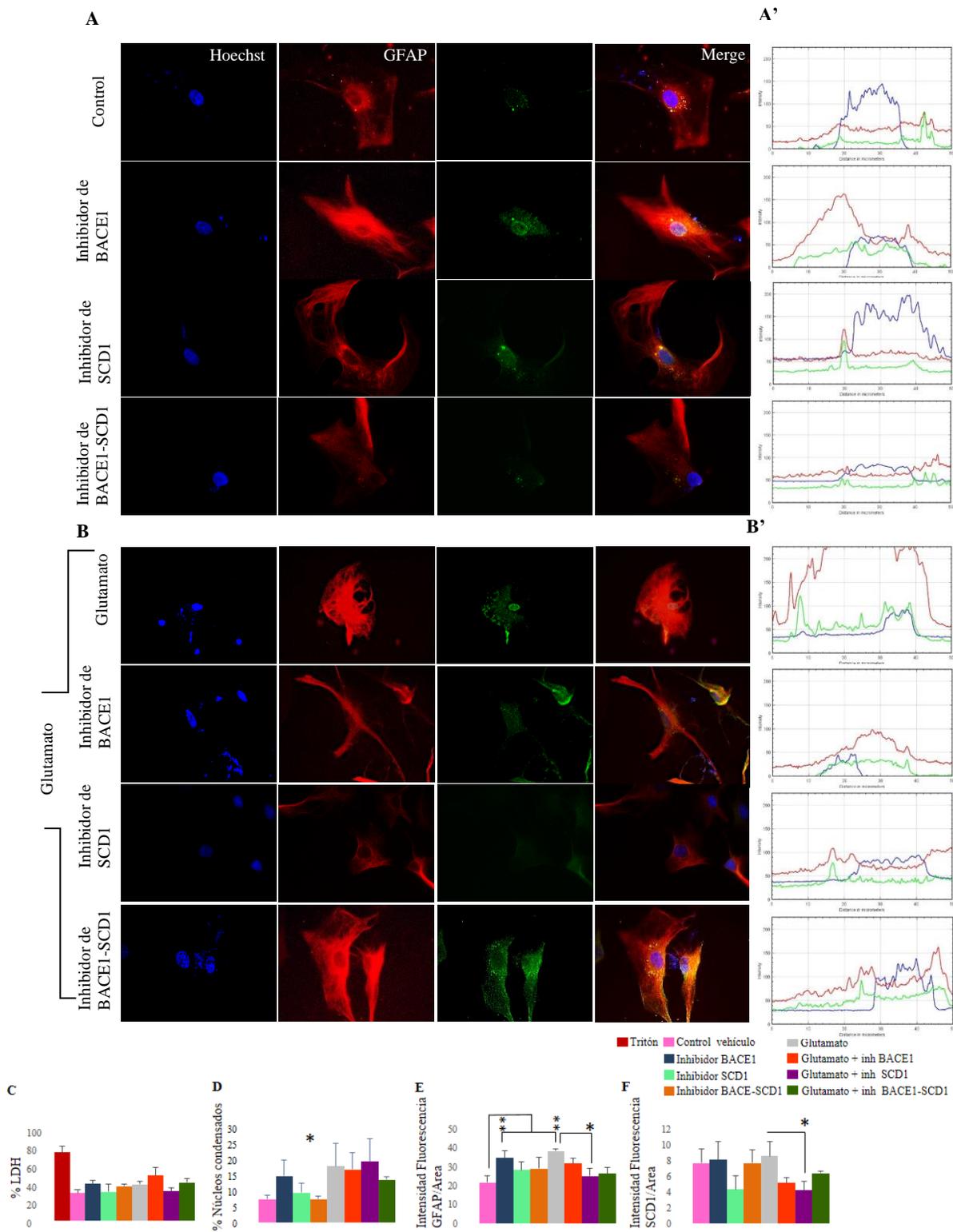


Figura 12. Astrocitos inhibidos para BACE1-SCD1 y cocultivados con neuronas expuestos a estrés por glutamato. Imágenes representativas de marcajes para Hoechst (azúl), GFAP (rojo) y SCD1 (verde). (A) Astrocitos cocultivados con neuronas inhibidos para BACE1-SCD1 sin glutamato (A') Perfil de fluorescencia de SCD1. (B) Astrocitos cocultivados con neuronas inhibidos para BACE1-SCD1 con glutamato 125 μ M. (B') Perfil de fluorescencia de SCD1. (C) % de LDH liberado al medio de los cocultivos entre astrocito-neurona. (D) Porcentaje de núcleos condensados. (E y F) Intensidad de fluorescencia (IF) para GFAP y SCD1. (G) Convención de colores para los diferentes grupos de tratamiento. n=4 por replica. Zoom= 60X. * p<0,05 ** p<0,01. El color del asterisco sobre la barra indica el grupo con el cual se tiene diferencia estadísticamente significativa. Datos son presentados como el promedio \pm SEM.

7.8 El astrocito inhibido para SCD1 y BACE1-SCD1 protege a la neurona bajo la excitotoxicidad por glutamato:

Las neuronas que fueron cocultivadas con los astrocitos respondieron de diferentes maneras a cada uno de los grupos de tratamiento. En condiciones control (vehículo) las neuronas presentaron un núcleo sano (Figura 13A), con un diámetro alrededor de las 10 μ m (Figura 13A'), la distribución de SCD1 es perinuclear y el marcaje de filamentos de actina (phalloidin) evidencia numerosas ramificaciones primarias, secundarias y terciarias (Figura 13A). Sorpresivamente, la inhibición de BACE1 sobre los astrocitos tuvo efectos negativos sobre las neuronas, sus núcleos se condensaron, el tamaño del soma se redujo y sus procesos se acortaron tanto en longitud como en número; bajo estas circunstancias la distribución de la IF de SCD1 se observó homogénea en el citoplasma (Figura 13A y 13A', 13C). Por su parte, la inhibición de SCD1 afectó de manera leve a las neuronas acortando principalmente las ramificaciones, pero sin cambio sobre la condensación nuclear (Figura 13C); sin embargo, la inhibición conjunta de BACE1-SCD1 en el astrocito no tuvo efecto adverso sobre la integridad de la neurona, los núcleos se mantuvieron sanos similares al grupo control, se conservaron sus ramificaciones, y aunque SCD1 fue difuso en el citoplasma, el fluorograma indica que tuvo una mayor preferencia por el espacio perinuclear (Figuras 13A y 13A', 13C). Cuando los cultivos fueron sometidos a estrés por glutamato, los núcleos se condensaron (diámetro <10 μ m) (Figura 13C), el SCD1 perdió su distribución perinuclear y presentó un aspecto difuso con un aumento significativo (p=0.001) respecto al grupo control, el soma se retrajo y el número de procesos se redujo (Figura 13A, 13B, 13B', 13D). Este efecto excitotóxico no logró ser recuperado por el inhibidor de BACE1 (Figuras 13B, 13B', 13C), pero sí por el inhibidor de SCD1 y ambos inhibidores de BACE1-SCD1 en el astrocito, debido a que los núcleos de las neuronas en cocultivo mantuvieron un diámetro mayor a 10 μ m (p=0.000 y p=0.012, respectivamente), SCD1 mantuvo una preferencia por el espacio perinuclear sin reducción de su IF y los procesos neuríticos mantuvieron su longitud y su

cantidad (Figuras 13B, 13B', 13C, 13D). Los datos fueron analizados con el test de Kruskal-Wallis ó ANOVA de una vía según se observó la normalidad de su distribución a través de la prueba de Kolmogorov smirnov.

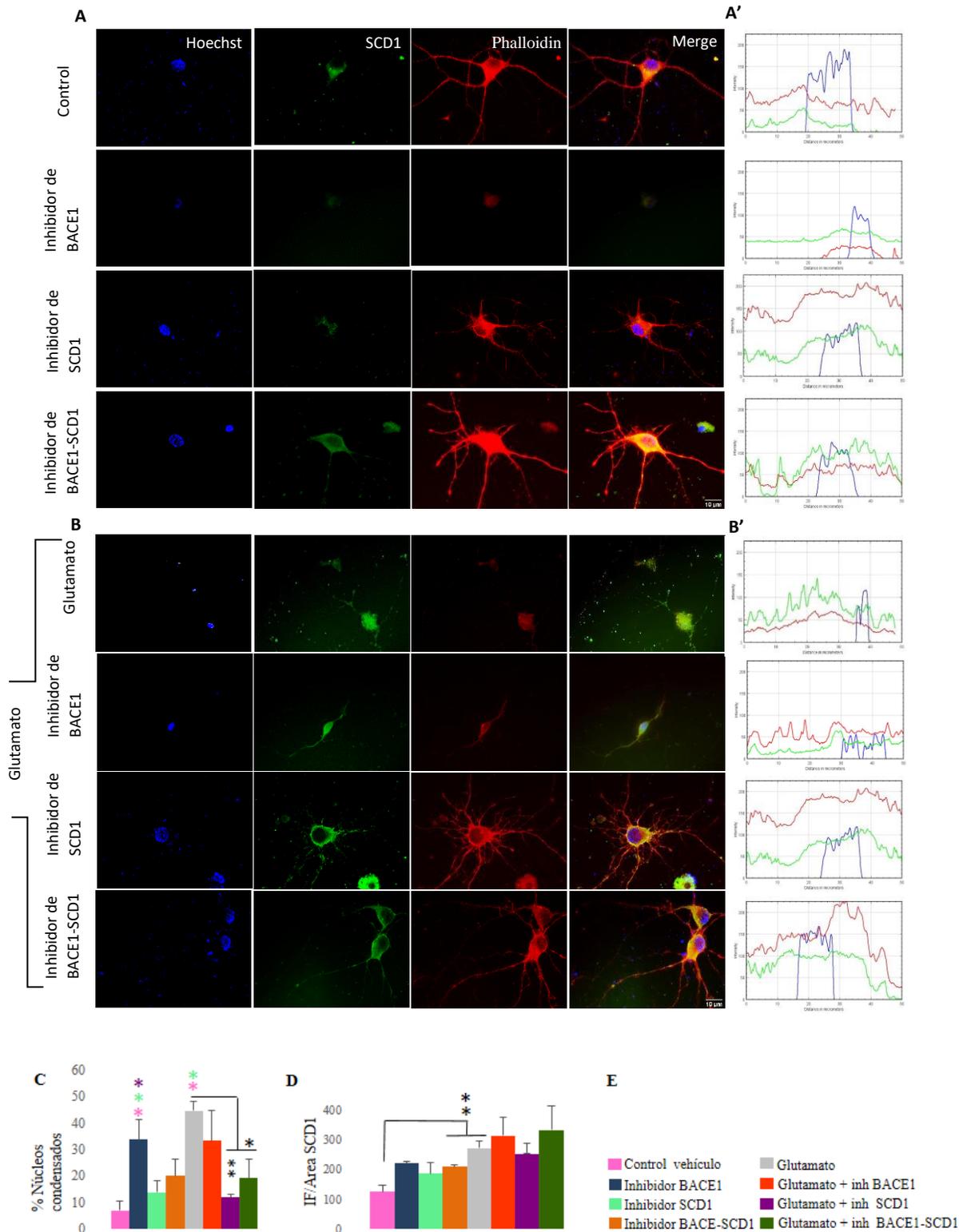


Figura 13. Neuronas expuestas a estrés por glutamato, cocultivadas con astrocitos inhibidos para BACE1 y SCD1 expuestos. Imágenes representativas de marcajes para Hoechst (azúl), Faloidina (rojo) y SCD1 (verde). (A) Neuronas cocultivadas con astrocitos inhibidos para BACE1-SCD1 sin glutamato. (A') Perfil de fluorescencia de SCD1. (B) Neuronas cocultivadas con astrocitos inhibidos para BACE1-SCD1 con glutamato 125 μ M. (B') Perfil de fluorescencia de SCD1. (C) Porcentaje de núcleos condensados. (D) Intensidad de fluorescencia (IF) para SCD1. (E) Convención de colores para los diferentes grupos de tratamiento. n=4 por replica. Zoom= 60X. * p<0,05 ** p<0,01. El color del asterisco sobre la barra indica el grupo con el cual se tiene diferencia estadísticamente significativa. Datos son presentados como el promedio \pm SEM.

7.9 La inhibición de BACE1, SCD1 y BACE1-SCD1 reduce la reactividad astrocitaria, reduce la IF y cambia el patrón de distribución de SCD1 asociados a la protección del endotelio bajo la toxicidad por glutamato:

Los astrocitos cocultivados con endotelio fueron sometidos a la inhibición de BACE1, SCD1 y BACE1-SCD1 sin la presencia de glutamato (Figura 14A). Los datos muestran en las columnas de izquierda a derecha: núcleos en azul, GFAP en rojo, SCD1 en verde y el solapamiento de las tres imágenes (merge), además del perfil de fluorescencia en las figuras 14A y 14A'.

La figura 13C muestra que en el sobrenadante del cocultivo de ambos tipos celulares sin glutamato hubo liberación de LDH en la presencia del inhibidor de BACE1, siendo muy bajo bajo en comparación de la liberación inducida por glutamato (aproximadamente un 70% superior respecto al 4% del grupo control); además, ambos inhibidores de manera independiente lograron reducir el % de LDH a menos de un 20% en condición de toxicidad por glutamato; y de manera confirmatoria, la doble inhibición, redujo significativamente este porcentaje al mismo nivel del grupo control (p<0.01 – 0.021).

Sumado a lo anterior, cuando se evaluó la condensación nuclear, se observó que en la condición control, se pueden apreciar núcleos sanos en el astrocito, realmente bajo todos los tratamientos, los astrocitos mostraron que sus núcleos se mantienen estables y la condensación nuclear no tiene diferencias estadísticamente significativas, a pesar de que las cuantificaciones muestren una tendencia a la condensación en los grupos donde se utilizó el inhibidor de BACE1, glutamato y el inhibidor de BACE1 + Glutamato. También se detectó que en la presencia de ambos inhibidores BACE1-SCD1, la condensación nuclear es la más baja a pesar del glutamato (Figura 14D). Por su parte, la reactividad astrocitaria según la intensidad de la inmunoreactividad de GFAP, no mostró alteraciones en respuesta a los inhibidores individuales o en conjunto, sin embargo, bajo la inhibición de SCD1 y BACE1-

SCD1, la IF de GFAP disminuyó significativamente ($p < 0,01$), incluso por debajo del tratamiento control (Figuras 14A y 14E).

Por su parte, la IF de SCD1 se mantiene baja y muy homogénea por el espacio citoplasmático sin la presencia de glutamato, y con algunos picos perinucleares bajo la inhibición de BACE1 (Figuras 14A, 14A' y 14F). Situación que se muestra diferente cuando los astrocitos son sometidos a Glutamato, ya que muestran una fuerte polimerización de GFAP (Figuras 14B, 14B' y 14E) y una considerable elevación en la IF de SCD1 (Figura 14F), en especial a nivel perinuclear (Figuras 14B y 14B'). El glutamato incrementó significativamente la IF de SCD1 ($p < 0,05$), incluso a pesar de los tratamientos con inhibidor de BACE1; sin embargo, la inhibición de SCD1 ($p < 0,05$), y la doble inhibición BACE1-SCD1 ($p < 0,01$) lograron reducir significativamente la IF de SCD1 (Figura 14E). Además de distribuir homogéneamente SCD1 por el citoplasma (Figura 14B'). Los datos fueron analizados con el test de Kruskal-Wallis ó ANOVA de una vía según se observó la normalidad de su distribución a través de la prueba de Kolmogorov smirnov.

