

**Cambios fosfolipídicos en hipocampo y suero sanguíneo de ratas postisquemia: un
análisis longitudinal.**

ESTUDIANTE:

IVÁN DANIEL SALOMÓN CRUZ B.Sc.

CORPORACIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

MEDELLÍN

2024

**CAMBIOS FOSFOLIPÍDICOS EN HIPOCAMPO Y SUERO SANGUÍNEO DE
RATAS POSTISQUEMIA: UN ANÁLISIS LONGITUDINAL.**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

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

Estudiante:

IVÁN DANIEL SALOMÓN CRUZ B.Sc.

Tutora:

GLORIA PATRICIA CARDONA GÓMEZ Ph.D.

Comité tutorial:

Johanna Gutiérrez Vargas B.Sc., Ph.D.

Juan Carlos Cruz Chem. Ing., Ph.D.

Estela Area-Gómez B.Sc., Ph.D.

CORPORACIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

MEDELLÍN

2024

ABSTRACT

Currently, most neurodegenerative diseases are diagnosed by the presence of clinical symptoms such as motor problems, ataxias, and cognitive decline; by this time, the brain already shows advanced deterioration. Medical imaging has significantly contributed to research but remains very late in the diagnostic timeline, in addition to being costly and difficult to access. Therefore, current research focuses on the finding for early biomarkers, especially those obtained from biofluids like cerebrospinal fluid and blood serum. This research project focuses on evaluating temporal changes in the composition of phospholipids in blood serum in an animal model of acute neurodegeneration due to ischemia. The phospholipid profile showed an inverse relationship between PC and LPC in the hippocampus and plasma, with an increase in the PC/LPC ratio in the hippocampus post-ischemia, followed by a decrease after the first month, while in the plasma it remained elevated until the fourth month. These changes correlated with acute inflammation, clearance processes, neurological recovery, and late cognitive decline. Bioinformatic analysis identified key enzymes in the remodeling of phospholipids, grouped into five clusters using STRING, highlighting LPCAT, MBOAT, PLA2, PEMT, and PISD, suggesting their role in lipid modulation and cellular homeostasis. This study emphasizes the importance of phospholipid remodeling in the evolution of neuronal damage, opening the possibility for new biomarkers and treatments that modulate phospholipid metabolism, improving recovery and reducing neuronal damage in neurodegenerative diseases.

RESUMEN

Los estudios médicos y neuropatológicos han permitido identificar y clasificar las enfermedades neurodegenerativas según las características clínicas de los pacientes, como ataxias, apraxias, problemas motores y estados de demencia, aunque en muchos casos se generan diagnósticos mixtos (1). Estas condiciones a menudo resultan en deterioro cognitivo, que se manifiesta como un síntoma asociado al daño en regiones específicas del cerebro, como el hipocampo y la corteza, indicando una neurodegeneración avanzada con un tratamiento inefectivo en esta etapa (2).

Los marcadores estándar para la neurodegeneración se identifican a nivel histopatológico mediante biopsias o postmortem, revelando acumulaciones proteicas características y otras anomalías como reactividad glial, atrofas, neuroinflamación y daño vascular (2). Sin embargo, actualmente no existe un biomarcador prodrómico para la neurodegeneración, excepto la identificación de mutaciones específicas en genes asociados con trastornos neurodegenerativos (3). Dado este panorama, la investigación actual se enfoca en la búsqueda de biomarcadores tempranos de fácil acceso que puedan anticipar los síntomas clínicos y permitan abordajes más eficientes para el tratamiento de estas enfermedades.

En este sentido, los biomarcadores *in vivo* que han cobrado importancia son los obtenidos a partir de biofluidos como el líquido cefalorraquídeo y el plasma sanguíneo, así como las imágenes cerebrales que utilizan marcadores específicos como PET-tau y PET-amiloide. No obstante, algunos de estos métodos siguen siendo de difícil acceso, como el CSF, o resultan costosos, como las imágenes PET (4). Por lo tanto, se ha centrado la atención en los diferentes componentes sanguíneos, como proteínas y metabolitos, como posibles biomarcadores, debido a su fácil obtención, reducción de costos en los análisis y la posibilidad de realizar seguimientos a lo largo del tiempo (5). Para que un biomarcador sea válido, debe estar asociado con características específicas de la enfermedad y presentar altos niveles de sensibilidad y especificidad.

Desde esta perspectiva, apoyándose en estudios previos (6,7) este proyecto de investigación tiene la hipótesis de que existen cambios tempranos en la composición de fosfolípidos en el plasma sanguíneo que están relacionados con los procesos tempranos y en el avance de la

neurodegeneración. El objetivo es evaluar el perfil y la composición de fosfolípidos en hipocampo y plasma en fases tempranas y de progresión en un modelo animal de neurodegeneración aguda por isquemia generada por oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAO) (8). Para ello, se utilizó evaluación neurológica y análisis por espectrometría de masas para cuantificar los fosfolípidos en diferentes momentos postisquemia (6h, 24h, 7d, 1m, 4m) en hipocampo y plasma. Además, se realizaron análisis bioinformáticos utilizando herramientas web para bases de datos de lipidómica, como LION/Web, LipidSig y BioPAN (9–11).

En el perfil fosfolipídico de hipocampo y suero se encontró una relación inversa entre PC y LPC. Este cambio en la relación PC/LPC en el hipocampo, presentó un aumento en la procesividad de PC a LPC desde las primeras horas hasta los 15 días postisquemia, seguido de una disminución en esta relación después del primer mes y una franca reducción a los 4 meses. Este patrón temporal en el hipocampo coincidió con el aumento de la relación PC/LPC en el plasma, el cual se intensificó hasta el primer mes y se mantuvo elevado hasta el cuarto mes postisquemia. Dichos cambios se correlacionaron con procesos agudos de inflamación, recuperación intrínseca en el status de patología neurológica al mes postisquemia, en concordancia con estudios previos (6,12); sin embargo con un empeoramiento tardío en el desempeño neurológico a los 4 meses postisquemia, que deben ser entendidos con mayor detalle. Por tal razón, se realizaron análisis de componentes principales PCA, análisis de correlación, enriquecimiento de vías por comportamientos procesos organelares, tazas de conversión, por características biofísicas membranales, ontología génica asociada a la remodelación de membranas.

El análisis bioinformático permitió identificar enzimas clave en la remodelación de PLs, clasificándolas en cinco clústeres mediante la herramienta STRING. Las enzimas LPCAT, MBOAT, PLA2, PEMT y PISD, del clúster principal, mostraron comportamientos específicos postisquemia, sugiriendo su papel en la modulación de la composición lipídica y la homeostasis celular. En particular, PLA2 y LPCAT fueron activas en el suero, mientras que MBOAT tuvo un rol temprano en la respuesta isquémica. Enzimas como PEMT y PISD mostraron actividades en fases tardías y tempranas respectivamente, indicando sus roles en la reparación y respuesta inmediata al daño.

El estudio destaca la dinámica y complejidad de la remodelación de fosfolípidos en isquemia cerebral, subrayando su importancia en la evolución del daño neuronal y la conversión de lesiones reversibles a irreversibles. Los resultados sugieren que estos procesos podrían influir en la reparación celular, las vías inflamatorias y la homeostasis, abriendo la posibilidad de identificar nuevos biomarcadores y desarrollar tratamientos que modulen el metabolismo de fosfolípidos, mejorando la recuperación y reduciendo el daño neuronal en enfermedades neurodegenerativas. La validación en humanos es necesaria para confirmar estos hallazgos y su aplicación clínica. En conjunto, lo anterior sugiere que la remodelación de fosfolípidos está asociado a la afección estructural y funcional de las membranas celulares, tras la formación de gotas de lípidos, procesos como la lipólisis y la lipofagia. Además, dichos cambios específicos están relacionados al remodelamiento y generación de precursores de moléculas bioactivas que participan en la señalización celular proinflamatoria temprana, recuperación intermedia y pérdida de conectividad tardía. Sin embargo, se necesita más investigación para comprender completamente los mecanismos subyacentes y validar la relevancia clínica en el contexto de infarto cerebral isquémico en humanos, debido a la fuerte sugerencia pronóstica y su valor en un tratamiento diferencial y preventivo.

TABLA DE CONTENIDO

Contenido

ABSTRACT	3
RESUMEN	4
TABLA DE CONTENIDO	7
LISTA DE ABREVIACIONES	10
LISTA DE FIGURAS	12
PALABRAS CLAVES.....	13
INTRODUCCIÓN.....	14
GENERALIDADES DE LAS MEMBRANAS LIPÍDICAS DEL SISTEMA NERVIOSO	14
MEMBRANAS Y TRANSMISIÓN SINÁPTICA.....	18
NEURONAS Y COMUNICACIÓN.....	18
OLIGODENDROCITOS, AISLANTES LIPÍDICOS	19
EXOCITOSIS SINÁPTICA.....	20
MICROGLÍA, MOVILIDAD Y FAGOCITOSIS	22
ASTROCITOS, SÍNTESIS Y TRANSPORTE LIPÍDICO	23
LIPOPROTEÍNAS NEURALES	24
LÍPIDOS Y NEURODEGENERACIÓN	26
ISQUEMIA CEREBRAL	26
ISQUEMIA Y PEROXIDACIÓN LIPÍDICA	28
LÍPIDOS PLASMÁTICOS COMO BIOMARCADORES DEL ESTADO CEREBRAL	29
OBJETIVO GENERAL	31
Objetivos específicos	31
METODOLOGIA.....	32