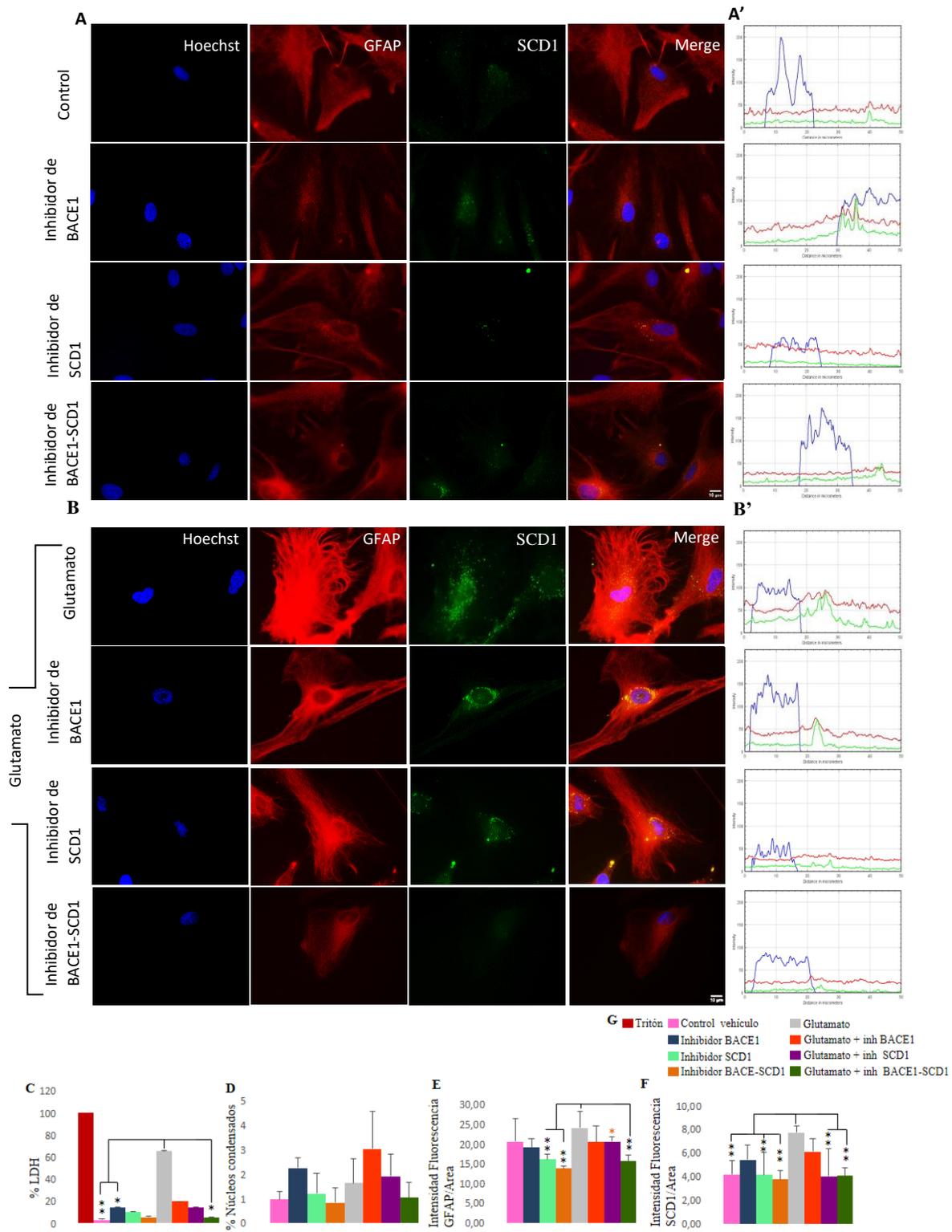


Figura 14. Astrocitos inhibidos para BACE1-SCD1 y cocultivados con endotelio expuestos a estrés por glutamato. Imágenes representativas de marcajes para Hoechst (azul), GFAP (rojo) y SCD1 (verde). (A) Astrocitos cocultivados con endotelio inhibidos para BACE1-SCD1 sin glutamato (A') Perfil de fluorescencia de SCD1. (B) Astrocitos cocultivados con endotelio inhibidos para BACE1-SCD1 con glutamato 125 μ M. (B') Perfil de fluorescencia de SCD1. (C) % de LDH liberado al medio de los cocultivos entre astrocito-endotelio. (D) Porcentaje de núcleos condensados. (E y F) Intensidad de fluorescencia (IF) para GFAP y SCD1. (G) Convención de colores para los diferentes grupos de tratamiento. n=4 por replica. Zoom= 60X. * p<0.05 ** p<0.01. El color del asterisco sobre la barra indica el grupo con el cual se tiene diferencia estadísticamente significativa. Datos son presentados como el promedio \pm SEM.

7.10 El astrocito inhibido para SCD1 y BACE1-SCD1 reduce la presencia de SCD1 en endotelio y reestablece la integridad de las uniones estrechas perdidas bajo la toxicidad por glutamato:

Las células endoteliales que fueron cocultivadas con los astrocitos tratados para ambos inhibidores, no presentaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la condensación nuclear, a pesar de que en la presencia de glutamato hubo una clara tendencia a la condensación (Figuraa 15A-C). Por su parte las proteínas de conexión de uniones estrechas, ZO-1, se mantuvieron estables según lo revela el marcaje que delimita la membrana celular representada en la figura 15A y los picos correspondientes a ZO-1 (línea roja) en los perfiles de fluorescencia de las células frente a los diferentes tratamientos y en ausencia de glutamato (Figura 15A'). Estos picos se ubican en el eje X alrededor de unos 15 μ m distanciados de la señal azul correspondiente al núcleo, lo que coincide con la señal en el borde de cada célula (Figura 15A y 15A'). La IF de SCD1 se mantuvo con distribución perinuclear (figura 15A y 15A') y baja intensidad, en especial en el grupo control y bajo la doble inhibición de BACE1-SCD1 (Figura 15D). Sin embargo, el endotelio sometido a glutamato, mostró pérdida en la continuidad del marcaje para ZO-1 (Figura 15B) que pudo ser corroborada en el perfil de fluorescencia donde se perdieron los picos de la línea roja (Figura 15B'). Además de esta pérdida, el glutamato elevó la IF de SCD1 a nivel perinuclear e incluso mostró varios picos cercanos a los bordes de la célula (Figura 15B y 15B'). Este aumento de la IF de SCD1 y la pérdida de la continuidad de las uniones estrechas bajo el glutamato no logró recuperarse con la inhibición de BACE1; mientras que con la inhibición de SCD1 y BACE1-SCD1, las uniones estrechas mostraron un patrón de continuidad en la señal, sus picos se detectaron nuevamente en el perfil de fluorescencia (Figura 15B') y la IF de SCD1 volvió a su patrón perinuclear (Figura 15B') y se redujo respecto al tratamiento con glutamato (Figura 15D, valor p<0.01 – 0.008 respectivamente) a un nivel similar al del tratamiento control (Figura 14D). Los datos fueron analizados con el test de Kruskal-Wallis

ó ANOVA de una vía según se observó la normalidad de su distribución a través de la prueba de Kolmogorov smirnov.

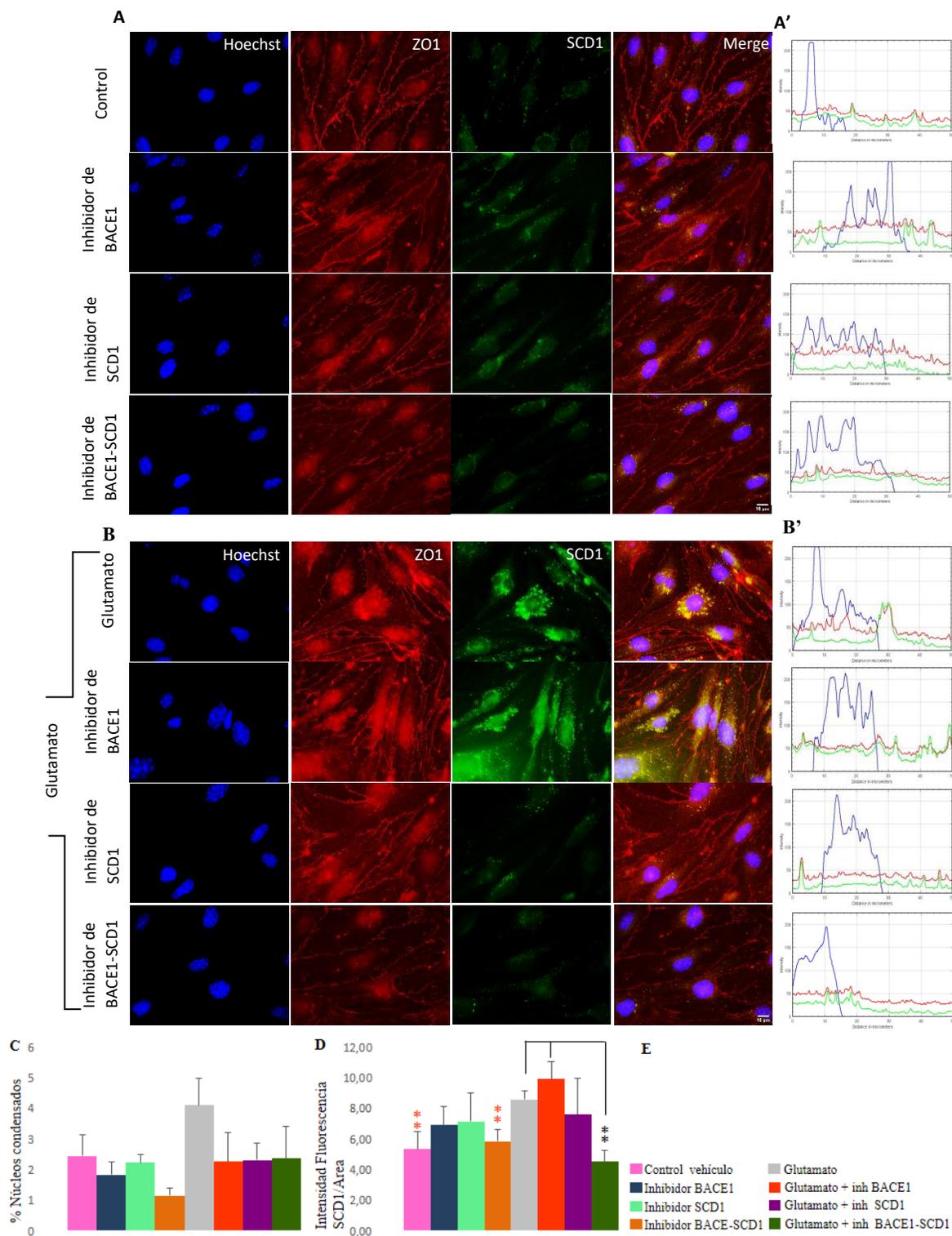


Figura 15. Endotelio cocultivado con Astrocitos inhibidos para BACE1-SCD1, y expuestos a estrés por glutamato. Imágenes representativas de marcajes para Hoechst (azúl), Zonula Occludens-ZO (rojo) y SCD1 (verde). (A) Endotelio cocultivado con astrocitos inhibidos para BACE1-SCD1 sin glutamato (A') Perfil de fluorescencia de SCD1. (B) Endotelio cocultivado con astrocitos inhibidos para BACE1-SCD1 con glutamato 125 μ M. (B') Perfil de fluorescencia de SCD1. (C) % de núcleos condensados de las células endoteliales. (D) Intensidad de fluorescencia (IF) para SCD1. (E) Convención de colores para los diferentes grupos de tratamiento. n=4 por replica. Zoom= 60X. * $p<0.05$ ** $p<0.01$. El color del asterisco sobre la barra indica el grupo con el cual se tiene diferencia estadísticamente significativa. Datos son presentados como el promedio \pm SEM.

7.11 La inhibición de BACE1-SCD1 en el astrocito, revierte el balance entre LPC y PC en la neurona y en el endotelio tras la toxicidad por glutamato:

A las células modelo de la UNV (astrocito, neuronas y endotelio) cocultivadas, se les extrajo el material lipídico, el cual fue analizado por espectrometría de masas en el Centro de Lipidómica en la Universidad de Kansas. Se obtuvo el % mol de seis familias de PLs, LPC, PC, SM/DSM, ePC, PS y ePS que posteriormente fue promediado para detectar cambios a partir de cada uno de los tratamientos. Similar a los resultados obtenidos en suero del experimento *in vivo*, la doble inhibición de BACE1-SCD1 logró aumentar el % mol de LPC en el astrocito luego de ser reducido por glutamato, mientras que paralelamente, el glutamato aumentó PC y la doble inhibición la redujo (Figura 16A). A pesar de que la estadística solo mostró diferencias significativas entre el inhibidor de BACE1 vs los dos inhibidores (BACE1+SCD1) $p=0.020$ y el inhibidor de BACE1 vs el glutamato $p=0.035$, la tendencia a aumentar LPC y a reducir PC en el astrocito tras la doble inhibición es muy clara. Por su parte, el endotelio manifiesta un comportamiento similar al astrocito, donde LPC tiende a aumentar con la inhibición de SCD1 y la doble inhibición con glutamato, mientras que en estos mismos grupos PC se reduce (Figura 16C). La razón entre LPC y PC puede mostrar que estas dos familias de fosfolípidos se invierten en cada tipo celular cuando son sometidos al glutamato y al doble tratamiento; en los astrocitos cocultivados con neuronas LPC/PC tiende a reducirse en presencia de glutamato y la doble inhibición aumenta la relación (Figura 16D), mientras que en la neurona la doble inhibición en presencia de glutamato tiende a reducir la relación LP/PC, y en el endotelio, en presencia de glutamato más el inhibidor de SCD1 y más ambos inhibidores, la relación LPC/PC se eleva (Figura 16F). Estos grupos de tratamiento con astrocitos doblemente inhibidos, fueron los mismos que presentaron las mejores características morfológicas para las neuronas y el endotelio luego de ser sometidos a la toxicidad por glutamato. Los datos fueron analizados con el test de Kruskal-Wallis según se observó la distribución no normal a través de la prueba de Shapiro wilk.