Procedimientos con animales:	32
Modelo de oclusión tMCAO:	32
Evaluación neurológica:	33
Análisis de lípidos:.....	34
Espectrometría de masas:.....	34
Análisis estadístico:	35
Análisis bioinformáticos:	35
RESULTADOS	37
1. Diferencias en el perfil de fosfolípidos entre el hipocampo y el suero sanguíneo.	37
2. El hipocampo presenta variación fosfolipídica con dinámicas interclases y significativa participación de plasminógenos en postisquemia.	37
3. La inversión de los niveles de PC/LPC es una tendencia marcada en el suero de forma longitudinal.	39
4. El análisis por PCA rescata el aporte en la variabilidad de los derivados PE en el hipocampo y derivados PC en el suero además de participación de la SM en las dinámicas fosfolipídicas provenientes de ambas muestras.	42
5. Comportamiento longitudinal subclases PC y PE postisquemia.	45
6. Correlación de las clases fosfolipídicas de hipocampo y suero con el desempeño motor postisquemia.	48
7. Implicaciones celulares asociadas a los perfiles fosfolipídicos del hipocampo y suero postisquemia, acercamiento bioinformático.	52
8. Variaciones de características biofísicas de membranas basados en la composición fosfolipídica postisquemia.	54
9. Conversión y remodelamiento de fosfolípidos como respuesta a la injuria cerebral.	57
10. Principales genes asociados a los cambios fosfolipídicos en postisquemia.	61
DISCUSIÓN	64
Composición fosfolipídica hipocampal:	65

Composición fosfolipídica sérica:.....	68
Cambios en el perfil fosfolipídico postisquemia en hipocampo:.....	71
Cambios en el perfil fosfolipídico postisquemia en suero:.....	75
Correlación de clases lipídicas con el desempeño neurológico postisquemia:.....	80
Interpretación lipidómica basada en abordaje bioinformático:.....	81
Acercamiento celular:	81
Acercamiento biofísico:	84
Acercamiento por reacciones enzimáticas:	88
MODELO HIPOTÉTICO.....	92
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	92
REFERENCIAS	94
ANEXOS	128
MATERIAL SUPLEMENTARIO	128
ARTÍCULOS ASOCIADOS	131
PARTICIPACIÓN EN EVENTOS ACADÉMICOS	134
AGRADECIMIENTOS.....	135

LISTA DE ABREVIACIONES

AA	Arachidonic acid
APP	Amyloid Precursor Protein
BACE1	Beta-site amyloid precursor protein
BBB	Blood brain barrier
BCSFB	Blood CSF barrier
CE	Cholesterol esters
CHO	Cholesterol
CNS	Central Nervous System
CSF	Cerebro spinal fluid
DHA	Docosahexaenoic acid
ePC	Ethylphosphatidylcholine
ePE	Ethylphosphatidylethanolamine
ePS	Ethylphosphatidylserine
FA	Fatty acid
FFA	Free fatty acid
GPLs	Glycerophospholipids
HDL	High Density Lipoproteins
LD	Lipid Droplet
LDL	Low Density Lipoproteins
LFO	Lipid Functional Ontology
LO	Lipid Ontology

LPE Lysophosphatidyletalonamine
LPS Lysohosphatidylserine
MCAO Medial cerebral occlusion artery
MUFA Monounsaturated fatty acids
NS Nervous System
PC Phosphatidylcholine
LPC Lysophosphatidylcholine
PE Phosphatidyletalonamine
PI Phosphatidylinositol
PLs Phospholipids
PS Phosphatidylserine
PUFA Polyunsaturated fatty acids
QR Chylomicrons
RNS Reactive nitrogen species
ROS Reactive oxygen species
SL Sphingolipids
SM Sphingomyelin
TAGs Triacylglycerides
VLDL Very Low-Density Lipoproteins

LISTA DE FIGURAS

Ilustración 1 Estructura representativa para cada categoría de lípidos.

Ilustración 2 Conformaciones fosfolipídicas en medios acuosos.

Ilustración 3 Geometría de lípidos en membrana.

Fig 1 Perfil de fosfolípidos en el hipocampo y suero.

Fig 2 Top 5 especies lipídicas discriminadas por PCA.

Fig 3 Cambio longitudinal de las relaciones entre las subclases de PE.

Fig 4 Cambio longitudinal de las relaciones entre las subclases de PC

Fig 5 Correlación de las clases lipídicas con el score motor.

Fig 6 Comportamientos procesos organelares asociados con los cambios fosfolipídicos.

Fig 7 Características biofísicas membranales asociadas los cambios fosfolipídicos.

Fig 8 Conversión fosfolipídica en postisquemia.

Fig 9 Genes asociados a la remodelación membranal.

Tabla Suplementaria 1 Clases y especies de fosfolípidos analizados.

Tabla Suplementaria 2 Genes asociados a la remodelación membranal.

Figura suplementaria 1 Especies lipídicas significantes postisquemia.

Figura suplementaria 2 Enriquecimiento de reacciones fosfolipídicas.

PALABRAS CLAVES

Neurodegeneración, isquemia, fosfolípidos, biomarcadores.

INTRODUCCIÓN

GENERALIDADES DE LAS MEMBRANAS LIPÍDICAS DEL SISTEMA NERVIOSO

En humanos, el cerebro es el segundo órgano del cuerpo con mayor contenido de lípidos después del tejido adiposo, pero es el principal órgano en contener mayor variación de especies lipídicas (13–15). En el tejido adiposo los lípidos más abundantes son los triglicéridos (Triacylglycerides - TAGs), estos se almacenan como reserva energética en condiciones de alta ingesta de carbohidratos o grasas; por otra parte, el cerebro tiene poca capacidad para almacenar TAGs, en cambio, es rico en lípidos estructurales como los fosfolípidos (Phospholipids - PLs), esfingolípidos (Sphingolipids - SL) y colesterol (Cholesterol - CHO) (16). La principal función de los lípidos en el cerebro es la conformación de las membranas tanto de células neurales, estructuras lipoproteicas y estructuras vesiculares, además sirven como fuente energética, participan en procesos de señalización celular y están asociados a la eliminación de desechos y agentes tóxicos (13,17,18). Los PLs son la base estructural de las membranas biológicas, los más abundantes en todos los organismos son los glicerofosfolípidos (Glycerophospholipids - GPLs) compuestos por una molécula de glicerol unida a dos ácidos grasos en las posiciones sn-1 y sn-2, y un grupo fosfato en la posición sn-3 formando el ácido fosfatídico, de este se pueden sintetizar los demás glicerofosfolípidos por medio de un enlace entre el fosfato y un grupo alcohol (19,20).

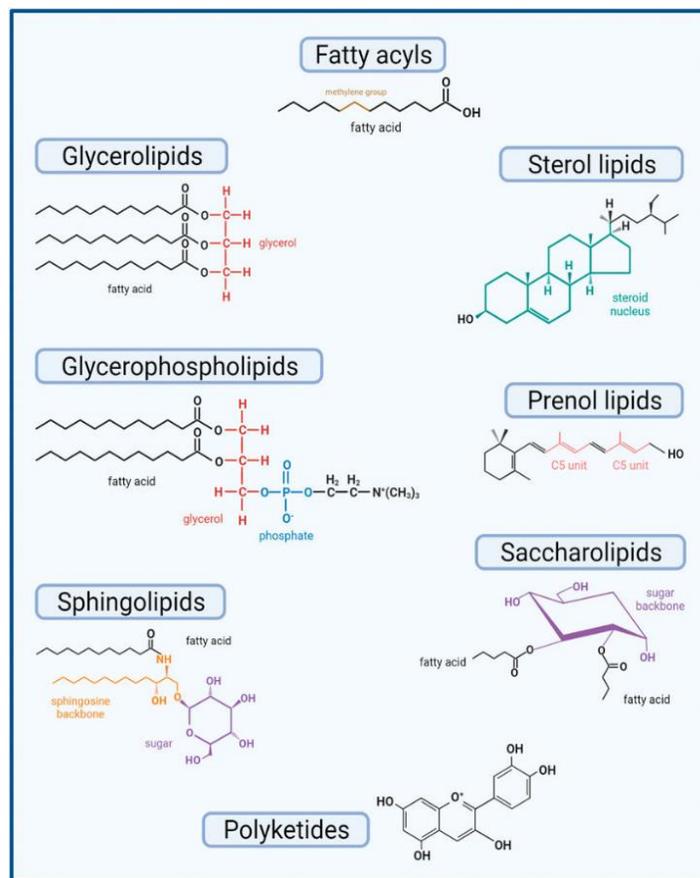


Ilustración 1. Estructura representativa para cada categoría de lípidos. El consorcio LIPID MAPS ha subdividido los lípidos en ocho categorías principales basadas en sus funciones, características químicas y especificidades. Los acilos grasos [FA] tienen una cadena alifática de grupos metileno y pueden subdividirse en saturados o insaturados. Los glicerolípidos [GL] se caracterizan por el número de grupos de glicerol. Los glicerofosfolípidos [GPL] son anfipáticos con un glicerol polar y un grupo fosfato y un hidrocarburo no polar. Los esfingolípidos [SL] tienen un esqueleto de esfingosina. Los lípidos esteroides [ST] tienen un núcleo esteroide compuesto por cuatro anillos de carbono fusionados y un grupo hidroxilo unido al primer anillo. Los lípidos de prenil [PR] se sintetizan a partir de precursores de cinco carbonos (difosfato de isopentilo y difosfato de dimetilalilo). Los sacáridolípidos [SCL] tienen ácido graso y un esqueleto de azúcar. Los poliquetidos [PK] tienen diversas formas estructurales, a menudo como moléculas cíclicas con modificaciones como grupos metilo o grupos hidroxilo.

Tomado y modificado de "LIPID MAPS Classification, Nomenclature and Shorthand Notation for MS-derived Lipid Structures" Liebisch et al 2020.

Los GLPs más abundantes en el sistema nervioso (Nervous System - NS) son: fosfatidilcolina (Phosphatidylcholine - PC), fosfatidiletanolamina (Phosphatidylethanolamine - PE), fosfatidilserina (Phosphatidylserine - PS) y fosfatidilinositol (Phosphatidylinositol - PI), de estos se pueden derivar otras subclases de GLPs como los plasmalógenos y lisofosfolípidos los cuales varían en el enlace o composición de ácido grasos asociados (21–23). Otro tipo de PLs presentes en el NS son los esfingofosfolípidos, estos se caracterizan por presentar una molécula de esfingosina como base estructural enlazada a un ácido graso, esta molécula se

puede asociar a una molécula de fosfocolina o fosfoetanolamina conformando la esfingomielina (Sphingomyelin - SM) de colina o etanolamina respectivamente (24–26). En los últimos años se ha buscado consolidar la nomenclatura lipídica ya que en el pasado se reportaban los nombres de lípidos de diferentes formas, o diferentes abreviaciones. Ahora existen consorcios como LIPIDMAPS que agrupan y establecen normas internacionales para la nomenclatura lipídica (11)

En general, los PLs de membrana se caracterizan por ser moléculas anfipáticas gracias a las colas hidrofóbicas de los ácidos grasos o de la esfingosina, y a la cabeza hidrofílica compuesta por el fosfato más los alcoholes, esta característica les permite asociarse en medios acuosos formando diversas estructuras que pueden ser de dos tipos: a) micelares, compuestas por una monocapa fosfolipídica y un centro no acuoso o apolar, y b) vesiculares, compuestas por una bicapa fosfolipídica y un centro acuoso **Ilustración 2** (27–29). Las formas vesiculares dieron paso a la vida celular otorgando integridad e individualidad a las células, también permitieron la adaptación e interacción en diferentes condiciones del medio (30–32). Otras especies lipídicas presentes en las membranas son los esteroides como el CHO, el cual se ha ido integrando a las membranas aportando adaptabilidad en procesos evolutivos (33).

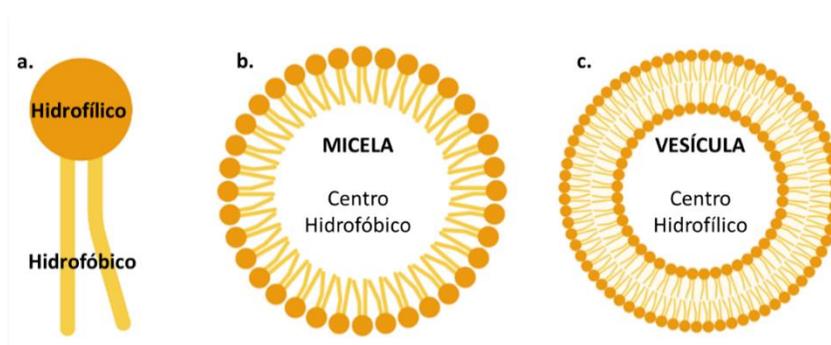


Ilustración 2. Conformaciones fosfolipídicas en medios acuosos. a) Forma general de los lípidos de membrana, presentan una cabeza polar hidrofílica y una cola apolar hidrofóbica compuesta generalmente por ácidos grasos. b) Estructura micelar, presenta una monocapa de fosfolípidos y un centro no acuoso o hidrofóbico. c) Estructura vesicular, presenta una bicapa de fosfolípidos y un centro acuoso o hidrofílico.

Las membranas de eucariotas han coevolucionado gracias a la especialización de un conjunto de proteínas capaces de interactuar, modificar y remodelar la composición de las membranas logrando un abanico de organelas, células y tejidos con funciones específicas (34,35). La

composición de lípidos determina las características biofísicas de las membranas como la fluidez, forma, difusión y carga (36–38). Las membranas se han descrito como estructuras móviles y semipermeables que mantienen gradientes iónicos entre el interior y el exterior de las células, esta fuerza iónica impulsa el movimiento de moléculas generando un potencial de membrana (30,39,40). Se sabe que ciertas propiedades como el grado de saturación de los ácidos grasos en los PLs y el nivel de colesterol anclado en la bicapa intervienen en la fluidez y rigidez membranal (13,39,41). Los ácidos grasos saturados y el colesterol aumentan la rigidez de las membranas, en cambio, los ácidos grasos insaturados y la disminución del colesterol la hacen más fluida, estas variaciones son necesarias para diversos procesos como la estabilización de proteínas, comunicación celular, movilidad, endocitosis, exocitosis, entre otros (37,42).

La disposición y distribución de los lípidos en las membranas es heterogénea, existe una asimetría constante entre las capas de la bicapa y también de manera lateral (42–46). Los lípidos tienen la capacidad de formar asociaciones dependiendo de su afinidad conocidas como dominios de membrana o balsas lipídicas, estos dominios son diversos en composición y función, y se pueden modificar según las necesidades de las células, los dominios actúan como estructuras de anclaje para un variado número de proteínas que de igual forma pueden regular la composición lipídica de la balsa (13,28,30,47–49). La composición lipídica y proteica de las balsas determina su forma la cual está asociada a su función (28,37,41,50,51). Los PLs presentan conformaciones geométricas cilíndricas o cónicas que modifican la forma de la membrana (13,37,42,51). Algunas proteínas necesitan estar asociadas a balsas para poder cumplir su actividad, ya sea enzimática o estructural (49,52). En el cerebro existe un amplio y variado grupo de células que se caracterizan por presentar membranas morfológicamente heterogéneas con altas capacidades de remodelación, además de un dinámico sistema de vesículas membranales para lo cual, es necesario mantener un constante recambio de lípidos para suplir sus necesidades funcionales (53,54).

MEMBRANAS Y TRANSMISIÓN SINÁPTICA

NEURONAS Y COMUNICACIÓN

Las neuronas son las células neurales encargadas de la recepción y transmisión de la información que coordina el funcionamiento del NS. Las células neuronales son variadas, a nivel general se componen de un soma o cuerpo neuronal, axón y dendritas. A través de regiones de comunicación conocidas como sinapsis una neurona puede transmitir información para desencadenar respuestas en otras neuronas, células motoras o células secretoras (55). El proceso sináptico emplea dos mecanismos generales que inician con la excitación de una neurona, esto desencadena un impulso nervioso que culmina con la liberación de neurotransmisores en la estructura sináptica (55,56). Las membranas neuronales son capaces de propagar información y transmitirla por medio de dinámicas iónicas/eléctricas y liberación de vesículas, para lo cual necesitan mantener una estable composición lipídica y proteica (55). Los lípidos de membrana y sus características biofísicas son esenciales para mantener el potencial de acción que permite la transmisión eléctrica generada por la excitación en las sinapsis (40,41,57). La asimetría membranal en la bicapa ha sido descrita en varios tipos celulares, las membranas plasmáticas de mamíferos mantienen casi toda la SM y PC en la monocapa externa de la membrana, en cambio, la monocapa interna consiste principalmente en PE, PS y PI (42,58). El colesterol se encuentra en ambas capas de membrana, pero se ha visto enriquecido dentro de la capa interna (51,59). Existen un conjunto de proteínas que mantienen la asimetría de la membrana y se encargan de la rotación y cambios de PLs, estas proteínas son las flipasas, flopasas y escramblasas (60,61). Los desbalances en la asimetría pueden afectar varias propiedades de la bicapa incluido el potencial de membrana, carga superficial, permeabilidad, forma y estabilidad, además de afectar la asociación de varias proteínas de membranas como receptores y canales iónicos generado disfunción en procesos celulares; en neuronas estos desbalances pueden afectar directamente la función de transmisión eléctrica (46,58,62) este proceso se ha visto alterado en procesos neurodegenerativos (60).

OLIGODENDROCITOS, AISLANTES LIPÍDICOS

A medida que el sistema nervioso ha evolucionado, algunas membranas celulares se adaptaron y especializaron para mejorar y hacer más eficiente el proceso de la transmisión eléctrica nerviosa. Los oligodendrocitos hacen parte de la glía y actúan como aislantes membranosos que rodean y forman nódulos alrededor de los axones neuronales lo que facilita el paso de los impulsos nerviosos, este recubrimiento se conoce como mielina la cual ocupa una alta proporción de lípidos (70%-85%) y baja proporción de proteínas (15%-30%) en comparación con la mayoría de las membranas biológicas que tienen una proporción aproximadamente equivalente entre proteínas y lípidos (50% lípidos / 50% de proteínas) (26,63,64). Los lípidos más abundantes de la mielina son el CHO con casi el 80% de composición seguido por la SM y otros PLs (26,63,65,66). Otras especies lipídicas presentes en la mielina son los esfingoglicolípidos, a diferencia de la SM, estos no tienen una cabeza de fosforo y alcohol, están asociadas con mono o polisacáridos, los más abundantes en el NS son los cerebrósidos y gangliósidos que participan en la estabilidad estructural de la mielina y procesos de señalización celular (13,67–69). La mielina ha sido descrita como una de las interacciones célula-célula más compleja de los organismos, además de mejorar la conducción en los axones brinda apoyo físico y trófico a las neuronas (63). Al igual que las demás membranas, la mielina también presenta diversos dominios en la bicapa que se encargan de incluir proteínas necesarias para la estabilización de la mielina e interacción con la neurona (63). La mielinización es un proceso de vital importancia para el funcionamiento del NS, la diferenciación de los oligodendrocitos y posterior mielinización se da en etapas tempranas del desarrollo y necesita una constante renovación a lo largo de la vida del adulto (26,63,70,71). La disfunción mielínica se ha visto asociada a varios procesos degenerativos como la esclerosis múltiple y otras neuropatologías (72–74). Por lo tanto, la biosíntesis, el almacenamiento y el tráfico celular de lípidos principalmente de CHO, PLs y SM son esenciales para el ensamblaje y mantenimiento de la mielina y la correcta transmisión sináptica.