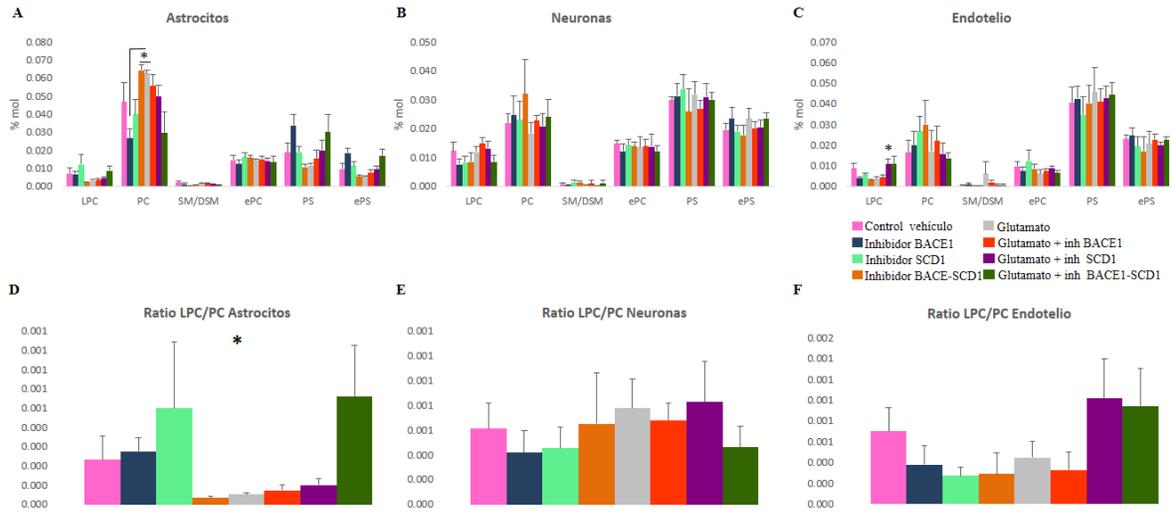


Figura 16: Porcentaje molar de familias fosfolipídicas en astrocitos, neuronas y endotelio: (A) % mol de cada familia fosfolipídica en astrocitos cocultivados con neuronas, LPC 22:5 y PC 44:10 por grupo de tratamiento en astrocitos cocultivados con neuronas. (B) % mol de cada familia fosfolipídica en neuronas cocultivadas con astrocitos. (C) % mol de cada familia fosfolipídica en endotelio cocultivado con astrocitos. (D) Razón entre LPC y PC en astrocitos cocultivados con neuronas. (E) Razón entre LPC y PC en neuronas cocultivadas con astrocitos. (F) Razón entre LPC y PC en endotelio cocultivado con astrocitos. (n=4) * $p < 0,05$. Datos son presentados como la media \pm SEM.

8. DISCUSIÓN:

Encontramos que el doble silenciamiento de BACE1-SCD1 en el hipocampo de las ratas isquémicas se asoció con la recuperación neurológica y mejora en el desempeño en tareas de memoria y reaprendizaje en un modelo isquémico global (figura 5), lo cual fue acompañado de una discriminación de especies fosfolípídicas en el hipocampo, LCR y especialmente en suero.

Se ha considerado que la isquemia es causa de desregulación hipocampal de procesos relacionados con la acumulación de agregados proteicos, entre ellos, la activación de BACE1 (Pluta R, 2022) y que la reducción en la actividad de esta enzima en modelos de Alzheimer ha demostrado la disminución de la carga amiloide y la neuroinflamación, con la recuperación de la sinapsis y un impacto sobre el desarrollo cognitivo a través del mantenimiento de la memoria (Marino, M., et al, 2022). En nuestro caso, los animales afectados por la isquemia y silenciados para BACE1 y SCD1 también presentaron una mejoría cognitiva especialmente en la memoria y aprendizaje reverso (figura 5).

Estos resultados van en concordancia con estudios previos que presentan que la sobreexpresión de BACE1 y la acumulación de péptidos tóxicos en la corteza cerebral de personas con EA también manifiestan el incremento de la enzima SCD1, los MUFAs, y el índice de desaturación de FAs (16:1/16:0) (Astarita, 2011; Peter, A., et al, 2009). En nuestro estudio, el doble silenciamiento de BACE1-SCD1 sobre el hipocampo, logró recuperar la función neurológica en un modelo isquémico global, asociado a cambios en el perfil fosfolípídico no solo en el hipocampo donde la intervención fue llevada a cabo, sino también en LCR y de manera especial, en circulación, lo que sugiere una respuesta intersistémica a través de los lípidos para mantener la conectividad tras el insulto. Anteriormente, se ha descrito que alteraciones en los FAs son un factor de riesgo para el desarrollo de la EA y que una dieta rica en palmitato induce la activación de factores de transcripción que elevan la expresión de BACE1 con la génesis de péptidos A β (Morris, M. C., et al, 2003), mientras que una dieta enriquecida en el poliinsaturado omega-3 ácido docohexanoico (DHA) disminuye la expresión de genes relacionados con inflamación (Butler, M. J., et al, 2021). En circulación, estos PUFAs se transportan de manera predilecta en LPC y de esta interacción LPC-PUFAs depende la conexión con receptores en la BHE para ser transportados al interior del parénquima y nutrir el tejido cerebral con ácidos grasos esenciales (Wood, C., et al, 2021).

Los resultados obtenidos muestran que el doble silenciamiento de BACE1-SCD1 en el hipocampo, resultó en la elevación de LPC en suero, en su mayoría, cargados de FAs de 16 y 18 carbonos. Sin embargo, LPC cargada con FAs de 22 carbonos y con 6 insaturaciones también mostró una elevación con el doble silenciamiento enzimático (figuras 9B y 10A), lo que sugiere un mayor ingreso de DHA al parénquima cerebral explicando la recuperación cognitiva. A pesar de la anterior hipótesis, un aumento de LPC cargado de ácidos grasos saturados (16:0) y (18:0) no explicaría la recuperación tras el evento isquémico (Astarita, 2011; Peter, A., et al, 2009), pues existen estudios que correlacionan positivamente los niveles de LPC en corteza con toxicidad y con la elevación de marcadores pro-inflamatorios como IL-1a, IFN- γ y MCP-1, además de demielinización y déficit cognitivo por activación de la microglia (Button, E. B., et al, 2014; Plemel, J. R., et al, 2018; Xie, Y., et al, 2022)

Sin embargo, nuestros resultados sugieren que el silenciamiento dual de BACE1-SCD1 podría estar ocasionando la evacuación de LPC con SFAs desde el parénquima hacia circulación para disminuir su toxicidad. Sus precursores serían las especies lipídicas que encontramos como mayores discriminantes en hipocampo tras el doble silenciamiento, cuya composición está asociada a SFAs de 16 y 18 carbonos y ácido araquidónico (AA) PS(38:4) PA(38:4), teniendo en cuenta que el control de la producción de AA en el hipocampo evita el impacto de eventos que desencadenan inflamación en el cerebro, sosteniendo el equilibrio entre la sinapsis excitatoria y la sinapsis inhibitoria (Selvaraj, P., et al, 2021). También, observamos que bajo dicho tratamiento, otros PLs conteniendo AA como PC(36:4) (figura 7D), fueron los principales discriminantes en el LCR de las ratas con mejores resultados neurológicos, cuando otros estudios mencionan cambios significativos en los niveles de AA en el LCR de pacientes que pueden sufrir procesos neuroinflamatorios post-operatorios (Terrando, N., et al, 2021), lo que sugiere que estos PUFAs en particular están respondiendo al doble silenciamiento de BACE1-SCD1 para resolver los efectos negativos de la isquemia, posiblemente por evacuación del parénquima con el fin de llevar AA hacia la circulación donde su concentración finalmente va a ser diluida (Hong S, et al, 2003). A su vez se eliminan los ácidos grasos saturados 18:0 y 16:0 del parénquima, los cuales están ampliamente descritos como neurotóxicos (Morris, M. C., et al, 2003).

El aumento obtenido de especies de LPC en suero podría deberse a la hidrólisis de PC (36:4) y (38:4) que libera LPC con los FAs de 16 y 18 carbonos, dejando libre AA y arrojándolo en circulación para proteger la integridad del SNC. Esto podría tener relación con la actividad de cPLA2 hepática que bajo alteraciones del SNC, responde activamente cambiando la homeostasis lipídica a través de la producción de LPC con consecuencias en la respuesta inflamatoria del cerebro (Nizamutdinov D, et al., 2017; Rege SD, et al., 2019; Palafox-Sánchez, V., et al, 2021). También se ha descrito que la actividad de cPLA2 del cerebro está elevada en un contexto isquémico (Sivaprakasam, C., et al, 2016). De nuevo, explicando en parte la evacuación desde el parénquima y la elevación de LPC en circulación, pero en las condiciones del doble silenciamiento, la reducción de actividad de BACE1 disminuye la producción de A β , mientras que la depleción de SCD1 bloquea la producción de MUFAs y consecuentemente de PUFAs, limitando los recursos para la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos, y finalmente reducir la inflamación.

Complementariamente, estudios previos del laboratorio muestran que el silenciamiento individual de BACE1 en neuronas de cultivo primario revierte el incremento de p-Tau y cPLA2 a causa de una concentración tóxica de glutamato, pero estos beneficios se perdieron cuando se silenció SCD1 (Villamil-Ortiz, J. G., & Cardona-Gómez, G. P. 2018); aunque estos resultados generan una aparente controversia con los resultados *in vitro* actuales, el blanco celular sugerido es diferente. Debido a que observamos que la neurona en cocultivo con astrocitos inhibidos para SCD1 o conjuntamente con BACE1, mantuvo integro el núcleo, el soma y sus procesos bajo el contexto excitotóxico cuando SCD1 fue inhibido individualmente o con BACE1 específicamente en el astrocito (figura 13B, 13B'), y la expresión de SCD1 se sostuvo en el espacio perinuclear de la neurona (figura 13B'), donde esta enzima presenta su mayor actividad catalítica. Estos resultados apoyan que bajo un evento de excitotoxicidad la neurona requiere de su propia SCD1 para mantenerla en homeostasis, y que, por el contrario, la actividad de SCD1 desde otras células de la UNV es perjudicial para la neurona en un contexto adverso, sugiriendo al astrocito como célula blanco en el silenciamiento de BACE1 y SCD1 en el parénquima para la recuperación neurológica.

Lo cual fue confirmado en el análisis *in vitro*, ya que la inhibición de BACE1-SCD1 en el astrocito, no solo logró recuperar la estabilidad morfológica de la neurona y el endotelio, sino también, y de manera similar a lo sucedido en el suero de los animales doblemente silenciados, revirtió el balance fosfolípido centrado en LPC-PC, sugiriendo por que la actividad de SCD1 en la neurona es necesaria bajo un evento adverso y que por el contrario la SCD1 desde el astrocito es tóxica para la neurona mientras se protege en presencia exacerbada de glutamato; por ende, esa LPC que llega desde el astrocito a la neurona bajo estas condiciones, también puede ser la causa de deterioro neuronal.

Por otro lado, el endotelio bajo la toxicidad por glutamato también pudo recuperarse de la pérdida en la integridad de sus uniones estrechas a través de la ayuda de astrocitos inhibidos para BACE1, pero en mayor medida, inhibidos para SCD1 ó BACE1-SCD1 (figura 15B). Sin embargo, el endotelio recuperado tras el glutamato y con estas inhibiciones redujo la expresión de SCD1 (figura 15B, 15B' y 15D), lo que sugiere que la acumulación de SCD1 en el endotelio es dañino, y que la inhibición de SCD1 solo o en inhibición con BACE1 en el astrocito, podría estar generando señales tróficas o protectoras que recuperan o previenen el deterioro endotelial por la toxicidad del glutamato. Sumado a esto, tras la inhibición de SCD1 y SCD1-BACE1 en el astrocito, el endotelio manifiesta una tendencia a aumentar LPC (figura 16C y 16F), lo que refuerza la hipótesis que bajo el insulto a la neurona, cambiar el curso de LPC manteniéndolo en el astrocito o enviándolo hacia el endotelio, es un posible mecanismo de apoyo a la neurona, y podría explicar parcialmente por qué tras el silenciamiento de estas dos enzimas en el hipocampo de ratas isquémicas resulta en la evacuación o por lo menos, en el aumento de LPC en suero. Lo anterior nos lleva a considerar que en circunstancias tóxicas o adversas como es el caso de las demencias, la acumulación de BACE1 y SCD1 afecta la integridad de la UNV y la circulación y transporte lipídico podría no ser adecuadamente regulada y de este desbalance podría depender al menos en parte la aceleración en el progreso de la enfermedad después de la aparición de los agregados neurofibrilares (Braak H, Braak E., 1991), como signo de pérdida de control en el parénquima de la disrupción de BHE y conectividad sináptica tras la inflamación propagada al hipocampo y exacerbada, manifestándose rápidamente en deterioro cognitivo leve y luego en demencia en menos de 2-4 años (Giannakopoulos P., et al, 2003).

Tanto SFAs como MUFAs son precursores de moléculas proinflamatorias y estimulan a la microglia para secretar IL-6 y metaloproteínas (Button, E. B., et al, 2014), pero nuestros resultados defienden la idea de que el control sobre una enzima que genera monoinsaturaciones sumado al control de otra enzima implicada clásicamente en la producción de restos proteicos tóxicos, puede sostener el equilibrio neurológico en ratas bajo un estado neuroinflamatorio. Lo cual también lleva a sugerir, además de los resultados en la lipidómica, que hay interacción entre estas dos enzimas que podrían ayudar a explicar la recuperación tras su silenciamiento. En ese sentido, en nuestro laboratorio hemos encontrado que en demencias de diferente origen etiológico (FAD, SAD y CADASIL) se sobreexpresa BACE1 y SCD1 al igual que marcadores de inflamación como cPLA2 y p-Tau, en especial, en la región CA1 del hipocampo, y, además, hemos observado que BACE1, SCD1 y p-Tau colocalizan en esta región del cerebro en los tres tipos de demencia (datos no mostrados). Apoyando la interpretación que la actividad de una de estas enzimas esté repercutiendo en la actividad de las demás o en la producción de proteínas tóxicas. Por lo tanto, inhibir ambas enzimas estaría interviniendo en rutas o interacciones que sean requeridas para la producción ya sea de p-Tau, de sustratos lipídicos para la obtención de moléculas proinflamatorias o de péptidos tóxicos amiloide. Sin embargo, la información acerca de la interacción entre estas dos enzimas es casi nula y son pocos los estudios que hablan de su relación asociada a las demencias (Villamil-Ortiz, J. G., & Cardona-Gómez, G. P. 2018).

No obstante, se sabe que BACE1 se sintetiza como zimógeno en retículo endoplásmico (RE) y lleva a cabo su actividad catalítica preferiblemente en endosomas (Wang, M., et al, 2018) y que la beta-amiloidosis puede inducir la sobre-regulación de SCD1 (Uryu et al., 2003), que el silenciamiento de BACE1 puede modificar el perfil lipídico con cambios en monoinsaturaciones de PLs en el hipocampo de ratones 3xTg-AD (Piedrahita et al., 2015, Villamil-Ortiz et al., 2016) y que el silenciamiento de BACE1 depende de la actividad de SCD1 para la neuroprotección *in vitro* (Villamil-Ortiz et al 2018); además, la maduración de BACE1 requiere de modificaciones postraduccionales que necesitan la participación de palmitato (Cho and Park, 2016; Yuksel and Tacal, 2019) y PLs como PE que direccionan el anclaje de BACE1 a balsas lipídicas (Sambamurti et al., 1999); mientras que SCD1 también es sintetizado en RE y es clave en la homeostasis lipídica que permite sostener la identidad

de PLs de membrana donde BACE1 lleva a cabo su actividad catalítica, escenario bioquímico desregulado a la alta en la demencias.