EXOCITOSIS SINÁPTICA

Luego de la transmisión eléctrica por el soma y axón neuronal, las estructuras encargadas de la liberación de neurotransmisores son los procesos presinápticos (axones, dendritas, soma), estas estructuras son entidades membranales dinámicas que requieren continuos ajustes en la estructura química y forma molecular de sus constituyentes lipídicos principalmente de los PLs (9,55). En particular, las dendritas neuronales se caracterizan por su alta complejidad morfológica y capacidad de movilidad de lo cual depende su composición en lípidos y proteínas (9). Los factores que determinan la geometría de los PLs son el tamaño de la cabeza polar y la longitud y grado de saturación de los ácidos grasos asociados, dependiendo de la combinación de estos componentes los PLs pueden tener conformaciones geométricas cilíndricas, cónicas o cónicas inversas (9,58). Las diferentes combinaciones de PLs y proteínas generan curvas que diversifican la forma de las membranas (9,13,37,51). Los cambios en los atributos geométricos de los lípidos tienen consecuencias importantes en las propiedades sinápticas de las neuronas. La liberación de neurotransmisores en las sinapsis es el proceso que permite la comunicación entre una neurona presináptica y su diana, en este proceso las vesículas presinápticas se fusionan con la capa interna de la membrana de las dendritas para poder liberar su contenido de neurotransmisores en la hendidura sináptica (9). En el proceso de exocitosis de neurotransmisores hay una serie de eventos de acoplamiento donde se involucran un conjunto de proteínas, citoesqueleto y lípidos (55,75,76). Se ha postulado un proceso de dos pasos, en el primer paso la vesícula presináptica se fusiona parcialmente con la capa interna de la membrana formando el tallo, esto requiere de la participación de lípidos que generan una curvatura negativa transitoria. En el segundo paso el tallo se ensancha para generar el poro de fusión donde se mezcla el contenido acuoso de la vesícula con el exterior promoviendo la liberación para lo cual es necesario la participación de lípidos que generan una curvatura positiva **Ilustración 2** (9,55). Todo esto está orquestado por un conjunto de proteínas que se encargan de la movilización y modificación de los lípidos, aunque se desconoce gran parte de los actores involucrados, se da un papel importante a la composición de lípidos y remodelación en las membranas sinápticas para el correcto funcionamiento de este proceso.

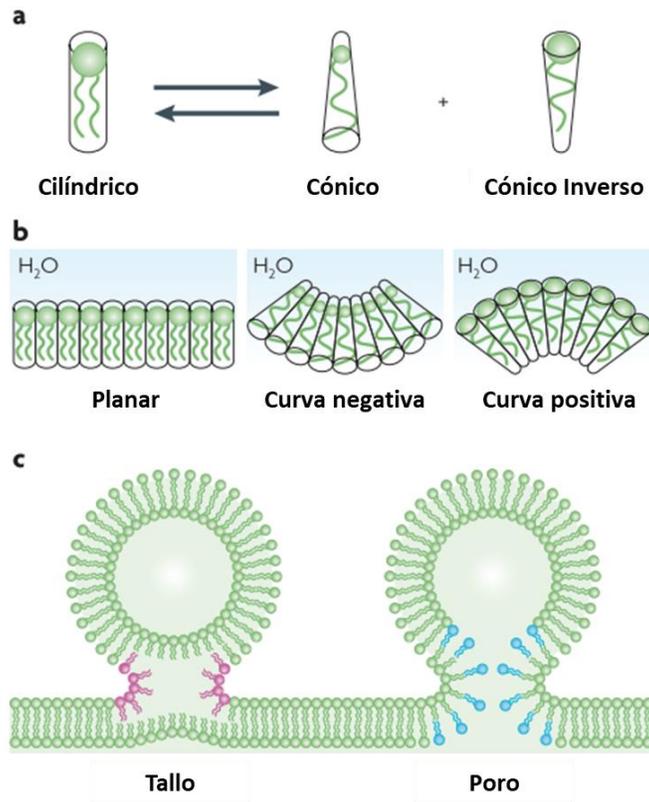


Ilustración 3. Geometría de lípidos en membrana. a) Formas geométricas de los fosfolípidos. b) Curvaturas de membrana. c) Pasos y participación de lípidos en el proceso de endocitosis en sinapsis.

Tomado y modificado de "A neuroscientist's guide to lipidomics, Piomelli et al 2007".

La mayoría de las sinapsis están asistidas por astrocitos con los cuales se conforman las sinapsis tripartitas, los astrocitos intervienen en la formación y maduración aportando factores neurotróficos y lípidos como colesterol y PLs, también se encargan de la recaptación de neurotransmisores para evitar la sobre estimulación y excitotoxicidad (77,78). Los procesos sinápticos permanecen en constante remodelación, las células de la microglía se encargan de realizar el proceso de poda sináptica lo que estimula y mantiene la plasticidad sináptica (72,79).

MICROGLÍA, MOVILIDAD Y FAGOCITOSIS

La microglía es otra población residente del sistema nervioso central (Central Nervous System - CNS), a diferencia de las neuronas, astrocitos y oligodendrocitos que tienen un precursor celular común, la microglía se origina de macrófagos progenitores que migran al cerebro en las primeras etapas de desarrollo (72). Las funciones de la microglía se perfilan hacia la inmunidad innata y adaptativa del CNS y la eliminación de desechos y agentes infecciosos por fagocitosis. También, se encargan de mediar la poda sináptica regulando la sinaptogénesis, neurogénesis y reparación del tejido (14,72). Al igual que los demás tipos celulares, la microglía debe mantener un perfil lipídico estable para cumplir con sus funciones. Las membranas microgliales deben conservar una fluidez constante que permita generar procesos móviles para censar y fagocitar elementos potencialmente peligrosos para el tejido (72). De hecho, la microglía en reposo es muy móvil y activa, se encarga de realizar la poda sináptica para la remodelación y mantener la plasticidad sináptica fagocitando pequeñas porciones de las membranas sinápticas (72,79,80). Para estas milimétricas podas, la microglía necesita adecuar pequeñas porciones de las membranas de sus procesos para realizar los pequeños cortes, se han identificado mecanismos como la endocitosis mediada por clatrin, las cuales necesitan conformaciones en balsa para su estabilidad y función, de igual forma la curvatura de la membrana toma relevancia en esta función (72). La microglía se ha involucrado en la eliminación de desechos mielínicos y procesos de remielinización (79,81). En algunos estudios se ha logrado identificar la capacidad de remodelamiento morfológico que presenta la microglía, en estados normales estas presentan una morfología con un soma pequeño y procesos ramificados, en estados activos cambian rápidamente a formas más ameboides y redondeadas (82).

En estudios *in vitro* los primeros cambios se registraron entre las primeras 3 horas de estimulación hasta una transformación completa a las 24 horas, lo cual fue revertido por el cambio del medio a uno sin estimulación (82). La microglía en estado ameboide es altamente móvil y responde eficazmente a lesiones y/o infecciones migrando y acumulándose por mecanismos de quimiotaxis (80). Algunas poblaciones astrocitarias también tienen este tipo de funciones, en lesiones traumáticas o isquémicas focales los astrocitos junto con la

microglía pueden migrar y acumularse para formar la cicatriz glial; además existen poblaciones astrocíticas que tienen la capacidad de migrar y diferenciarse en neuronas para reemplazar la pérdida de células neuronales (77,83). La disfunción microglial y su sobreactuación se ha visto implicadas en varias enfermedades neurodegenerativas (84). Además, los lípidos cumplen un rol muy importante en la respuesta inflamatoria glial, algunos ácidos grasos como los ácidos palmítico y esteárico inducen un fenotipo proinflamatorio por medio del receptor tipo Toll 4 y las vías de señalización de NF-κB. Por el contrario, el ácido oleico y el ácido linoleico pueden estimular fenotipos antiinflamatorios (72,85). En eventos neuropatológicos la microglía reactiva puede acumular lípidos donde se han identificado reservas de ácido araquidónico el cual es un precursor de metabolitos proinflamatorios (86). En macrófagos periféricos se sabe la síntesis de FAs es indispensable para la remodelación de la membrana, movilidad, migración, diapédesis, fagocitosis y la síntesis de factores inflamatorios (87). Aunque los macrófagos y la microglía comparten similitudes metabólicas, aún no se ha descrito la capacidad liposintética de la microglía *in vivo*, pues al estar en el tejido cerebral puede verse modificada por la comunicación lipídica con las demás poblaciones neurales especialmente con los astrocitos (14,88). Hace falta aumentar los estudios para identificar toda la dinámica membranal y de señalización que aporta funcionalidad a la microglía en procesos de transformación, movilidad, migración, fagocitosis y respuesta inflamatoria.

ASTROCITOS, SÍNTESIS Y TRANSPORTE LIPÍDICO

Los astrocitos son células neurales que cada vez toman un papel muy importancia en el desarrollo y función del cerebro. Las primeras descripciones las clasificaban como simples células de sostén que solo aportaban una matriz estructural para el establecimiento de las neuronas (89,90). Hoy en día se sabe que cumplen un rol importante en muchas funciones celulares para mantener la homeostasis cerebral y los procesos sinápticos (90–92). Los astrocitos hacen parte de la unidad neurovascular, por medio de pies astrocitarios son capaces de recubrir y tener contacto con las células de la vasculatura ayudando a generar la barrera hematoencefálica (93–95). El cerebro carece de grandes reservas energéticas y por lo tanto necesita un constante suministro de nutrientes provenientes del sistema, aun así es uno de los

órganos que más gasto energético y de oxígeno demanda, el principal sustrato energético del cerebro es la glucosa (96–99). Se ha podido evidenciar que los astrocitos tienen la capacidad de almacenar energía en forma de glucógeno y lipid droplets (LP), estas pequeñas reservas actúan como amortiguadores en periodos donde el suministro energético se ve comprometido (14,100). Por medio de la liberación de moléculas, los astrocitos pueden modular mecanismos de vasodinamia en respuesta a la función neuronal, tienen la capacidad de absorber glucosa, agua y oxígeno de la sangre y participan en mecanismos de eliminación de desechos (97,101–104). La mayor demanda energética del cerebro se da a nivel neuronal relacionado con la actividad de la bomba de sodio que es responsable del mantenimiento del potencial de membrana (96,98,105).

Los astrocitos son células metabólicamente activas, se ha descrito una función de apoyo energético entre astrocitos y neuronas donde ellos facilitan procesos de glucólisis para producir lactato, el cual es distribuido a las neuronas para abastecer su alta demanda energética (89,103,106). La glucosa también es la fuente principal para la síntesis de ácidos grasos y demás lípidos del cerebro (25,88). En varios estudios se ha demostrado que los astrocitos son células con un metabolismo lipídico muy activo, expresan en gran medida una variedad de proteínas encargadas de la síntesis lipídica (65,88,107,108). Varios estudios han descrito que algunos lípidos sintetizados por los astrocitos como el ácido oleico están involucrados en procesos de neurogénicos, neurotróficos y sinaptogénicos (109–111). También se ha evidenciado que a pesar de que las células tienen la capacidad de producción de CHO, en el cerebro los astrocitos y los oligodendrocitos son más activos. Los astrocitos son células responsables de la producción de varios lípidos los cuales distribuyen por mecanismos mediados por lipoproteínas (65,74,108,112).

LIPOPROTEÍNAS NEURALES

Las lipoproteínas son partículas micelares compuestas por una monocapa de fosfolípidos, proteínas y un núcleo apolar hidrofílico cargado por TAG y/o ésteres de colesterol (Cholesterol esters – CE) (113,114). A nivel sistémico las lipoproteínas han sido ampliamente estudiadas y clasificadas de acuerdo a su tamaño, densidad, composición lipídica y proteica (113). Las lipoproteínas más grandes de baja densidad se clasifican en

quilomicrones (Chylomicrons - QR) y proteínas de muy baja densidad (Very Low Density Lipoproteins - VLDL) y lipoproteínas de baja densidad (Low Density Lipoproteins - LDL), estas están encargadas del transporte de TAG absorbidos en el intestino o los sintetizados *de novo* en el hígado hasta los demás órganos donde son usados en el gasto energético o son almacenados en el tejido adiposo (113). Las lipoproteínas más pequeñas y de alta densidad clasificadas como (High Density Lipoproteins - HDL) se encargan del transporte de PLs y el transporte inverso del colesterol desde los tejidos hasta el hígado para su eliminación (113,115). Las proteínas encargadas de las funciones biológicas de las lipoproteínas son las alipoproteínas, estas se encargan de dar forma, mantener la estructura y además actúan como ligandos de receptores involucradas en el intercambio y metabolismo lipídico (18,113). Las lipoproteínas por lo general contienen más de una alipoproteína, existen algunas como la APO B-48 y APO B-100 que son características de QR, VLDL y LDL, en cambio las HDL carecen de estas y comparten algunas como la APO C, APOA-1 y APOE siendo la más común la APOE (113). En la periferia la alipoproteína APOE es sintetizada y secretada por hepatocitos, macrófagos, células renales y adipocitos (114,116,117). La síntesis y conformación de las lipoproteínas en el sistema se asocia principalmente a una respuesta ante la dieta, se sabe que dietas ricas en carbohidratos o grasas inducen la respuesta de un grupo de proteínas encargadas de la producción de lípidos para el transporte de los mismos por el plasma (113,115,118). La disfunción de lipoproteínas sistémicas se ha visto asociada a varias enfermedades como la obesidad, aterosclerosis, hígado graso, diabetes, entre otros (118,119).

El cerebro mantiene un sistema de lipoproteínas parcialmente aislado del plasmático gracias a la barrera hematoencefálica (Blood brain barrier - BBB), este cumple funciones similares en el transporte de lípidos entre las células neurales y también se ha asociado a mecanismos antioxidantes y de eliminación de toxinas (18). Las lipoproteínas cerebrales se parecen y comparten características con las HDL plasmáticas, la alipoproteína APOE es la más abundante en el cerebro acompaña en menor cantidad de las APOA-I, APOA-II, APOA-IV, APOJ, APOD y APOH (18). Algunos experimentos de trasplante de hígado en humanos han demostrado que la variante alélica de APOE en el plasma se convierte en la del donante, mientras que la APOE en el líquido cefalorraquídeo conserva la identidad alélica del receptor, lo que ilustra que los grupos de APOE del CNS y de la periferia se sintetizan de forma

independiente, esto se corroboró al inyectar partículas APOE radiomarcadas en plasma estas tenían poco flujo al cerebro (120). En el cerebro, los astrocitos son los principales productores de APOE lo que se suma a su importancia en el metabolismo lipídico cerebral. Otras células como los pericitos, oligodendrocitos, plexo coroideo, microglía y neuronas pueden sintetizarlos pero en menor medida y dependiendo de las condiciones (114,116).

LÍPIDOS Y NEURODEGENERACIÓN

Los lípidos están cada vez más implicados en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson y esclerosis múltiple. Estudios genéticos han identificado numerosos genes relacionados con el metabolismo lipídico que están asociados con estas enfermedades (121,122). Además, varias enfermedades sistémicas relacionadas con lípidos como la obesidad, aterosclerosis, dislipidemias son catalogadas como factores de riesgo para la salud cerebral (123). El metabolismo de los lípidos es de vital importancia en todos los procesos cerebrales, cualquier irrupción podría empezar a generar membranas celulares aberrantes que generan disfunción de la homeostasis. Cada vez, los lípidos ganan más fuerza en varios aspectos del desarrollo, progresión y afectación de enfermedades neurodegenerativas.

ISQUEMIA CEREBRAL

Un evento isquémico cerebral es un episodio patológico donde el flujo sanguíneo arterial se ve disminuido de forma total o parcial por obstrucciones embólicas, trombóticas o alteraciones en la estructura vascular que irriga el cerebro, dependiendo del nivel arterial obstruido se pueden afectar diferentes zonas del cerebro generando: (a) isquemias focales de tamaños variados donde se puede identificar un núcleo isquémico (zona más afectada) y penumbra isquémica (zona alrededor del núcleo isquémico con menos daño) o (b) isquemias globales donde se ve comprometido un hemisferio o el cerebro en su totalidad (124,125). Inicialmente, la disminución en el flujo sanguíneo conlleva a diversos trastornos neurológicos ocasionando discapacidades o dando inicio a procesos neurodegenerativos que con el tiempo pueden desembocar en algún tipo de demencia (126,127). El cerebro es un

órgano con alta demanda energética, consume alrededor del 20% de oxígeno y glucosa que ingresa al cuerpo, a diferencia de otros órganos no tiene la capacidad de almacenamiento por lo que es altamente susceptible a eventos de hipoxia e hipoglucemia (127,128). En los modelos animales para isquemia se induce una disminución transitoria o permanente del flujo sanguíneo, esto simula las oclusiones que se presentan en humanos de una o más arterias cerebrales (124,129). Dependiendo de las características del evento isquémico como duración del tiempo de oclusión/reperfusión y área del infarto, esta patología puede tener varias manifestaciones como deterioros cognitivos y motores asociados con reactividad glial, inflamación, pérdida de la función neuronal y posterior muerte celular (128,130).

El modelo animal para isquemia global tMCAO se produce mediante la oclusión de la arteria cerebral media y posterior reperfusión, esto es combinado con hipotensión sistémica (50 mmHg) suficientes para inducir la isquemia cerebral afectando áreas extensas del cerebro (8). El modelo tMCAO de ratas isquémicas tiene una reproducibilidad de daño histopatológico superior al 90% y ha sido un modelo adecuado para estudios moleculares, bioquímicos y fisiológicos, así como para la evaluación de procedimientos y agentes para la recuperación neuronal (8,131). El primer evento patológico al que se ven sometidas las células neurales es la privación del suministro sanguíneo el cual provee moléculas vitales como oxígeno molecular, glucosa, agua, entre otros; este cierre en el flujo sanguíneo también conlleva al no aclaramiento o depuración de moléculas de desecho generadas por la actividad normal del cerebro provocando citotoxicidad y aumento de radicales libres (127,128,130). La evidencia recopilada de estudios en animales y observaciones realizadas en material humano indican que las neuronas en las áreas vulnerables no mueren durante un breve período de isquemia sino unos pocos días después de la reperfusión (132). Independiente de los modelos o zonas afectadas, se ha descrito que se generan puntos de daño donde se da una muerte celular principalmente necrótica generando un núcleo de daño irreversible, alrededor se empieza a generar un sector de penumbra que empieza a reaccionar posterior a la injuria. Esta área de penumbra comienza a recibir señales de núcleo además que pierde de acople celular con sus células vecinas. Con el tiempo se empiezan a generar muerte mediada por apoptosis u otras muertes controladas y también se comienzan a generar mecanismos pro resolución de daño. Esta área es de bastante interés ya que se convierte en un foco de tejido que puede ser rescatado para prevenir el aumento del daño (133,134).