Por otra parte, sorprenden los resultados en suero que reflejan una fuerte discriminación en su totalidad por LPC y PC, apuntando a que la recuperación neurológica de las ratas isquémicas está siendo sostenida desde la modificación del Ciclo de Lands y bajo la participación de enzimas desaturasas como la SCD1 (figuras 8, 9, 10 y 11), evidenciado por un aumento de LPC 18:0 y LPC 16:0 y una reducción de PC38:4 y PC 36:4 por efecto del doble silenciamiento de SCD1 y BACE1 en un evento isquémico (figura 11). Como ha sido mencionado por otros trabajos, animales modelo de EA, también presentan cambios en el Ciclo de Lands asociados a la respuesta a diferentes pruebas de comportamiento neurológico (Granger, M. W., et al, 2019), lo que indica que los eventos moleculares y celulares que están tras la neuropatología en esta enfermedad (ejemplo: la producción de péptidos beta-amiloide) pueden causar disregulación en el pivote entre PC y LPC o un desbalance en la interconversión entre PC y LPC que pueda resultar en las alteraciones celulares características de EA, lo que sugiere, que el Ciclo de Lands, puede ser un epicentro lipídico cuya bioquímica pueda utilizarse como biomarcador de daño en la UNV y cuyas modificaciones puedan recuperar la homeostasis neurológica para prevenir el avance al estado de demencia, no obstante estudios detallados deberán ser realizados para profundizar en este aspecto.

Finalmente, se concluye que, la disminución en la actividad de BACE1-SCD1 en el hipocampo de un modelo isquémico de demencia, puede mantener su capacidad cognitiva, lo que es explicado desde la modificación en suero de ácidos grasos de fosfolípidos pertenecientes al Ciclo de Lands. Apoyado por el revertimiento en la direccionalidad de LPC que pasa del aumento en la neurona en condiciones adversas, a la disminución tras la inhibición de BACE1-SCD1 en el astrocito, enviando LPC hacia el endotelio, lo que podría explicar la evacuación de este fosfolípido en un escenario *in vivo*. Se propone entonces al astrocito como blanco celular para la reducción de estas dos enzimas, como potencial tratamiento para disminuir la disrupción de la Barrera Hematoencefálica y la neurodegeneración bajo eventos proinflamatorios que son comunes en los diferentes tipos de demencia (Figura 17).

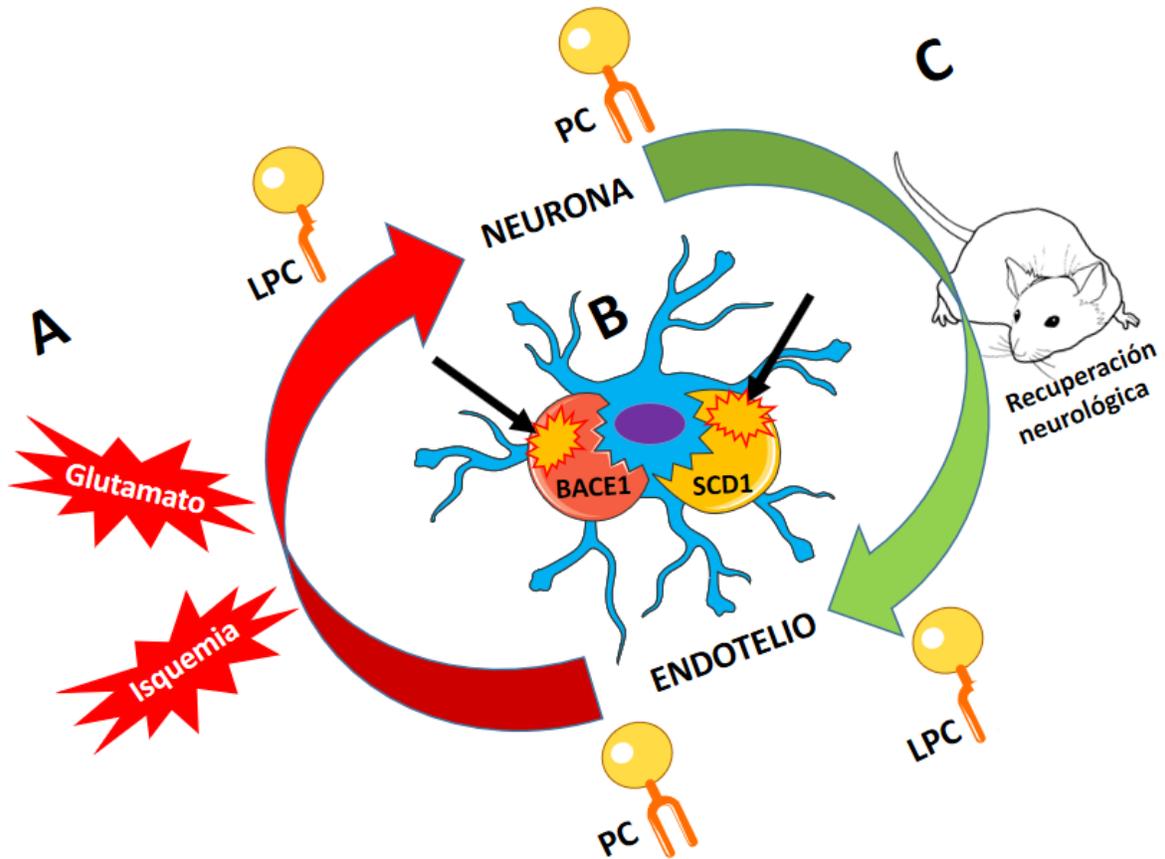


Figura 17. Esquema final propuesto: (A) Bajo un evento adverso: isquemia, sobrecarga de glutamato, aumenta el envío de LPC hacia la neurona con posterior afectación. (B) La disminución en la actividad de BACE1 y SCD1 en el astrocito, revierte el envío de LPC hacia la neurona y lo “evacúa” hacia el endotelio, (C) asociado con la recuperación neurológica de ratas isquémicas.

9. CONCLUSIÓN:

La isquemia en un modelo *in vivo* y la concentración alta de glutamato en un modelo *in vitro*, pueden disminuir la capacidad cognitiva y la integridad de células de la unidad neurovascular, respectivamente, acompañado de cambios en el perfil de ácidos grasos de fosfolípidos. Tras estos eventos, el silenciamiento y/o la inhibición de las enzimas BACE1 y SCD1 en el hipocampo y en el astrocito de acuerdo al modelo de daño neurovascular, puede recuperar la capacidad cognitiva y mantener la integridad de las diferentes células que componen la unidad neurovascular, cuyo posible mecanismo de recuperación está basado en el reestablecimiento del balance de ácidos grasos de fosfolípidos pertenecientes al Ciclo de Lands, a través del cuál se mantiene la homeostasis del parénquima cerebral, evacuando hacia circulación material fosfolípido como potencial inflamatorio donde pueden ser regulados para evitar el daño dentro del SNC. A su vez, estos cambios en dichos fosfolípidos pueden ser marcadores tempranos de alteraciones cerebrales, incluso antes de la acumulación de péptidos tóxicos y la manifestación clínica de la demencia.

10. PERSPECTIVAS:

En respuesta a la prevalencia actual de diferentes tipos de demencia y su contribución a la disminución de la calidad de vida y a la muerte a nivel mundial, nuestro laboratorio continúa en la tarea de investigar sobre las alteraciones celulares y moleculares que sufre el cerebro tras diferentes causas de demencia, como la isquemia cerebrovascular, en modelos animales y celulares, para apostarle a nuevos enfoques terapéuticos y diagnósticos que puedan prevenir o disminuir el impacto de las alteraciones del SNC en las personas afectadas. Esta investigación nos ha permitido relacionar la bioquímica lipídica con los procesos celulares y moleculares tradicionalmente asociados con el deterioro cognitivo, permitiendo apostar a posibles intervenciones desde una nueva perspectiva. A futuro, se requiere de la profundización de estos mecanismos relacionados con el daño cerebrovascular, la intervención de BACE1-SCD1 y la bioquímica de lípidos, en especial, sumando otros actores moleculares y celulares, como los transportadores lipídicos de la BHE y el parénquima cerebral, enzimas fosfolipasas, ácido graso ligasas, desaturasas y elongasas de ácidos grasos, y las demás células y componentes que complementan la UNV: pericitos, microglia, lámina basal y matriz extracelular.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abdulkadir, R. R., Alwjwaj, M., Othman, O. A., Rakkar, K., & Bayraktutan, U. (2020). Outgrowth endothelial cells form a functional cerebral barrier and restore its integrity after damage. *Neural regeneration research*, 15(6), 1071–1078. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.269029> Aguilera G, Colín-González AL, Rangel-López E, Chavarría A, Santamaría A. Redox signaling neuroinflammation and neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal* [Internet] 2017 Jun 6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28467722/>. Doi: 10.1089/ars.2017.7099
- Aisen, P. S., Vellas, B., & Hampel, H. (2013). Moving towards early clinical trials for amyloid-targeted therapy in Alzheimer's disease. *Nature reviews. Drug discovery*, 12(4), 324. <https://doi.org/10.1038/nrd3842-c1>
- Akhter, R., Shao, Y., Formica, S., Khrestian, M., & Bekris, L. M. (2021). TREM2 alters the phagocytic, apoptotic and inflammatory response to A β 42 in HMC3 cells. *Molecular immunology*, 131, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.12.035>
- Allen, P., Chaddock, C. A., Egerton, A., Howes, O. D., Barker, G., Bonoldi, I., Fusar-Poli, P., Murray, R., & McGuire, P. (2015). Functional outcome in people at high risk for psychosis predicted by thalamic glutamate levels and prefronto-striatal activation. *Schizophrenia bulletin*, 41(2), 429–439. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbu115>
- Amaro M, Šachl R, Aydogan G, Mikhalyov II, Vácha R, Hof M. GM1 Ganglioside Inhibits β Amyloid Oligomerization Induced by Sphingomyelin. *Angew Chem Int Ed Engl* [Internet] 2016;55(32):9411-9415. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5089616/> Doi:10.1002/anie.201603178
- Andersen, J. V., Markussen, K. H., Jakobsen, E., Schousboe, A., Waagepetersen, H. S., Rosenberg, P. A., & Aldana, B. I. (2021). Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. *Neuropharmacology*, 196, 108719. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2021.108719>.
- Androuin, A., Thierry, M., Boluda, S., Brainbank NeuroCEB Neuropathology Network, Baskaran, A., Langui, D., Duyckaerts, C., Potier, M. C., El Hachimi, K. H., Delatour, B., &

Marty, S. (2022). Alterations of Neuronal Lysosomes in Alzheimer's Disease and in APPxPS1-KI Mice. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 87(1), 273–284. <https://doi.org/10.3233/JAD-215692>

Antu, K. A., Riya, M. P., Nair, A., Mishra, A., Srivastava, A. K., & Raghu, K. G. (2016). *Symplocos cochinchinensis* enhances insulin sensitivity via the down regulation of lipogenesis and insulin resistance in high energy diet rat model. *Journal of ethnopharmacology*, 193, 500–509. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.09.050>

Arvanitakis, Z., Shah, R. C., & Bennett, D. A. (2019). Diagnosis and Management of Dementia: Review. *JAMA*, 322(16), 1589–1599. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.4782>

Astarita, G., Jung, K. M., Vasilevko, V., Dipatrizio, N. V., Martin, S. K., Cribbs, D. H., Head, E., Cotman, C. W., & Piomelli, D. (2011). Elevated stearoyl-CoA desaturase in brains of patients with Alzheimer's disease. *PloS one*, 6(10), e24777. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024777>

Assmann, K. E., Adjibade, M., Hercberg, S., Galan, P., & Kesse-Guyot, E. (2018). Unsaturated Fatty Acid Intakes During Midlife Are Positively Associated with Later Cognitive Function in Older Adults with Modulating Effects of Antioxidant Supplementation. *The Journal of nutrition*, 148(12), 1938–1945. <https://doi.org/10.1093/jn/nxy206>

Avila-Muñoz E, Arias C. Cholesterol-induced astrocyte activation is associated with increased amyloid precursor protein expression and processing. *Glia* [Internet] 2015;63(11):2010-2022. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/glia.22874>. Doi:10.1002/glia.22874 67

Bartel, P.L., Roch, J-M., Sugiyama, J., 2007. Myriad Genetics, Inc. Therapeutic methods, compounds and compositions US20070087363

Belloy M, Napolioni V, Greicius M. A Quarter Century of APOE and Alzheimer's Disease: Progress to Date and the Path Forward. *Neuron* [Internet] 2019;101(5):820–838. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6407643/>. Doi: 10.1016/j.neuron.2019.01.056

Benjamin, E. J., Muntner, P., Alonso, A., et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 139(10), e56–e528. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000659>

Bergles, D. E., & Jahr, C. E. (1997). Synaptic activation of glutamate transporters in hippocampal astrocytes. *Neuron*, 19(6), 1297–1308. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80420-1](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80420-1)

Bodovitz S, Klein L. Cholesterol modulates alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem* [Internet]1996; 271,4436–4440. Available from: <https://www.jbc.org/content/271/8/4436.long>. Doi: 10.1074/jbc.271.8.4436

Boehm A, Bara R, Liraza O, et al. ABCA1 Agonist Reverses the ApoE4 - Driven Cognitive and Brain Pathologies. *Journal of Alzheimer’s Disease* [Internet] 2016; 54, 1219–1233. Available from: <https://content.iospress.com/articles/journal-of-alzheimers-disease/jad160467>. Doi:10.3233/JAD-160467.