ISQUEMIA Y PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

A nivel celular, después del evento isquémico se genera un conjunto de reacciones y procesos celulares que van cambiando con el tiempo, a esto se le conoce como la “cascada postisquémica” (133,134). En los primeros segundos y minutos, las neuronas privadas de energía pierden la capacidad de mantener los gradientes de iones transmembranales para su función y homeostasis, este evento conduce a la despolarización excesiva y liberación neurotransmisores causando citotoxicidad; las células gliales (astrocitos y microglía) se activan e inducen una respuesta inflamatoria por medio de la liberación de moléculas proinflamatorias (127,128). Por lo general, los procedimientos médicos para eventos isquémicos buscan recobrar la perfusión sanguínea que se perdió por la oclusión en un espacio temporal corto; sin embargo, después de la reperfusión, la reoxigenación en el tejido puede causar lesiones secundarias debido a un aumento drástico de especies reactivas de oxígeno (Reactive oxygen species - ROS) y de nitrógeno (Reactive nitrogen species - RNS)(126,128). Los radicales libres como las especies ROS son necesarias para que ocurran varios procesos fisiológicos; no obstante, un aumento excesivo puede tomar un rol patogénico (97). Junto con la reperfusión, la llegada de células inmunitarias infiltrantes incrementa la liberación de mediadores proinflamatorios al parénquima cerebral que reclutan aún más células inmunitarias y gliales en busca de la restauración del tejido; sin embargo, se ha descrito que la inflamación crónica o sostenida y la liberación de citoquinas proinflamatorias puede exacerbar los daños iniciales y aumentar la producción ROS/RNS y la consiguiente muerte celular (126).

La liberación excesiva de radicales libres derivados de oxígeno es un proceso sostenido en eventos isquémicos que afecta principalmente la estructura lipídica de las membranas celulares. Los fosfolípidos de membrana de las células neurales son altamente susceptibles al deterioro causado por ROS debido a que: (a) los UFAs (MUFAs y PUFAs) contienen dobles enlaces entre los cuales se encuentran los grupos metileno **-CH₂-** que poseen hidrógenos particularmente reactivos y (b) la formación de edemas brinda un ambiente acuoso donde el oxígeno tiene alta solubilidad y acceso a las membranas (135). Las ROS peroxidan los lípidos de membrana generando reacciones en cadena de lípidos radicales, estos forman acumulaciones intracelulares y lipotoxicidad induciendo disfunciones

mitocondriales y aumentando el riesgo de muerte celular; en respuesta, las células activan vías de recuperación celular en búsqueda de la degradación de estas lipotoxinas por medio la acumulación en lipid droplets (LD), liberación de agentes antioxidantes, actividad autofágica-lisosomal y gasto energético por beta-oxidación en las mitocondrias (136). La pérdida de la homeostasis lipídica se ha asociado a cambios en la integridad membranal y disfunciones en sus características biofísicas después de eventos isquémicos/reperfusión, donde sería necesario la activación de vías de recambios y lipogénicas para generar un reposición de los lípidos dañados en el evento patológico (137). También, la actividad lipotóxica puede aumentar la actividad de fosfolipasas las cuales hidrolizan enlaces ester en las posiciones 1 o 2 de GPLs en búsqueda de la eliminación de FAs peroxidados (128).

Cabe resaltar que aparte de los daños propios generados por la hipoxia/reperfusión, se ha descrito que los eventos isquémicos son un factor de riesgo significativo para el desarrollo de enfermedades neurológicas como la AD, el vínculo molecular entre la isquemia y el procesamiento de proteínas precursoras de amiloide se ha establecido en los últimos años (138,139). Específicamente, la hipoxia aumenta la transcripción del gen de la enzima de escisión la proteína precursora amiloide (APP - Amyloid Precursor Protein) en el sitio beta (BACE1 - Beta-site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1), lo que resulta en un aumento de la actividad de la secretasa BACE1 y la producción de beta-amiloide. En ratas sometidas a isquemia cerebral, se encontró que la hipoxia regula al alza la expresión de BACE1 dependiente producción de ROS mediadas por la interrupción repentina de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (138). El aumento de ROS generado en el evento isquémico es altamente perjudicial generando daños directos e indirectos en el parénquima cerebral.

LÍPIDOS PLASMÁTICOS COMO BIOMARCADORES DEL ESTADO CEREBRAL

Los lípidos están emergiendo como biomarcadores prometedores para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del tratamiento de enfermedades neurodegenerativas. La desregulación del metabolismo lipídico en el cerebro es un factor de riesgo significativo para estos trastornos. Varias clases de lípidos, como los fosfolípidos aniónicos bis (monoacilglicerol) fosfato (BMP) y los (glico) esfingolípidos, han mostrado gran potencial

como biomarcadores (140,141). El colesterol, especialmente lo asociado con el alelo ApoE4, ha mostrado cambios importantes en la composición plasmática (142). Además, un conjunto de biomarcadores sanguíneos, incluidos productos de peroxidación lipídica, puede facilitar el diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas. La composición lipídica tiene amplios efectos celulares, influyendo en la progresión de la enfermedad mediante el tráfico vesicular, la autofagia, la biogénesis de exosomas, la señalización celular y la supervivencia. Las alteraciones en el metabolismo lipídico pueden revelar objetivos farmacológicos e identificar biomarcadores de progresión de la enfermedad (143).

A pesar de los desafíos en el desarrollo de biomarcadores lipídicos, como la necesidad de métodos analíticos estandarizados, estudios de validación a gran escala y la demostración de su utilidad clínica, los lípidos séricos se perfilan como herramientas pronósticas diagnósticas, accesibles y no invasivas que podrían mejorar el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. En general, se desconocen los roles precisos que juegan los lípidos en el inicio y progresión de estas enfermedades. Identificar y comprender los cambios en los perfiles lipídicos asociados con enfermedades neurológicas, así como su relación con otros eventos celulares y moleculares, puede ayudar a dilucidar la importancia de estas moléculas en la identificación temprana de marcadores neuropatológicos y en el desarrollo de posibles tratamientos. Por ello, el principal objetivo de este estudio es comparar los cambios en los perfiles fosfolipídicos del hipocampo y el suero sanguíneo durante las fases temprana, media y tardía en un evento postisquemia.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el perfil y la composición de fosfolípidos en el hipocampo y el plasma en fases tempranas y de progresión en un modelo animal de neurodegeneración aguda por isquemia focal.

Objetivos específicos

- Cuantificar los fosfolípidos en diferentes momentos postisquemia (6h, 24h, 7d, 15d, 1m y 4m) en el hipocampo y el plasma mediante espectrometría de masas.
- Identificar procesos fisiológicos clave en los cambios fosfolipídicos y analizar su comportamiento postisquemia mediante análisis bioinformáticos con el uso herramientas web para bases de datos de lipidómica.

METODOLOGÍA

Procedimientos con animales:

Todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con los lineamientos ARRIVE, la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, 8va edición publicada por los Institutos Nacionales de Salud (NIH) y las normas colombianas (ley 84/1989 y resolución 8430/1993). Estos procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Ratas albinas Wistar macho de nuestro laboratorio libre de patógenos. La colonia libre en el vivero del SIU (Sede de Investigación Universitaria), Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, se mantuvo en un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 h y recibió alimento y agua ad libitum. Se tuvo especial cuidado en minimizar el sufrimiento de los animales y reducir el número de animales utilizados (6). Se utilizaron ratas de tres meses de edad que pesaban entre 400 y 450 g. Las ratas se dividieron aleatoriamente en dos grupos: el grupo de control y el grupo isquémico. Se utilizaron cinco [5] ratas por grupo experimental para la evaluación del comportamiento y lipídica

Modelo de oclusión tMCAO:

Los animales fueron anestesiados con ketamina (60 mg/kg) y xilazina (5 mg/kg) y recibieron una mezcla de 2 a 4 % de isoflurano y 96 % de oxígeno a través de una máquina de anestesia por inhalación. Se aisló la arteria carótida común derecha y se insertó un nylon quirúrgico de 0.26 mm de diámetro a lo largo de las arterias carótidas comunes derechas hacia la arteria carótida interna hasta bloquear el origen de la arteria cerebral media. La profundidad de penetración fue de aproximadamente 18 mm. Se suturó la incisión según el protocolo experimental de nuestro laboratorio (125), las ratas fueron sometidas a isquemia focal durante 1 hora y el nylon fué retirados después de 1 hora de oclusión. En el grupo control (sham), se aisló la arteria carótida derecha sin ocluir las arterias carótidas comunes. La cirugía se realizó

a $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Se utilizó una puntuación neurológica para evaluar el éxito del modelo. Después de obtener la puntuación neurológica, las ratas que calificaron continuaron la experimentación y fueron sacrificadas a 6 horas, 24 horas, 15 días, 1 mes y 4 meses. La sangre fue recolectada por punción cardiaca en tubos sin anticoagulante, luego se centrifugó por 5 min a 3600 rpm para la separación del suero el cual se almaceno a -80°C . Los hipocampos fueron aislados y congelados en hielo seco, luego se almacenaron a -80°C hasta su uso posterior.