Braak H, Braak E, Neuropathological staging of Alzheimer-related changes, *Acta Neuropathol.* 82 (1991) 239–259

Burdge, G. C., & Calder, P. C. (2015). Introduction to fatty acids and lipids. *World review of nutrition and dietetics*, 112, 1–16. <https://doi.org/10.1159/00036542>

Butler, M. J., Deems, N. P., Muscat, S., Butt, C. M., Belury, M. A., & Barrientos, R. M. (2021). Dietary DHA prevents cognitive impairment and inflammatory gene expression in aged male rats fed a diet enriched with refined carbohydrates. *Brain, behavior, and immunity*, 98, 198–209. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.08.214>

Button, E. B., Mitchell, A. S., Domingos, M. M., Chung, J. H., Bradley, R. M., Hashemi, A., Marvyn, P. M., Patterson, A. C., Stark, K. D., Quadrilatero, J., & Duncan, R. E. (2014). Microglial cell activation increases saturated and decreases monounsaturated fatty acid content, but both lipid species are proinflammatory. *Lipids*, 49(4), 305–316. <https://doi.org/10.1007/s11745-014-3882-y>

Casares, D., Escribá, P. V., & Rosselló, C. A. (2019). Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic

Avenues. International journal of molecular sciences, 20(9), 2167.
<https://doi.org/10.3390/ijms20092167>

Cieślak M, Czapski GA, Strosznajder JB. The Molecular Mechanism of Amyloid β 42 Peptide Toxicity: The Role of Sphingosine Kinase-1 and Mitochondrial Sirtuins. PLoS One [Internet] 2015;10(9): e0137193. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0137193>. Doi: 10.1371/journal.pone.0137193

Chai, H., Diaz-Castro, B., Shigetomi, E., Monte, E., Oceau, J. C., Yu, X., Cohn, W., Rajendran, P. S., Vondriska, T. M., Whitelegge, J. P., Coppola, G., & Khakh, B. S. (2017). Neural Circuit-Specialized Astrocytes: Transcriptomic, Proteomic, Morphological, and Functional Evidence. Neuron, 95(3), 531–549.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.029>

Chan, R. B., Oliveira, T. G., Cortes, E. P., Honig, L. S., Duff, K. E., Small, S. A., Wenk, M. R., Shui, G., & Di Paolo, G. (2012). Comparative lipidomic analysis of mouse and human brain with Alzheimer disease. The Journal of biological chemistry, 287(4), 2678–2688. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.274142>

Chatfield, D. A., Brahmabhatt, D. H., Sharp, T., Perkes, I. E., Outrim, J. G., & Menon, D. K. (2011). Juguloarterial endothelin-1 gradients after severe traumatic brain injury. Neurocritical care, 14(1), 55–60. <https://doi.org/10.1007/s12028-010-9413-7>

Chen, X., Li, Y., Wang, C., Tang, Y., Mok, S. A., Tsai, R. M., Rojas, J. C., Karydas, A., Miller, B. L., Boxer, A. L., Gestwicki, J. E., Arkin, M., Cuervo, A. M., & Gan, L. (2020). Promoting tau secretion and propagation by hyperactive p300/CBP via autophagy-lysosomal pathway in tauopathy. Molecular neurodegeneration, 15(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0354-0>

Chi H, Chang HY, Sang T. Neuronal Cell Death Mechanisms in Major Neurodegenerative Diseases. Int J Mol Sci [Internet] 2018;19(10):3082. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6213751/>. Doi: 10.3390/ijms19103082

Coleman P.D., Flood D.G. Neuron numbers and dendritic extent in normal aging and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging*. 1987;8:521–545. doi: 10.1016/0197-4580(87)90127-8.

Cooper A.J., Jeitner T.M. Central Role of Glutamate Metabolism in the Maintenance of Nitrogen Homeostasis in Normal and Hyperammonemic Brain. *Biomolecules*. 2016;6(2) doi: 10.3390/biom6020016

Cordy JM, Hooper NM, Turner AJ. The involvement of lipid rafts in Alzheimer's disease. *Mol Membr Biol* [Internet] 2006;23(1):111-122. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09687860500496417>.
Doi:10.1080/09687860500496417

Cornell-Bell, A. H., Finkbeiner, S. M., Cooper, M. S., & Smith, S. J. (1990). Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 247(4941), 470–473. <https://doi.org/10.1126/science.1967852>

Crous-Bou M, Minguillón C, Gramunt N, Molinuevo JL. Alzheimer's disease prevention: from risk factors to early intervention. *Alzheimers Res Ther* [Internet] 2017;9(1):71. Published 2017 Sep 12. Available from: <https://alzres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13195-017-0297-z> Doi:10.1186/s13195-017-0297-z

Dai G. (2022). Neuronal KCNQ2/3 channels are recruited to lipid raft microdomains by palmitoylation of BACE1. *The Journal of general physiology*, 154(4), e202112888. <https://doi.org/10.1085/jgp.202112888>

Dallérac, G., & Rouach, N. (2016). Astrocytes as new targets to improve cognitive functions. *Progress in neurobiology*, 144, 48–67. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.01.003>.)

Daneman, R., & Prat, A. (2015). The blood-brain barrier. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(1), a020412. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412>

De Bundel D., Schallier A., Loyens E., Fernando R., Miyashita H., Van Liefferinge J., Vermoesen K., Bannai S., Sato H., Michotte Y., Smolders I., Massie A. Loss of system x(c)- does not induce oxidative stress but decreases extracellular glutamate in hippocampus and

influences spatial working memory and limbic seizure susceptibility. *J. Neurosci.* 2011;31(15):5792–5803. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5465-10.2011.),

DeKosky ST, Scheff SW. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann Neurol.* 1990;27:457–464. doi: 10.1002/ana.410270502

Desale, S. E., & Chinnathambi, S. (2021). α - Linolenic acid modulates phagocytosis and endosomal pathways of extracellular Tau in microglia. *Cell adhesion & migration*, 15(1), 84–100. <https://doi.org/10.1080/19336918.2021.1898727>

Dityatev, A., & Rusakov, D. A. (2011). Molecular signals of plasticity at the tetrapartite synapse. *Current opinion in neurobiology*, 21(2), 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.12.006>

Dong, C., Wen, S., Zhao, S., Sun, S., Zhao, S., Dong, W., Han, P., Chen, Q., Gong, T., Chen, W., Liu, W., & Liu, X. (2021). Salidroside Inhibits Reactive Astrogliosis and Glial Scar Formation in Late Cerebral Ischemia via the Akt/GSK-3 β Pathway. *Neurochemical research*, 46(4), 755–769. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03207-8>

Doyle, K. P., Simon, R. P., & Stenzel-Poore, M. P. (2008). Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*, 55(3), 310–318. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.01.005>

Dugger BN, Dickson DW. Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet] 2017;9(7) a028035. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5495060/>.

Doi:10.1101/cshperspect.a028035

Durkee, C. A., & Araque, A. (2019). Diversity and Specificity of Astrocyte-neuron Communication. *Neuroscience*, 396, 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.11.010>

Fan, L. M., Geng, L., Cahill-Smith, S., Liu, F., Douglas, G., Mckenzie, C. A., Smith, C., Brooks, G., Channon, K. M., & Li, J. M. (2019). Nox2 contributes to age-related oxidative

damage to neurons and the cerebral vasculature. *The Journal of clinical investigation*, 129(8), 3374–3386. <https://doi.org/10.1172/JCI125173>

Fang, C., Woo, J. A., Liu, T., Zhao, X., Cazzaro, S., Yan, Y., Matlack, J., Kee, T., LePochat, P., & Kang, D. E. (2021). SSH1 impedes SQSTM1/p62 flux and MAPT/Tau clearance independent of CFL (cofilin) activation. *Autophagy*, 17(9), 2144–2165. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1816663>

Farooqui AA. *Lipids Mediators and Their Metabolism in the Brain*. New York: Springer; 2011

Ferreira, D., Nedelska, Z., Graff-Radford, J., Przybelski, S. A., Lesnick, T. G., Schwarz, C. G., Botha, H., Senjem, M. L., Fields, J. A., Knopman, D. S., Savica, R., Ferman, T. J., Graff-Radford, N. R., Lowe, V. J., Jack, C. R., Petersen, R. C., Lemstra, A. W., van de Beek, M., Barkhof, F., Blanc, F., ... Kantarci, K. (2021). Cerebrovascular disease, neurodegeneration, and clinical phenotype in dementia with Lewy bodies. *Neurobiology of aging*, 105, 252–261. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2021.04.029>

Fiacco, T. A., Agulhon, C., Taves, S. R., Petravicz, J., Casper, K. B., Dong, X., Chen, J., & McCarthy, K. D. (2007). Selective stimulation of astrocyte calcium in situ does not affect neuronal excitatory synaptic activity. *Neuron*, 54(4), 611–626. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.04.032>

Fieldhouse, J., Gossink, F. T., Feenstra, T. C., de Boer, S., Lemstra, A. W., Prins, N. D., Bouwman, F., Koene, T., Rhodius-Meester, H., Gillissen, F., Teunissen, C. E., van der Flier, W. M., Scheltens, P., Dols, A., Vijverberg, E., & Pijnenburg, Y. (2021). Clinical Phenotypes of Behavioral Variant Frontotemporal Dementia by Age at Onset. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 82(1), 381–390. <https://doi.org/10.3233/JAD-210179>

Foley P. Lipids in Alzheimer's disease: A century-old story. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801 [Internet] 2010; (8), 750–753. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1388198110000958?via%3Dihub>.

Doi: 10.1016 / j.bbalip.2010.05.004

- Fourriere, L., & Gleeson, P. A. (2021). Amyloid β production along the neuronal secretory pathway: Dangerous liaisons in the Golgi?. *Traffic* (Copenhagen, Denmark), 22(9), 319–327. <https://doi.org/10.1111/tra.12808>
- Frei, J. A., & Stoeckli, E. T. (2014). SynCAMs extend their functions beyond the synapse. *European Journal of Neuroscience*, 39(11), 1752–1760
- Frischknecht, R., Heine, M., Perrais, D., Seidenbecher, C. I., Choquet, D., & Gundelfinger, E. D. (2009). Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nature neuroscience*, 12(7), 897–904. <https://doi.org/10.1038/nn.2338>
- Fulopova, B., Stuart, K. E., Bennett, W., Bindoff, A., King, A. E., Vickers, J. C., & Canty, A. J. (2021). Regional differences in beta amyloid plaque deposition and variable response to midlife environmental enrichment in the cortex of APP/PS1 mice. *The Journal of comparative neurology*, 529(8), 1849–1862. <https://doi.org/10.1002/cne.25060>
- Gale, S. A., Acar D., & Daffner, K. R. (2018). Dementia. *The American journal of medicine*, 131(10), 1161–1169. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2018.01.022>
- Garcia, F. J., Sun, N., Lee, H., Godlewski, B., Mathys, H., Galani, K., Zhou, B., Jiang, X., Ng, A. P., Mantero, J., Tsai, L. H., Bennett, D. A., Sahin, M., Kellis, M., & Heiman, M. (2022). Single-cell dissection of the human brain vasculature. *Nature*, 603(7903), 893–899. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04521-7>
- Garrett, A. M., & Weiner, J. A. (2009). Control of CNS synapse development by γ -protocadherin-mediated astrocyte–neuron contact. *Journal of Neuroscience*, 29(38), 11723–11731
- Giannakopoulos P, Herrmann FR, Bussiere T, Bouras C, Kovari E, Perl DP, et al., Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer’s disease, *Neurology* 60 (May 13) (2003) 1495–1500
- Grammas, P., & O’vase, R. (2001). Inflammatory factors are elevated in brain microvessels in Alzheimer’s disease. *Neurobiology of aging*, 22(6), 837–842. [https://doi.org/10.1016/s0197-4580\(01\)00276-7](https://doi.org/10.1016/s0197-4580(01)00276-7)

Granger, M. W., Liu, H., Fowler, C. F., Blanchard, A. P., Taylor, M. W., Sherman, S., Xu, H., Le, W., & Bennett, S. (2019). Distinct disruptions in Land's cycle remodeling of glycerophosphocholines in murine cortex mark symptomatic onset and progression in two Alzheimer's disease mouse models. *Journal of neurochemistry*, 149(4), 499–517.

Grøntvedt, G. R., Schröder, T. N., Sando, S. B., White, L., Bråthen, G., & Doeller, C. F. (2018). Alzheimer's disease. *Current biology: CB*, 28(11), R645–R649. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.04.080>

Gulbenkian S, Uddman R, Edvinsson L. Neuronal messengers in the human cerebral circulation. *Peptides* [Internet] 2001; 22:995–1007. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0196978101004089?via%3Dihub>.
Doi: 10.1016 / s0196-9781 (01) 00408-9

Guo, X., Bao, X., Wang, X., Liu, D., Liu, P., Chi, T., Ji, X., Zheng, Z., Chen, G., & Zou, L. (2021). OAB-14 Effectively Ameliorates the Dysfunction of the Endosomal-Autophagic-Lysosomal Pathway in APP/PS1 Transgenic Mice. *ACS chemical neuroscience*, 12(21), 3985–3993. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.1c00209>

Halassa, M. M., Fellin, T., & Haydon, P. G. (2009). Tripartite synapses: roles for astrocytic purines in the control of synaptic physiology and behavior. *Neuropharmacology*, 57(4), 343–356. Hardy, J. & Selkoe, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356 (2002).346. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.06.031>.

Han, B. H., Cofell, B., Everhart, E., Humpal, C., Kang, S. S., Lee, S. K., & Kim-Han, J. S. (2022). Amentoflavone Promotes Cellular Uptake and Degradation of Amyloid-Beta in Neuronal Cells. *International journal of molecular sciences*, 23(11), 5885. <https://doi.org/10.3390/ijms23115885>

Han X, M Holtzman D, McKeel DW Jr, Kelley J, Morris JC. Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis. *J Neurochem* [Internet] 2002;82(4):809-818. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1471-4159.2002.00997.x?sid=nlm%3Apubmed>. Doi:10.1046/j.1471-4159.2002.00997.x

Hanada K. Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* [Internet] 2003;1632(1-3):16-30. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1388198103000593?via%3Dihub>. Doi:10.1016/s1388-1981(03)00059-3

Harada, R., Furumoto, S., Kudo, Y., Yanai, K., Villemagne, V. L., & Okamura, N. (2022). Imaging of Reactive Astrogliosis by Positron Emission Tomography. *Frontiers in neuroscience*, 16, 807435. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.807435>

Harder D R, Zhang C, Gebremedhin D. Astrocytes function in matching blood flow to metabolic activity. *News Physiol Sci* 2002; [Internet] (17): 27–31. Doi: 10.1152 / physiologyonline.2002.17.1.27

Hardy J., Allsop D. (1991). Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 383–388. 10.1016/0165-6147(91)90609-V

Hardy, J. & Selkoe, D. J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356 (2002).

Heller, J. P., & Rusakov, D. A. (2017). The Nanoworld of the Tripartite Synapse: Insights from Super-Resolution Microscopy. *Frontiers in cellular neuroscience*, 11, 374. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00374>

Herman M.A., Jahr C.E. Extracellular glutamate concentration in hippocampal slice. *J. Neurosci.* 2007;27(36):9736–9741. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3009-07.2007

Hertz L. (1965). Possible role of neuroglia: a potassium-mediated neuronal--neuroglial--neuronal impulse transmission system. *Nature*, 206(989), 1091–1094. <https://doi.org/10.1038/2061091a0>

Hou, L., Zhou, X., Zhang, C., Wang, K., Liu, X., Che, Y., Sun, F., Li, H., Wang, Q., Zhang, D., & Hong, J. S. (2021). Corrigendum to "NADPH oxidase-derived H₂O₂ mediates the regulatory effects of microglia on astrogliosis in experimental models of Parkinson's disease" [*Redox Biol.* 2017, 12: 162-170]. *Redox biology*, 47, 102119. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102119>

Hirano-Sakamaki W, Sugiyama E, Hayasaka T, Ravid R, Setou M, Taki T. Alzheimer's disease is associated with disordered localization of ganglioside GM1 molecular species in the human dentate gyrus. *FEBS Lett* [Internet] 2015;589(23):3611-3616. Available from: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.febslet.2015.09.033>.

Doi:10.1016/j.febslet.2015.09.033

Hong S, Gronert K, Devchand PR, Moussignac RL, Serhan CN. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. *Autacoids in anti-inflammation. J. Biol. Chem.* 2003;278:14677–14687. doi: 10.1074/jbc.M300218200

Huang, G. M., Jiang, Q. H., Cai, C., Qu, M., & Shen, W. (2015). SCD1 negatively regulates autophagy-induced cell death in human hepatocellular carcinoma through inactivation of the AMPK signaling pathway. *Cancer letters*, 358(2), 180–190. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.12.036>

Huang, Y., Chen, S., Luo, Y., & Han, Z. (2020). Crosstalk between Inflammation and the BBB in Stroke. *Current neuropharmacology*, 18(12), 1227–1236. <https://doi.org/10.2174/1570159X18666200620230321>

Huang Y, Weisgraber K, Mucke L, Mahley R. Apolipoprotein E: diversity of cellular origins, structural and biophysical properties, and effects in Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* [Internet] 2004; 23 (3): 189-204. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1385/JMN:23:3:189>. Doi: 10.1385/JMN:23:3:189 81

Iadecola, C., Duering, M., Hachinski, V., Joutel, A., Pendlebury, S. T., Schneider, J. A., & Dichgans, M. (2019). Vascular Cognitive Impairment and Dementia: JACC Scientific Expert Panel. *Journal of the American College of Cardiology*, 73(25), 3326–3344. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.04.034>

Iadecola C. (2010). The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia. *Acta neuropathologica*, 120(3), 287–296. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0718-6>

Iadecola, C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease, *Nature Reviews Neuroscience* [Internet] 2004; 5(5):347–360. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrn1387>. Doi: 10.1038 / nrn1387

Ikonen E: Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(2):125–138. 10.1038/nrm2336

Jadhav S, Cubinkova V, Zimova I, Brezovakova V, Madari A, Cigankova V, Zilka N. Tau-mediated synaptic damage in Alzheimer's disease. *Transl Neurosci.* 2015;6:214–226. doi: 10.1515/tnsci-2015-0023.

Jang, M., Choi, S. H., Choi, J. H., Oh, J., Lee, R. M., Lee, N. E., Cho, Y. J., Rhim, H., Kim, H. C., Cho, I. H., & Nah, S. Y. (2021). Ginseng gintonin attenuates the disruptions of brain microvascular permeability and microvascular endothelium junctional proteins in an APP^{swe}/PSEN-1 double-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Experimental and therapeutic medicine*, 21(4), 310. <https://doi.org/10.3892/etm.2021.9741>

Jia J, Cheng J, Wang C, Zhen X. Sigma-1 Receptor-Modulated Neuroinflammation in Neurological Diseases. *Front Cell Neurosci* [Internet] 2018;12:314. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6158303/>. Doi: 10.3389/fncel.2018.00314

Jiang, X., Andjelkovic, A. V., Zhu, L., Yang, T., Bennett, M., Chen, J., Keep, R. F., & Shi, Y. (2018). Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke. *Progress in neurobiology*, 163-164, 144–171. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.10.001>

Kalia, M., Meijer, H., van Gils, S. A., van Putten, M., & Rose, C. R. (2021). Ion dynamics at the energy-deprived tripartite synapse. *PLoS computational biology*, 17(6), e1009019. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009019>

Kalvodova L, Kahya N, Schwille P, et al. Lipids as modulators of proteolytic activity of BACE: involvement of cholesterol, glycosphingolipids, and anionic phospholipids in vitro. *J Biol Chem* [Internet] 2005; 280(44):36815-23. Available from: <https://www.jbc.org/content/280/44/36815.long>. Doi:10.1074/jbc.M504484200

Katsel P, Li C, Haroutunian V. Gene expression alterations in the sphingolipid metabolism pathways during progression of dementia and Alzheimer's disease: a shift toward ceramide

accumulation at the earliest recognizable stages of Alzheimer's disease?. *Neurochem Res* [Internet] 2007;32(4-5):845-856. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11064-007-9297-x>. Doi:10.1007/s11064-007-9297-x

Kawarabayashi, T., Nakamura, T., Sato, K., Seino, Y., Ichii, S., Nakahata, N., Takatama, M., Westaway, D., George-Hyslop, P. S., & Shoji, M. (2022). Lipid Rafts Act as a Common Platform for Amyloid- β Oligomer-Induced Alzheimer's Disease Pathology. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 87(3), 1189–1203. <https://doi.org/10.3233/JAD-215662>

Keep, R. F., Zhou, N., Xiang, J., Andjelkovic, A. V., Hua, Y., & Xi, G. (2014). Vascular disruption and blood-brain barrier dysfunction in intracerebral hemorrhage. *Fluids and barriers of the CNS*, 11, 18. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-11-18>

Koyama, Y., Maebara, Y., Hayashi, M., Nagae, R., Tokuyama, S., & Michinaga, S. (2012). Endothelins reciprocally regulate VEGF-A and angiopoietin-1 production in cultured rat astrocytes: implications on astrocytic proliferation. *Glia*, 60(12), 1954–1963. <https://doi.org/10.1002/glia.22411>

Kozma, M., Mészáros, Á., Nyúl-Tóth, Á., Molnár, K., Costea, L., Hernádi, Z., Fazakas, C., Farkas, A. E., Wilhelm, I., & Krizbai, I. A. (2021). Cerebral Pericytes and Endothelial Cells Communicate through Inflammasome-Dependent Signals. *International journal of molecular sciences*, 22(11), 6122. <https://doi.org/10.3390/ijms22116122>

Kumar, A., Fontana, I. C., & Nordberg, A. (2021). Reactive astrogliosis: A friend or foe in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 10.1111/jnc.15565. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/jnc.15565>

Kunkle, B. W., Grenier-Boley, B., Sims, R., Bis, J. C., Damotte, V., Naj, A. C., Boland, A., Vronskaya, M., van der Lee, S. J., Amlie-Wolf, A., Bellenguez, C., Frizatti, A., Chouraki, V., Martin, E. R., Sleegers, K., Badarinarayan, N., Jakobsdottir, J., Hamilton-Nelson, K. L., Moreno-Grau, S., Olaso, R., ... Genetic and Environmental Risk in AD/Defining Genetic, Polygenic and Environmental Risk for Alzheimer's Disease Consortium (GERAD/PERADES), (2019). Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease

identifies new risk loci and implicates A β , tau, immunity and lipid processing. *Nature genetics*, 51(3), 414–430. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0358-2>

Kurucu, H., Colom-Cadena, M., Davies, C., Wilkins, L., King, D., Rose, J., Tzioras, M., Tulloch, J. H., Smith, C., & Spires-Jones, T. L. (2022). Inhibitory synapse loss and accumulation of amyloid beta in inhibitory presynaptic terminals in Alzheimer's disease. *European journal of neurology*, 29(5), 1311–1323. <https://doi.org/10.1111/ene.15043>

Kvietys, P. R., & Granger, D. N. (2012). Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free radical biology & medicine*, 52(3), 556–592. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.002>

Kwon, O. H., Cho, Y. Y., Lee, J. H., & Chung, S. (2021). O-GlcNAcylation Inhibits Endocytosis of Amyloid Precursor Protein by Decreasing Its Localization in Lipid Raft Microdomains. *Membranes*, 11(12), 909. <https://doi.org/10.3390/membranes11120909>

Lee, D., & Lee, G. (2019). Effect of afferent electrical stimulation with mirror therapy on motor function, balance, and gait in chronic stroke survivors: a randomized controlled trial. *European journal of physical and rehabilitation medicine*, 55(4), 442–449. <https://doi.org/10.23736/S1973-9087.19.05334-6>

Leoni V, Solomon A, Kivipelto M. Links between ApoE, brain cholesterol metabolism, tau and amyloid beta-peptide in patients with cognitive impairment. *Biochem Soc Trans* [Internet] 2010;38(4):1021-1025. Available from: <https://portlandpress.com/biochemsoctrans/article/38/4/1021/65748/Links-between-ApoE-brain-cholesterol-metabolism>. Doi:10.1042/BST0381021

Lewerenz J., Maher P. Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases- What is the Evidence? *Front. Neurosci.* 2015;9:469. doi: 10.3389/fnins.2015.00469

Li Y., Maher P., Schubert D. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C regulates glutamate-induced nerve cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998;95(13):7748–7753. doi: 10.1073/pnas.95.13.7748

Librizzi, L., de Cutis, M., Janigro, D., Runtz, L., de Bock, F., Barbier, E. L., & Marchi, N. (2018). Cerebrovascular heterogeneity and neuronal excitability. *Neuroscience letters*, 667, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.01.013>

Madore, C., Yin, Z., Leibowitz, J., & Butovsky, O. (2020). Microglia, Lifestyle Stress, and Neurodegeneration. *Immunity*, 52(2), 222–240. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.12.003>

Maesako, M., Houser, M., Turchyna, Y., Wolfe, M. S., & Berezovska, O. (2022). Presenilin/ γ -Secretase Activity Is Located in Acidic Compartments of Live Neurons. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 42(1), 145–154. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1698-21.2021>.

Makarava N, Chang JC-Y, Kushwaha R, et al. Region-specific response of astrocytes to prion infection [original research]. *Front Neurosci*. 2019. Oct 9;13(1):e1048.

Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* [Internet] 1988;240(4852):622-630. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/240/4852/622.long>. Doi:10.1126/science.3283935

Malik, A., & Kanneganti, T. D. (2017). Inflammasome activation and assembly at a glance. *Journal of cell science*, 130(23), 3955–3963. <https://doi.org/10.1242/jcs.207365>

Malnar M, Kosicek M, Mitterreiter S, et al. Niemann-Pick type C cells show cholesterol dependent decrease of APP expression at the cell surface and its increased processing through the beta-secretase pathway. *Biochim Biophys Acta* [Internet] 2010;1802(7-8):682-691. Available: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443910000943>. Doi:10.1016/j.bbadis.2010.05.006

Malnar M, Kosicek M, Lisica A, et al. Cholesterol-depletion corrects APP and BACE1 mistrafficking in NPC1-deficient cells. *Biochim Biophys Acta* [Internet] 2012;1822(8):1270-1283. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925443912000890?via%3Dihub>. Doi:10.1016/j.bbadis.2012.04.002

Marino, M., Zhou, L., Rincon, M. Y., Callaerts-Vegh, Z., Verhaert, J., Wahis, J., Creemers, E., Yshii, L., Wierda, K., Saito, T., Marneffe, C., Voytyuk, I., Wouters, Y., Dewilde, M., Duqué, S. I., Vincke, C., Levites, Y., Golde, T. E., Saido, T. C., Muyldermans, S., ... Holt, M. G. (2022). AAV-mediated delivery of an anti-BACE1 VHH alleviates pathology in an Alzheimer's disease model. *EMBO molecular medicine*, 14(4), e09824. <https://doi.org/10.15252/emmm.201809824>.

Mariño G, Madeo F, Kroemer G. Autophagy for tissue homeostasis and neuroprotection. *Curr Opin Cell Biol* [Internet] 2011; 23(2):198-206. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0955067410001729?via%3Dihub>. Doi: 10.1016/j.ceb.2010.10.001

Martinez-Gardeazabal J., González de San Román E., Moreno-Rodríguez M., Llorente-Ovejero A., Manuel I., Rodríguez-Puertas R., et al. (2017). Lipid mapping of the rat brain for models of disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1859 1548–1557. 10.1016/j.bbamem.2017.02.011

Martinez-Lozada Z., Guillem A.M., Robinson M.B. Transcriptional Regulation of Glutamate Transporters: From Extracellular Signals to Transcription Factors. *Adv. Pharmacol.* 2016;76:103–145. doi: 10.1016/bs.apha.2016.01.004.

Mazaud D., Kottler B., Gonçalves-Pimentel C., Proelss S., Tüchler N., Deneubourg C., Yuasa Y., Diebold C., Jungbluth H., Lai E.C., Hirth F., Giangrande A., Fanto M. Transcriptional Regulation of the Glutamate/GABA/Glutamine Cycle in Adult Glia Controls Motor Activity and Seizures in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 2019;39(27):5269–5283. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1833-18.2019.

Medina M. (2018). An Overview on the Clinical Development of Tau-Based Therapeutics. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 1160. <https://doi.org/10.3390/ijms19041160>

Melov S, Adlard PA, Morten K, et al. Mitochondrial oxidative stress causes hyperphosphorylation of tau. *PLoS One* [Internet] 2007;2(6):e536. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1888726/>. Doi:10.1371/journal.pone

Mencarelli C, Martinez-Martinez P. Ceramide function in the brain: when a slight tilt is enough. *Cell Mol Life Sci* [Internet] 2013;70(2):181-203. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3535405/>. Doi:10.1007/s00018-012-1038-x

Ménesi D, Kitajka K, Molnár E, et al. Gene and protein expression profiling of the fat-1 mouse brain. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2009;80(1), 33–42

Mongin A. A. (2016). Volume-regulated anion channel--a frenemy within the brain. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 468(3), 421–441. <https://doi.org/10.1007/s00424-015-1765-6>

Morris, M. C., Evans, D. A., Bienias, J. L., Tangney, C. C., Bennett, D. A., Wilson, R. S., Aggarwal, N., & Schneider, J. (2003). Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Archives of neurology*, 60(7), 940–946. <https://doi.org/10.1001/archneur.60.7.940>

Morris MC, Tangney CC. Dietary fat composition and dementia risk. *Neurobiol Aging* [Internet] 2014;35 Suppl 2:S59-S64. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4107296/>. Doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.038

Mossakowski AA, Pohlan J, Bremer D, et al. Tracking CNS and systemic sources of oxidative stress during the course of chronic neuroinflammation. *Acta Neuropathol* [Internet] 2015;130(6):799–814. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4654749/>. Doi:10.1007/s00401-015-1497-x

Mountjoy C., Roth M., Evans N., Evans H. Cortical neuronal counts in normal elderly controls and demented patients. *Neurobiol. Aging*. 1983;4:1–11. doi: 10.1016/0197-4580(83)90048-9

Muoio, V., Persson, P. B., & Sendeski, M. M. The neurovascular unit - concept review. *Acta Physiologica* [Internet] 2014; 210(4):790–798. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/apha.12250>. Doi: 10.1111 / apha.12250).

Nation, D. A., Sweeney, M. D., Montagne, A., Sagare, A. P., D'Orazio, L. M., Pachicano, M., Seppehrband, F., Nelson, A. R., Buennagel, D. P., Harrington, M. G., Benzinger, T., Fagan, A. M., Ringman, J. M., Schneider, L. S., Morris, J. C., Chui, H. C., Law, M., Toga, A. W., & Zlokovic, B. V. (2019). Blood-brain barrier breakdown is an early biomarker of

human cognitive dysfunction. *Nature medicine*, 25(2), 270–276.
<https://doi.org/10.1038/s41591-018-0297-y>

Nelson TJ, Alkon DL. Oxidation of Cholesterol by amyloid precursor protein and B-amyloid peptide. *J. Biol. Chem* [Internet] 2005; 280:7377-7387. Available from: <https://www.jbc.org/content/280/8/7377.long>. Doi: 10.1074/jbc.M409071200 76.

Nizamutdinov D, et al., Hepatic alterations are accompanied by changes to bile acid transporter-expressing neurons in the hypothalamus after traumatic brain injury. *Sci Rep*, 2017. 7: p. 40112

Onaolapo, A. Y., & Onaolapo, O. J. (2021). Peripheral and Central Glutamate Dyshomeostasis in Neurodegenerative Disorders. *Current neuropharmacology*, 19(7), 1069–1089. <https://doi.org/10.2174/1570159X18666201015161919>

Organización Mundial de la Salud [Internet] Sitio web mundial; 2019. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dementia#>

Ory DS. The niemann-pick disease genes; regulators of cellular cholesterol homeostasis. *Trends Cardiovasc Med* [Internet] 2004;14(2):66-72. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1050173803001956?via%3Dihub>. Doi:10.1016/j.tcm.2003.12.003 70.