Evaluación neurológica:

El desempeño neurológico se evaluó a las 6 horas, 24 horas, 15 días, 1 mes y 4 meses antes del sacrificio. La función neurológica se calificó por medio de la prueba de 18 puntos basada en la prueba de García (144). El neuroscore combinó seis pruebas neurológicas diferentes: (1) actividad espontánea, (2) simetría en el movimiento de las extremidades, (3) extensión de la pata delantera, (4) escalada, (5) propiocepción corporal y (6) respuesta al tacto de las vibrisas. Cada prueba realizada recibió una puntuación máxima de tres puntos basada en un conjunto de criterios predeterminados descritos por García y colaboradores. Las puntuaciones de cada prueba se sumaron donde la puntuación más alta posible era de 18 puntos que indica que no hay déficits neurológicos y una puntuación más baja de 3 puntos para los animales con las deficiencias más graves. La puntuación neurológica se realizó cada día y en el mismo orden y hora para todas las ratas.

Ensayo de plano inclinado:

La capacidad del animal para mantener la estabilidad postural se evaluó mediante la prueba del plano inclinado. El ángulo relativo en el que la rata ya no podía mantener su posición durante 10 segundos se registró como ángulo final y se consideró una medida de deterioro funcional (7)

Análisis de lípidos:

Los lípidos totales se extrajeron del hipocampo y del suero utilizando la técnica de Folch (145) con una mezcla de 2mL de cloroformo (CHCl₃) y 1mL de metanol (MeOH) en una relación 2:1 (v/v). Luego, se añadió 0,005% de hidroxitolueno butilado (BHT) y esta mezcla se usó para homogeneizar el hipocampo. Posteriormente se añadió 1 ml de NaCl al 0,9% y la mezcla se centrifugó a 3000 rpm durante 3 min. La capa orgánica (capa inferior) se separó y se transfirió a un nuevo tubo de vidrio. Los disolventes fueron evaporados y se liofilizó el extracto para eliminar el exceso de humedad. Finalmente, la composición lipídica se analizó mediante espectrometría de masas.

Espectrometría de masas:

Se utilizó un enfoque ESI-MS/MS automatizado y la adquisición de datos. La ubicación y el análisis se realizaron en el **Kansas Lipidomics Research Center** utilizando un sistema de detección API 4000 TM y Q-TRAP (4000Qtrap), como se describió anteriormente (6,146). Este protocolo permitió la detección y cuantificación de bajas concentraciones de compuestos lipídicos polares. Las moléculas se determinaron con base en sus relaciones masa/carga, las cuales se compararon con el respectivo estándar interno para determinar qué especies de lípidos estaban presentes en el extracto evaluado: 0,30 nmol de lysoPG 14:0, 0,30 nmol de lysoPG 18:0, 0,30 nmol de di 14:0 PG, 0,30 nmol de 14:0 lysoPE, 0,30 nmol de 18:0 lysoPE, 0,60 nmol de 13:0 lysoPC, 0,60 nmol de 19:0 lysoPC, 0,60 nmol de di 12:0-PC, 0,60 nmol de di 24:1-PC, 0,30 nmol de 14:0 lysoPA, 0,30 nmol de 18:0 lysoPA, 0,30 nmol de di 14:0 PA, 0,30 nmol de di 20:0 (fitanoil) PA, 0,20 nmol de di 14:0 PS, 0,20 nmol de di Phy PS, 0,28 nmol de 16:0e18:0 PI y 0,10 nmol de di 18:0PI. El sistema detectó un total de 13 clases de fosfolípidos y sus respectivas subespecies, que fueron identificadas por el número de carbonos y el grado de insaturación de la cadena. Las concentraciones de lípidos se normalizaron a la concentración molar en todas las especies de cada muestra y los datos finales se presentan como % mol medio.

Análisis estadístico:

Los análisis estadísticos de las especies fosfolipídicas se realizaron por medio de la plataforma web LipidSig (10). Para la preparación de las bases de datos se eliminaron especies lipídicas que tenían más de 80% de información faltante. Los demás datos fueron imputados tomando en cuenta la mínima de cada grupo. Las comparaciones entre grupos se realizaron por medio de test t-student para datos paramétricos o test de Wilcoxon para no paramétricas. Los análisis multivariados se realizaron por *Principal Components Analysis (PCA)*. Los análisis para los ratios, el score neurológico y correlación se realizaron en la aplicación GraphPad Prism 8, se usó la prueba t-student o Wilcoxon dependiendo de la normalidad de los datos y la prueba de Pearson para la correlación del score neurológico con las clases lipídicas. Los valores se expresan como medias \pm SD. Los resultados se consideraron significativos en $p < 0,05$.

Análisis bioinformáticos:

Los análisis de enriquecimiento ontológicos se realizaron por medio de LIONWeb (147). El análisis ontológico implica la organización y clasificación de información sobre un dominio específico, como los lípidos, definiendo relaciones entre conceptos para una comprensión más profunda de los datos. En LIONWeb, utiliza ontologías establecidas como la Ontología de Lípidos (Lipid Ontology - LO) y la Ontología de Funciones de Lípidos (Lipid Function Ontology - LFO) para mapear los lípidos identificados en las muestras a sus clases y atributos correspondientes.

Los análisis para la identificación de reacciones lipídicas se realizó por medio de BioPAN (148). BioPAN, del consorcio LIPID MAPS, es una herramienta bioinformática web gratuita que permite a los investigadores analizar conjuntos de datos de lipidómica de mamíferos, centrándose en el análisis de rutas metabólicas para explorar cambios en los lípidos desde la clase hasta las especies moleculares individuales. Utiliza un algoritmo avanzado para identificar las rutas metabólicas relevantes, considerando la abundancia de cada especie

lipídica, sus relaciones bioquímicas y como cambia con respecto a un control. BioPAN genera visualizaciones interactivas de las rutas alteradas y estima la actividad enzimática, ayudando a entender los mecanismos moleculares subyacentes. En BioPAN, el z-Score se utiliza como una medida estadística para evaluar la significancia de los cambios en los niveles de lípidos entre diferentes grupos de muestras. El z-Score, o desviación estándar normalizada, indica cuántas desviaciones estándar un valor se encuentra por encima o por debajo de la media. BioPAN calcula el z-Score para cada especie lipídica individual comparando su abundancia relativa entre un grupo de muestras y un grupo de referencia. El proceso incluye calcular la media y la desviación estándar de las abundancias relativas, normalizar estas abundancias restando la media y dividiendo por la desviación estándar. Un z-Score alto indica una diferencia significativa en la abundancia relativa de la especie lipídica, ya sea un aumento (positivo) o una disminución (negativo), mientras que un z-Score bajo sugiere que no hay una diferencia significativa. BioPAN utiliza el z-Score para identificar lípidos diferencialmente abundantes, priorizar candidatos para análisis posteriores y visualizar cambios en los niveles de lípidos, facilitando la identificación de posibles biomarcadores y la comprensión de sus roles biológicos, además de las enzimas/genes asociados a estos cambios.

Los análisis de clúster y asociación entre genes se llevaron a cabo en STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) (149) es una base de datos y plataforma analítica diseñada para explorar asociaciones funcionales entre proteínas construyendo una red de interacciones a partir de varias fuentes de datos y asignando puntuaciones de confianza a estas interacciones. Integra datos experimentales, predicciones computacionales y conocimientos de la literatura para evaluar la confianza de cada interacción, con puntuaciones más cercanas a 1 que indican alta confianza. STRING visualiza estas interacciones como redes donde los genes/proteínas son nodos y las interacciones son aristas, cuyas características reflejan las puntuaciones de confianza para la generación de clúster de agrupación.

RESULTADOS

1. Diferencias en el perfil de fosfolípidos entre el hipocampo y el suero sanguíneo.

Se llevó a cabo un análisis lipidómico en muestras de hipocampo y suero utilizando espectrometría de masas dirigida a 13 clases de fosfolípidos divididos en 299 especies (Tabla suplementaria 1). Las muestras fueron obtenidas en diferentes tiempos postisquemia (6 horas, 24 horas, 7 días, 15 días, 1 mes y 4 meses) en el modelo experimental de isquemia cerebral tMCAO. El análisis proporcionó información detallada sobre las alteraciones fosfolipídicas asociadas con la isquemia cerebral tanto en el hipocampo como en el suero. Estos hallazgos no solo mejoran nuestra comprensión de la dinámica temporal del daño neurológico postisquémico, sino que también remarcan la relevancia de explorar los cambios lipídicos como posibles indicadores o contribuyentes de las secuelas a largo plazo de la isquemia cerebral y procesos de neurodegeneración asociados a la misma.

De forma general se observa una marcada diferencia entre los perfiles fosfolipídicos del hipocampo y el suero. En el hipocampo (Figura 1a), los fosfolípidos más abundantes en promedio son PC (49.15% mol) y PE (23.12% mol), seguidos de PS (8.87% mol) y SM (7.64% mol), mientras que PI (2.87% mol), ePC (2.85% mol), LPE (1.4% mol), PA (0.68% mol), LPC (0.6% mol), PG (0.09% mol), ePS (0.02% mol) y CerPE (0.003% mol) se presentan en cantidades menores. Por otro lado, en el suero (Figura 1b) las clases más abundantes en promedio son PC (59.69% mol), LPC (23.7% mol), SM (10.56% mol), seguidas de ePC (3.69% mol), PI (1.74% mol), PE (0.41% mol), y en menor abundancia PS (0.02% mol), LPE (0.09% mol), ePE (0.07% mol), PA (0.01% mol), PG (0.01% mol), ePS (0.00015% mol) y CerPE (0.0002% mol).

2. El hipocampo presenta variación fosfolipídica con dinámicas interclases y significativa participación de plasminógenos en postisquemia.