Palafox-Sánchez, V., Ying, Z., Royes, L., & Gomez-Pinilla, F. (2021). The interaction between brain and liver regulates lipid metabolism in the TBI pathology. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1867(4), 166078. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2021.166078>

Parkin ET, Turner AJ, Hooper NM. Amyloid precursor protein, although partially detergentinsoluble in mouse cerebral cortex, behaves as an atypical lipid raft protein. *Biochem J* [Internet] 1999;344 Pt 1(Pt 1):23-30. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1220609/> 18.

Patabendige, A., Singh, A., Jenkins, S., Sen, J., & Chen, R. (2021). Astrocyte Activation in Neurovascular Damage and Repair Following Ischaemic Stroke. *International journal of molecular sciences*, 22(8), 4280. <https://doi.org/10.3390/ijms22084280>

Patel, H., Martinez, P., Perkins, A., Taylor, X., Jury, N., McKinzie, D., & Lasagna-Reeves, C. A. (2022). Pathological tau and reactive astrogliosis are associated with distinct functional deficits in a mouse model of tauopathy. *Neurobiology of aging*, 109, 52–63. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2021.09.006>

Pendlebury, S. T., Rothwell, P. M., & Oxford Vascular Study (2019). Incidence and prevalence of dementia associated with transient ischaemic attack and stroke: analysis of the population-based Oxford Vascular Study. *The Lancet. Neurology*, 18(3), 248–258. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30442-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30442-3).

Peter, A., Cegan, A., Wagner, S., Lehmann, R., Stefan, N., Königsrainer, A., Königsrainer, I., Häring, H. U., & Schleicher, E. (2009). Hepatic lipid composition and stearyl-coenzyme A desaturase 1 mRNA expression can be estimated from plasma VLDL fatty acid ratios. *Clinical chemistry*, 55(12), 2113–2120. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2009.127274>

Peters F, Salihoglu H, Rodrigues E, et al. BACE1 inhibition more effectively suppresses initiation than progression of β -amyloid pathology. *Acta Neuropathol* [Internet] 2018;135(5):695–710. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5904228/>. Doi:10.1007/s00401-017-1804-9

Pickford, F., Masliah, E., Britschgi, M., Lucin, K., Narasimhan, R., Jaeger, P. A., Small, S., Spencer, B., Rockenstein, E., Levine, B., & Wyss-Coray, T. (2008). The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *The Journal of clinical investigation*, 118(6), 2190–2199. <https://doi.org/10.1172/JCI33585>

Piedrahita, D., Castro-Alvarez, J. F., Boudreau, R. L., Villegas-Lanau, A., Kosik, K. S., Gallego-Gomez, J. C., & Cardona-Gomez, G. P. (2015). beta-Secretase 1's Targeting Reduces Hyperphosphorylated Tau, Implying Autophagy Actors in 3xTg-AD Mice. *Front Cell Neurosci*, 9, 498. doi:10.3389/fncel.2015.00498

Piedrahita, D., Castro-Alvarez, J. F., Boudreau, R. L., Villegas-Lanau, A., Kosik, K. S., Gallego-Gomez, J. C., & Cardona-Gómez, G. P. (2016). β -Secretase 1's Targeting Reduces

Hyperphosphorylated Tau, Implying Autophagy Actors in 3xTg-AD Mice. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 498. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00498>

Pike LJ. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res* [Internet] 2006;47(7):1597-1598. Available from: <https://www.jlr.org/content/47/7/1597.long>. Doi:10.1194/jlr.E600002-JLR200

Pistell PJ, Morrison CD, Gupta S, et al. Cognitive impairment following high fat diet consumption is associated with brain inflammation. *J Neuroimmunol* [Internet] 2010;219(1-2):25–32. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2823983/>. Doi: 10.1016/j.jneuroim.2009.11.010

Plemel, J. R., Michaels, N. J., Weishaupt, N., Caprariello, A. V., Keough, M. B., Rogers, J. A., Yukselgolu, A., Lim, J., Patel, V. V., Rawji, K. S., Jensen, S. K., Teo, W., Heyne, B., Whitehead, S. N., Stys, P. K., & Yong, V. W. (2018). Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced demyelination: A primary lipid disrupting myelinopathy. *Glia*, 66(2), 327–347.

Pluta R. (2022). Alzheimer's Disease Connected Genes in the Post-Ischemic Hippocampus and Temporal Cortex. *Genes*, 13(6), 1059. <https://doi.org/10.3390/genes13061059>

Polo-Hernández, E., De Castro, F., García-García, A. G., Taberner, A., & Medina, J. M. (2010). Oleic acid synthesized in the periventricular zone promotes axonogenesis in the striatum during brain development. *Journal of neurochemistry*, 114(6), 1756–1766. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06891.x>

Polo-Hernández, E., Tello, V., Arroyo, A. A., Domínguez-Prieto, M., de Castro, F., Taberner, A., & Medina, J. M. (2014). Oleic acid synthesized by stearoyl-CoA desaturase (SCD-1) in the lateral periventricular zone of the developing rat brain mediates neuronal growth, migration and the arrangement of prospective synapses. *Brain research*, 1570, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.04.038>

Prince M, Wimo A, Guerchet M, Ali GC, Wu YT, Prima M. World Alzheimer Report 2015 The global impact of dementia an analysis of prevalence, incidence, cost and trends. URL: <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2015.pdf>. [28.07.2017]

Propson, N. E., Roy, E. R., Litvinchuk, A., Köhl, J., & Zheng, H. (2021). Endothelial C3a receptor mediates vascular inflammation and blood-brain barrier permeability during aging. *The Journal of clinical investigation*, 131(1), e140966. <https://doi.org/10.1172/JCI140966>

Puglielli L, Ellis BC, Saunders AJ, Kovacs DM. Ceramide stabilizes beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and promotes amyloid beta-peptide biogenesis. *J Biol Chem* [Internet] 2003;278(22):19777-19783. Available from: <https://www.jbc.org/content/278/22/19777.long>. Doi:10.1074/jbc.M300466200

Raz L, Knoefel J, Bhaskar K. The neuropathology and cerebrovascular mechanisms of dementia. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet] 2016;36(1):172–186. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4758551/>. Doi: 10.1038/jcbfm.2015.164

Reddy, P. H., Yin, X., Manczak, M., Kumar, S., Pradeepkiran, J. A., Vijayan, M., & Reddy, A. P. (2018). Mutant APP and amyloid beta-induced defective autophagy, mitophagy, mitochondrial structural and functional changes and synaptic damage in hippocampal neurons from Alzheimer's disease. *Human molecular genetics*, 27(14), 2502–2516. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy154>

Refolo LM, Sambamurti K, Efthimiopoulos S, Pappolla MA, Robakis NK. Evidence that secretase cleavage of cell surface Alzheimer amyloid precursor occurs after normal endocytic internalization. *J Neurosci Res* [Internet]1995;40(5):694-706. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jnr.490400515>. Doi:10.1002/jnr.490400515

Refolo L, Pappolla M, Malester B, et al. Hypercholesterolemia Accelerates the Alzheimer's Amyloid Pathology in a Transgenic Mouse Model. *Neurobiology of Disease* [Internet] 2000; 7, 321–331. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0969996100903048>. Doi:10.1006/nbdi.2000.0304

Rege SD, et al., Brain Trauma Disrupts Hepatic Lipid Metabolism: Blame It on Fructose? *Mol Nutr Food Res*, 2019. 63(15): p. e1801054

Roongta, U. V., Pabalan, J. G., Wang, X., Ryseck, R. P., Fagnoli, J., Henley, B. J., Yang, W. P., Zhu, J., Madireddi, M. T., Lawrence, R. M., Wong, T. W., & Rupnow, B. A. (2011).

Cancer cell dependence on unsaturated fatty acids implicates stearoyl-CoA desaturase as a target for cancer therapy. *Molecular cancer research: MCR*, 9(11), 1551–1561. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0126>

Rosamond, W., Flegal, K., Friday, G., Furie, K., Go, A., Greenlund, K., Haase, N., Ho, M., Howard, V., Kissela, B., Kittner, S., Lloyd-Jones, D., McDermott, M., Meigs, J., Moy, C., Nichol, G., O'Donnell, C. J., Roger, V., Rumsfeld, J., Sorlie, P., ... American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee (2007). Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*, 115(5), e69–e171. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.179918>

Savage, J. C., Jay, T., Goduni, E., Quigley, C., Mariani, M. M., Malm, T., Ransohoff, R. M., Lamb, B. T., & Landreth, G. E. (2015). Nuclear receptors license phagocytosis by trem2+ myeloid cells in mouse models of Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 35(16), 6532–6543. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4586-14.2015>

Sandsmark, D. K., Bashir, A., Wellington, C. L., & Diaz-Arrastia, R. (2019). Cerebral Microvascular Injury: A Potentially Treatable Endophenotype of Traumatic Brain Injury-Induced Neurodegeneration. *Neuron*, 103(3), 367–379. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.06.002>

Santos, G., & Díaz, M. (2021). Dimensional Changes in Lipid Rafts from Human Brain Cortex Associated to Development of Alzheimer's Disease. Predictions from an Agent-Based Mathematical Model. *International journal of molecular sciences*, 22(22), 12181. <https://doi.org/10.3390/ijms222212181>

Sastry P.S. Lipids of nervous tissue: Composition and metabolism. *Prog. Lipid Res.* 1985;24:69–176. doi: 10.1016/0163-7827(85)90011-6

Schafer, D. P., Lehrman, E. K., & Stevens, B. (2013). The "quad-partite" synapse: microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. *Glia*, 61(1), 24–36. <https://doi.org/10.1002/glia.22389>

- Schäffner I, Minakaki G, Khan MA, et al. FoxO Function Is Essential for Maintenance of Autophagic Flux and Neuronal Morphogenesis in Adult Neurogenesis. *Neuron* [Internet] 2018;99(6):1188–1203. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6186958/>. Doi: 10.1016/j.neuron.2018.08.017
- Selkoe D. J. (1991). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6, 487–498. 10.1016/0896-6273(91)90052-2
- Selkoe D. Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease. *Annu Rev Cell Biol* [Internet]1994; 10:373-403. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.cb.10.110194.002105>.
- Selvaraj, P., Tanaka, M., Wen, J., & Zhang, Y. (2021). The Novel Monoacylglycerol Lipase Inhibitor MJN110 Suppresses Neuroinflammation, Normalizes Synaptic Composition and Improves Behavioral Performance in the Repetitive Traumatic Brain Injury Mouse Model. *Cells*, 10(12), 3454. <https://doi.org/10.3390/cells10123454>
- Seo, S. W., Thibodeau, M. P., Perry, D. C., Hua, A., Sidhu, M., Sible, I., Vargas, J., Gaus, S. E., Rabinovici, G. D., Rankin, K. D., Boxer, A. L., Kramer, J. H., Rosen, H. J., Gorno-Tempini, M. L., Grinberg, L. T., Huang, E. J., DeArmond, S. J., Trojanowski, J. Q., Miller, B. L., & Seeley, W. W. (2018). Early vs late age at onset frontotemporal dementia and frontotemporal lobar degeneration. *Neurology*, 90(12), e1047–e1056. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000005163>
- Shi, X., Luo, L., Wang, J., Shen, H., Li, Y., Mamtilahun, M., Liu, C., Shi, R., Lee, J. H., Tian, H., Zhang, Z., Wang, Y., Chung, W. S., Tang, Y., & Yang, G. Y. (2021). Stroke subtype-dependent synapse elimination by reactive gliosis in mice. *Nature communications*, 12(1), 6943. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27248-x>,
- Simard M, Arcuino G, Takano T, Liu Q S, Nedergaard M. Signaling at the gliovascular interface. *J Neurosci* [Internet] 2003; (23): 9254–9262. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6740832/>. Doi: 10.1523 / JNEUROSCI.23-27- 09254.2003

Simons M, Keller P, De Strooper B, et al. Cholesterol depletion inhibits the generation of betaamyloid in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* [Internet]1998; 95, 6460–6464. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC27798/>. Doi: 10.1073/pnas.95.11.6460

Sivaprakasam, C., Vijayakumar, R., Arul, M., & Nachiappan, V. (2016). Alteration of mitochondrial phospholipid due to the PLA₂ activation in rat brains under cadmium toxicity. *Toxicology research*, 5(6), 1680–1687. <https://doi.org/10.1039/c6tx00201c>

Small, C., Dagra, A., Martinez, M., Williams, E., & Lucke-Wold, B. (2022). Examining the role of astrogliosis and JNK signaling in post-traumatic epilepsy. *Egyptian Journal of Neurosurgery*, 37, 1. <https://doi.org/10.1186/s41984-021-00141-x>

Solfrizzi, V., D'Introno, A., Colacicco, A. M., Capurso, C., Del Parigi, A., Capurso, S., Gadaleta, A., Capurso, A., & Panza, F. (2005). Dietary fatty acids intake: possible role in cognitive decline and dementia. *Experimental gerontology*, 40(4), 257–270. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.01.001>

Starčević, K., Filipović, N., Galan, A., Micek, V., Gudan Kurilj, A., & Mašek, T. (2018). Hepatic Lipogenesis and Brain Fatty Acid Profile in Response to Different Dietary n6/n3 Ratios and DHA/EPA Supplementation in Streptozotocin Treated Rats. *Molecular nutrition & food research*, 62(9), e1701007. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201701007>

Südhof TC. The cell biology of synapse formation. *J Cell Biol.* 2021;220(7): e202103052. doi:10.1083/jcb.202103052

Szablewski L. (2017). Glucose Transporters in Brain: In Health and in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 55(4), 1307–1320. <https://doi.org/10.3233/JAD-160841>

Takami M, Nagashima Y, Sano Y, et al. gamma-Secretase: successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment. *J Neurosci* [Internet] 2009; 29(41):13042–13052. Available from: <https://www.jneurosci.org/content/29/41/13042> doi:10.1523/JNEUROSCI.2362-09.2009

Tammineni, P., Ye, X., Feng, T., Aikal, D., & Cai, Q. (2017). Impaired retrograde transport of axonal autophagosomes contributes to autophagic stress in Alzheimer's disease neurons. *eLife*, 6, e21776. <https://doi.org/10.7554/eLife.21776>,

Tater, P., & Pandey, S. (2021). Post-stroke Movement Disorders: Clinical Spectrum, Pathogenesis, and Management. *Neurology India*, 69(2), 272–283. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.314574>

Terenzio, M., Schiavo, G., & Fainzilber, M. (2017). Compartmentalized Signaling in Neurons: From Cell Biology to Neuroscience. *Neuron*, 96(3), 667–679. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.10.015>

Thal, D. R., Grinberg, L. T., & Attems, J. (2012). Vascular dementia: different forms of vessel disorders contribute to the development of dementia in the elderly brain. *Experimental gerontology*, 47(11), 816–824. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2012.05.023>

Terrando, N., Park, J. J., Devinney, M., Chan, C., Cooter, M., Avasarala, P., Mathew, J. P., Quinones, Q. J., Maddipati, K. R., Berger, M., & MADCO-PC Study Team (2021). Immunomodulatory lipid mediator profiling of cerebrospinal fluid following surgery in older adults. *Scientific reports*, 11(1), 3047. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82606-5>

Thinakaran G, Teplow DB, Siman R, Greenberg B, Sisodia SS. Metabolism of the "Swedish" amyloid precursor protein variant in neuro2a (N2a) cells. Evidence that cleavage at the "betasecretase" site occurs in the golgi apparatus. *J Biol Chem* [Internet]1996;271(16):9390-9397. Available from: <https://www.jbc.org/content/271/16/9390.long>. Doi:10.1074/jbc.271.16.9390.

Thirumangalakudi, L., Samany, P. G., Owoso, A., Wiskar, B., & Grammas, P. (2006). Angiogenic proteins are expressed by brain blood vessels in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 10(1), 111–118. <https://doi.org/10.3233/jad-2006-10114>

Tymianski M., Tator C.H. Normal and abnormal calcium homeostasis in neurons: a basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury. *Neurosurgery*. 1996;38(6):1176–1195.

Ungvari, Z., Toth, P., Tarantini, S., Prodan, C. I., Sorond, F., Merkely, B., & Csiszar, A. (2021). Hypertension-induced cognitive impairment: from pathophysiology to public health. *Nature reviews. Nephrology*, 17(10), 639–654. <https://doi.org/10.1038/s41581-021-00430-6>

Uryu, S., Tokuhira, S., & Oda, T. (2003). beta-Amyloid-specific upregulation of stearoyl coenzyme A desaturase-1 in macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*, 303(1), 302–305. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00334-6](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00334-6)

Uto Y. (2016). Recent progress in the discovery and development of stearoyl CoA desaturase inhibitors. *Chemistry and physics of lipids*, 197, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2015.08.018>

Vance J. E. (2015). Phospholipid synthesis and transport in mammalian cells. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 16(1), 1–18. <https://doi.org/10.1111/tra.12230>

Vasile, F., Dossi, E., & Rouach, N. (2017). Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain structure & function*, 222(5), 2017–2029. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1383-5>

Verkhatsky A, Zorec R, Rodríguez JJ, Parpura V. Astroglia dynamics in ageing and Alzheimer's disease. *Current Opinion in Pharmacology*. 2016;26:74–79. ISSN 1471-4892, <https://doi.org/10.1016/j.coph.2015.09.011>.

Villamil-Ortiz, J. G., & Cardona-Gómez, G. P. (2018). cPLA2 and desaturases underlie the tau hyperphosphorylation offset induced by BACE knock-down in neuronal primary cultures. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*, 1864(11), 3696–3707. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.08.028>

Vipin, A., Satish, V., Saffari, S. E., Koh, W., Lim, L., Silva, E., Nyu, M. M., Choong, T. M., Chua, E., Lim, L., Ng, A., Chiew, H. J., Ng, K. P., & Kandiah, N. (2021). Dementia in Southeast Asia: influence of onset-type, education, and cerebrovascular disease. *Alzheimer's research & therapy*, 13(1), 195. <https://doi.org/10.1186/s13195-021-00936-y>

Vivinetto, A. L., Kim, I. D., Goldberg, D. C., Fones, L., Brown, E., Tarabykin, V. S., Hill, C. E., Cho, S., & Cave, J. W. (2020). Zeb2 Is a Regulator of Astroglialosis and Functional

Recovery after CNS Injury. *Cell reports*, 31(13), 107834.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107834>.

Wang, J., Yu, L., Schmidt, R.E., Su, C., Huang, X., Gould, K., Cao, G., 2005. Characterization of HSCD5, a novel human stearyl-CoA desaturase unique to primates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332, 735–742

Wang, M., Jing, T., Wang, X., & Yao, D. (2018). Beta-secretase/BACE1 promotes APP endocytosis and processing in the endosomes and on cell membrane. *Neuroscience letters*, 685, 63–67. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.08.016>

Wang R, Laveskog A, Laukka EJ, et al. MRI load of cerebral microvascular lesions and neurodegeneration, cognitive decline, and dementia. *Neurology* [Internet] 2018;91(16):e1487-e1497. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6202944/>
Doi:10.1212/WNL.0000000000006355

Wei, Y., Chen, T., Bosco, D. B., Xie, M., Zheng, J., Dheer, A., Ying, Y., Wu, Q., Lennon, V. A., & Wu, L. J. (2021). The complement C3-C3aR pathway mediates microglia-astrocyte interaction following status epilepticus. *Glia*, 69(5), 1155–1169. <https://doi.org/10.1002/glia.23955>

Werneburg, S., Jung, J., Kunjamma, R. B., Ha, S. K., Luciano, N. J., Willis, C. M., Gao, G., Biscola, N. P., Havton, L. A., Crocker, S. J., Popko, B., Reich, D. S., & Schafer, D. P. (2020). Targeted Complement Inhibition at Synapses Prevents Microglial Synaptic Engulfment and Synapse Loss in Demyelinating Disease. *Immunity*, 52(1), 167–182.e7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.12.004>

Winkler, L., Blasig, R., Breitzkreuz-Korff, O., Berndt, P., Dithmer, S., Helms, H. C., Puchkov, D., Devraj, K., Kaya, M., Qin, Z., Liebner, S., Wolburg, H., Andjelkovic, A. V., Rex, A., Blasig, I. E., & Haseloff, R. F. (2021). Tight junctions in the blood-brain barrier promote edema formation and infarct size in stroke - Ambivalent effects of sealing proteins. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of*

Cerebral Blood Flow and Metabolism, 41(1), 132–145.
<https://doi.org/10.1177/0271678X20904687>

Wood, C., Zhang, J., Aydin, D., Xu, Y., Andreone, B. J., Langen, U. H., Dror, R. O., Gu, C., & Feng, L. (2021). Structure and mechanism of blood-brain-barrier lipid transporter MFSD2A. *Nature*, 596(7872), 444–448. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03782-y>

Xie, Y., Chen, X., Li, Y., Chen, S., Liu, S., Yu, Z., & Wang, W. (2022). Transforming growth factor- β 1 protects against LPC-induced cognitive deficit by attenuating pyroptosis of microglia via NF- κ B/ERK1/2 pathways. *Journal of neuroinflammation*, 19(1), 194. <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02557-0>

Xing C, Hayakawa K, Lok J, Arai K, Lo E. H. Injury and repair in the neurovascular unit. *Neurological Research* [Internet] 2012; 34(4): 325–330. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3985722/>. Doi: 10.1179 / 1743132812Y.0000000019

Xin, Z., Zhao, H., Serby, M. D., Liu, B., Liu, M., Szczepankiewicz, B. G., Nelson, L. T., Smith, H. T., Suhar, T. S., Janis, R. S., Cao, N., Camp, H. S., Collins, C. A., Sham, H. L., Surowy, T. K., & Liu, G. (2008). Discovery of piperidine-aryl urea-based stearyl-CoA desaturase 1 inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 18(15), 4298–4302. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.06.088>

Xu, X., Sun, Y., Cen, X., Shan, B., Zhao, Q., Xie, T., Wang, Z., Hou, T., Xue, Y., Zhang, M., Peng, D., Sun, Q., Yi, C., Najafov, A., & Xia, H. (2021). Metformin activates chaperone-mediated autophagy and improves disease pathologies in an Alzheimer disease mouse model. *Protein & cell*, 12(10), 769–787. <https://doi.org/10.1007/s13238-021-00858-3>

Yau R, Doerner K, Castellanos E, et al. Assembly and Function of Heterotypic Ubiquitin Chains in Cell-Cycle and Protein Quality Control. *Cell* [Internet] 2017;171(4):918–933. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29033132/>. Doi: 10.1016/j.cell.2017.09.040

Zhang, J., Yu, J., Bao, Y., Xie, Q., Xu, Y., Zhang, J., & Wang, P. (2017). Constraint-induced aphasia therapy in post-stroke aphasia rehabilitation: A systematic review and meta-analysis

of randomized controlled trials. *PloS one*, 12(8), e0183349.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183349>

Zhang, Q., Pangrsic, T., Kreft, M., Krzan, M., Li, N., Sul, J. Y., Halassa, M., Van Bockstaele, E., Zorec, R., & Haydon, P. G. (2004). Fusion-related release of glutamate from astrocytes. *The Journal of biological chemistry*, 279(13), 12724–12733.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M312845200>

Zhang, X., Wei, M., Fan, J., Yan, W., Zha, X., Song, H., Wan, R., Yin, Y., & Wang, W. (2021). Ischemia-induced upregulation of autophagy preludes dysfunctional lysosomal storage and associated synaptic impairments in neurons. *Autophagy*, 17(6), 1519–1542.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1840796>

Zhao, Z., Hu, X., Wang, J., Wang, J., Hou, Y., & Chen, S. (2021). Zinc finger E-Box binding homeobox 2 (ZEB2)-induced astrogliosis protected neuron from pyroptosis in cerebral ischemia and reperfusion injury. *Bioengineered*, 12(2), 12917–12930.
<https://doi.org/10.1080/21655979.2021.2012551>

Zhou Y., Danbolt N.C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J. Neural Transm. (Vienna)* 2014;121(8):799–817. doi: 10.1007/s00702-014-1180-8),

Zlokovic B. V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57(2), 178–201. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.003>

12. ANEXOS

Figura anexa 1

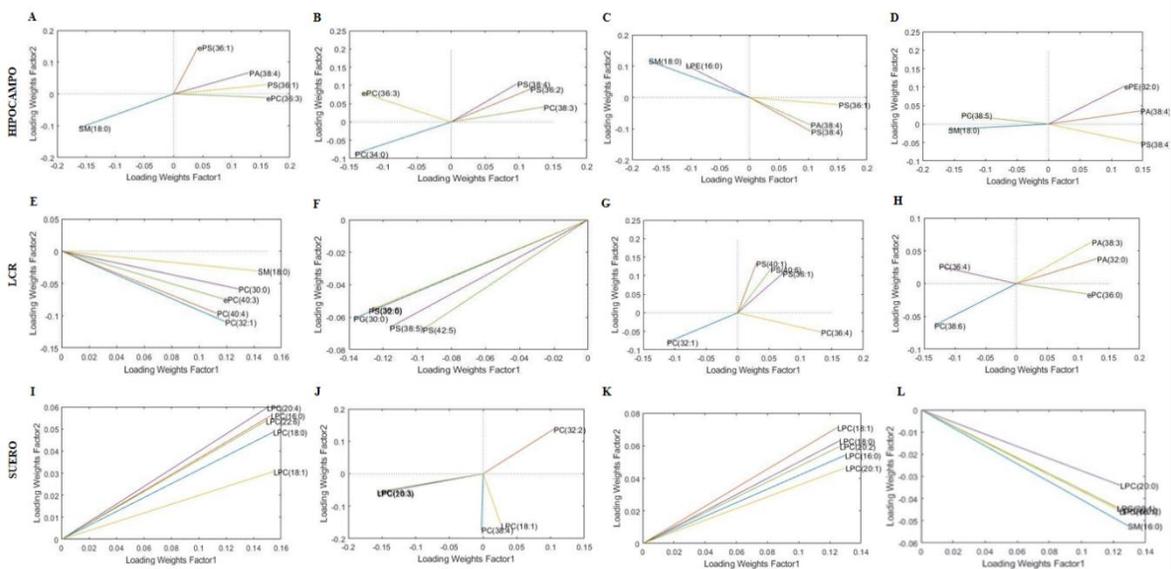


Figura suplementaria 1. Representación de la proyección de fosfolípidos con mayor discriminación según PLS-DA. Proyección de fosfolípidos más discriminantes en el hipocampo para todos los grupos (A), solo los grupos sham (B), solo los grupos isquémicos (C) y los grupos isquémicos sin tratamiento con los isquémicos con doble silenciamiento (D). En el mismo orden de grupos para LCR (E-H) y en el mismo orden de grupos para suero (I-L).

Anexos finales:

Aceptación ponencia en congreso internacional de neurociencias:



FALAN

Federation of Latin American and
Caribbean Neuroscience Societies

August 8th 2022

To whom it may concern

By this means, we communicate that the student Ferley Alejandro Bedoya Guzmán(cc: 1.040.031.869, Passport n; AV898625) has been accepted to participate in the FALAN 2022 Congress which will be held in Belém, Brazil September 11th 14th 2022.

Best regards,

Best regards,



Francesco M.

RossiFALAN

President

Federation of Latin American and Caribbean Neuroscience
Societieswebsite: <https://falan-ibrolarc.org/site/>

e-mail: [secretaria@falan-
ibrolarc.org](mailto:secretaria@falan-ibrolarc.org)

Certificado de congreso nacional e internacional de neurociencias en calidad de presentador:

3rd FALAN CONGRESS
September 11th-14th • 2022/Belém, Brazil

CERTIFICATE

We certify that the abstract

INFLUENCE OF CONVERGING FACTORS (BACE1 AND SCD1) ON PHOSPHOLIPID FATTY ACID COMPOSITION ON PRO-INFLAMMATORY AND DEGENERATIVE EVENTS IN AN IN VITRO NEUROVASCULAR MODEL (NEURON-ASTROCYTE, ASTROCYTE-ENDOTHELIUM).

by the authors FERLEY ALEJANDRO BEDOYA GUZMAN;
was presented as DIGITAL POSTER , during the **3rd Congress of the Federation of Latin American and Caribbean Neuroscience Societies (FALAN)**, held in the Hangar Convention and Fair Center of Amazon in Belém City, Pará, Brazil, from September the 11th to the 14th 2022.

September 14th, 2022.

F. Rossi
DR. FRANCESCO MATTIA ROSSI
FALAN President

Deborah Suchecki
DRA. DEBORAH SUCHECKI
SBNeC President

Promotion: FALAN
Realization: SBNeC
Sponsors: CAPES, CNPq, IBRO, PROPESP
Organization: Pauta.com

3rd FALAN CONGRESS
September 11th-14th • 2022/Belém, Brazil

CERTIFICATE

We certify that

FERLEY ALEJANDRO BEDOYA GUZMAN

participated at the **3rd Congress of the Federation of Latin American and Caribbean Neuroscience Societies (FALAN)**, held in the Hangar Convention and Fair Center of Amazon in Belém City, Pará, Brazil, from September the 11th to the 14th 2022.

September 14th, 2022.

F. Rossi
DR. FRANCESCO MATTIA ROSSI
FALAN President

Deborah Suchecki
DRA. DEBORAH SUCHECKI
SBNeC President

Promotion: FALAN
Realization: SBNeC
Sponsors: CAPES, CNPq, IBRO, PROPESP
Organization: Pauta.com

Certificado de congreso nacional e internacional de neurociencias en calidad de asistente:



Articulo de investigación sometido:

Journal: BBA - Molecular Basis of Disease

Title: **BACE1 and SCD1 are associated in dementias, and their double depletion produces motor and cognitive function recovery, impacting phospholipid profile changes**

Corresponding Author: Dr. Gloria Patricia Cardona Gomez

Co-Authors: M Pacheco-Herrero, Ph.D.; FA Bedoya-Guzman; Gutierrez-Vargas JA; Barrera-Sandoval AM; J Villamil-Ortiz; Villegas-Lanau CA; Arias-Londoño JD; E Area-Gómez