Los datos de hipocampo muestran un dinamismo entre aumentos y disminuciones de las diferentes clases de fosfolípidos y variaciones en sus ácidos grasos tiempo a tiempo, además, se remarca una participación de plasminógenos derivados de PE y PC como componentes dinámicos de los eventos cerebrales postisquemia. Pasadas las 6 horas, el hipocampo (Figura 1c - 6 hours) presentó un aumento en las clases lipídicas ePE (2.635 %mol a 2.904 %mol $p = 0.04^*$) y PE (20.069 %mol a 22.651 %mol $p = 0.02^*$). Los principales cambios en estas clases se dieron en especies ricas en ácidos grasos de cadena larga entre 38 y 44 carbonos con predominancia de poliinsaturaciones (Figura S1a), también se identificaron aumentos en otras especies como PC (44:1)(44:8)(40:5), ePC (40:6) y PS (44:11)(40:3). Al mismo tiempo, algunas especies fosfolipídicas presentaron disminuciones como PC y ePC principalmente esterificados con ácidos grasos de cadena corta y saturados, también disminuciones en PA (40:7)(38:6), PG (36:2)(34:4), PI (40:5)(40:2), LPC (20:0) y SM (18:0) (Figura S1a). Dentro de las 24 horas postisquemia no se registraron cambios significativos a nivel de clases fosfolipídicas (Figura 1c - 24 hours), pero sí variaciones en algunas especies. Cabe resaltar que a 24 horas los cambios fosfolipídicos en el hipocampo no logran discriminar del todo entre grupos, algunos animales control (Sham) presentan similitudes con los isquémicos (Figura S1c). Dentro de las especies que presentaron variación a 24 horas postisquemia se encuentran aumentos en PS (34:0), PC (44:12)(44:8)(42:8), ePC (38:5) y LPC (16:0), además de disminuciones en PS (44:9)(38:3), PC (38:0)(30:0), ePC (32:1), PG (34:4) y PA (36:3).

En la primera semana postisquemia (Figura 1c - 7 days), el hipocampo presentó aumentos significativos en clases lipídicas como PA (0.617 %mol a 0.826 %mol $p = 0.04^*$) específicamente en PA (32:0)(34:1), ePE (2.278 %mol a 2.811 %mol $p = 0.001^{**}$) ePE (34-38:1-3) y ePC (2.384 %mol a 2.908 %mol $p = 0.01^*$) ePC (36-38:1-4), además de una disminución significativa de PI (2.937 %mol a 2.311%mol $p = 0.01^*$) PI (38:3-4). Sumado a esto se registraron aumentos de otras especies de las clases PC (36-44:1-12), PE (32-38:1-3) y SM (24:0-1) (Figura S1e). A los 15 días postisquemia, se presentaron disminuciones significativas de PG (0.093 %mol a 0.069 %mol $p = 0.04^*$) PG (34:1)(36:4) y PC (50.79 %mol a 49.89 %mol $p = 0.04^*$) PC (36-38:6) y disminuciones de varias especies como PC (38:6-2), ePC (40:6), PA (38:4), PG (34:1)(36:4), PS(40:7) y PE(34:0). Además de aumentos en ePE (36:1), PA (34:1) y PI (38:5), y PC (36:5)(40:8) (Figura 1Sg).

Luego del primer mes (Figura 1c – 1 month), el hipocampo presentó disminuciones significativas en clases fosfolipídicas como PI (2.45 %mol a 1.82 %mol $p = 0.03$ *) PI (36-40:4-5); además de un importante aumento en la abundancia de SM (7.06 %mol a 8.37 %mol $p = 0.008$ **) SM (16-18:0-1). A nivel de especies (Figura S1i) se destacan aumentos en ePE (38:0)(34:3), ePC (36:4)(32:1), PC (40:8) y PA (40:5), además de disminuciones en PS (38-42:6-7), PC (34-40:2-2), ePC (34-40:1-4) y ePE(38:1). A los 4 meses (Figura 1b – 4 months), los animales isquémicos presentaron aumentos significativos de las clases SM (6.22 %mol a 7.47%mol $p = 0.004$ **) SM (18:0-1), PC (47.43 %mol a 50 %mol $p = 0.03$ *) PC (32-40:0-5) y disminuciones en PG (0.0874 %mol a 0.0635 %mol $p = 0.02$ *) PG (32:0)(36:4) y una disminución considerable de ePC (3.08 %mol a 2.5 %mol $p = 0.0007$ ***) ePC(38:2)(40:2). De forma detallada (Figura S1k) se identificaron aumentos en especies como PI (40:7) y PS (40:7)(44:8), además de disminuciones en PA (36:2), ePE (34-40:1-6), PS (38:1)(40:2), PI (38:6)(40:6) y PE (31-42:1-7)).

3. La inversión de los niveles de PC/LPC es una tendencia marcada en el suero de forma longitudinal.

En el suero (Figura 1d), de manera temprana (6 horas) se detectó un aumento significativo en la clase PE (0.3598 %mol a 0.5908 %mol $p = 0.02$ *) con representaciones de PE (34-40:1-6). Luego de esto los únicos cambios significativos que se presentaron a nivel de clases fosfolipídicas fueron disminuciones en PC y aumentos en LPC, esta tendencia inversa se detectó desde las 6 horas, hasta los 4 meses siendo significativas a los 7 días (PC (60.71 %mol a 55.48 %mol $p=0.02$ *) LPC (22.89 %mol a 28.303 %mol $p=0.04$ *)) y a los 4 meses (PC (51.28 %mol a 41.73 %mol $p=0.02$ *), LPC (31.73 %mol a 42.07 %mol $p=0.004$ **)); donde también se presentaron disminuciones de ePC (2.88 %mol a 2.36 %mol $p=0.0005$ ***), PE(0.54 %mol a 0.27 %mol $p=0.009$ **), ePE (0.0806 %mol a 0.041 %mol $p=0.01$ *) y PI (3.27%mol a 2.53%mol $p=0.03$ *). Otros cambios relevantes a nivel de clases se logran visualizar por un aumento notorio de PS a las 6 horas sin ser significativo entre Sham e isquemia ya que ambos presentaron el aumento posiblemente derivado de procesos de respuesta post cirugía.

Al analizar por especies lipídicas se destacan aumentos ePC (40:6), ePE (36:2)(40:6), PI (42:7), LPC (22:5-6) y SM (16-18:0), y disminuciones en PC (32-38:2-3), ePC (34-44:2-11) y PI (34-36:2-4) a las 6 horas (Figura S1b). Pasadas las primeras 24 horas (Figura S1d) se mantiene un aumento en especies derivadas de PE (34-40:1-8), ePE (38-40:4), LPC (18:0) y SM (18-24:0), además de disminuciones en PC (34-38:4-5), ePC (38:0) y PI (40:8). Dentro de la primera semana se hace marcado la participación de los derivados de PC en las dinámicas del suero sanguíneo, se presentaron aumentos de especies LPC (16:0)(20:4), PI (34:3) y PA (36:2); y disminuciones principalmente en PC (38-42:3-6), ePC (32-40:2-3) y SM (24:0). La tendencia de cambios entre derivados de PC son el único cambio a 15 días, incluyendo un pequeño aumento en PI (36:2). Se presentaron aumentos de LPC (18:0)(20:1), PC(40:3) y ePC(34:4), además disminuciones de PC (32-42:2-5) y ePC (32-42:).

Al mes post isquemia el comparativo entre sham e isquemia en suero presentó la mínima cantidad de especies con significancia, además que no se logra discriminar del todo entre grupos mostrando una semejanza entre algunos animales sham e isquémicos (Figura S1J). Las especies lipídicas que presentaron aumentos en un mes postisquemia fueron ePE (40:4), LPC (20:2) y SM (16:1). Por el contrario, las que disminuyeron fueron ePE (38:0), ePC (38:0) y PC (34:3). Drásticamente, a los 4 meses se presenta la mayor cantidad de especies significantes entre sham e isquemia (Figura S1I). Las principales especies que aumentaron fueron LPC (18-22:0:4), PI (36:6), SM (18:0) y PC (42:5). Por el contrario, varias disminuyeron incluyendo un amplio número de especies de ePC (36-40:1-6), PC (34-42:1-7), PI (34-44:2-6), PE (34-38:2-4), ePE (38-40:6) y LPE (18:2).

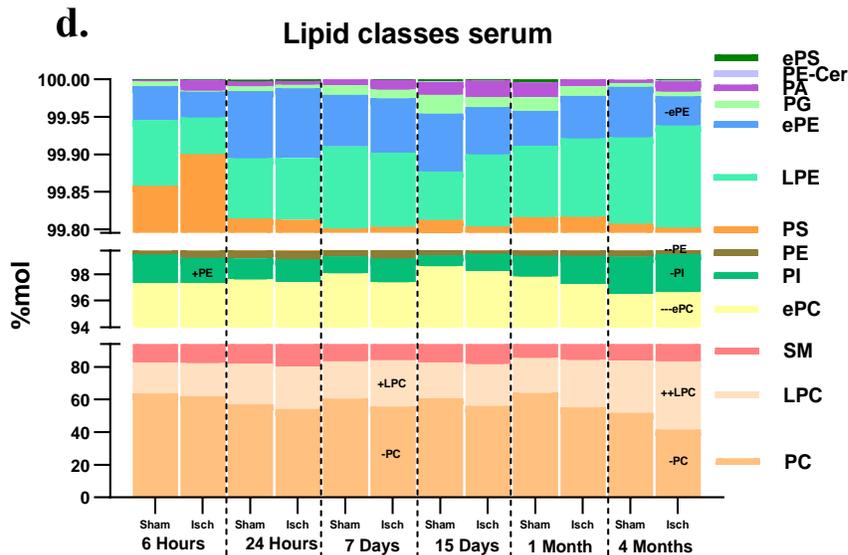
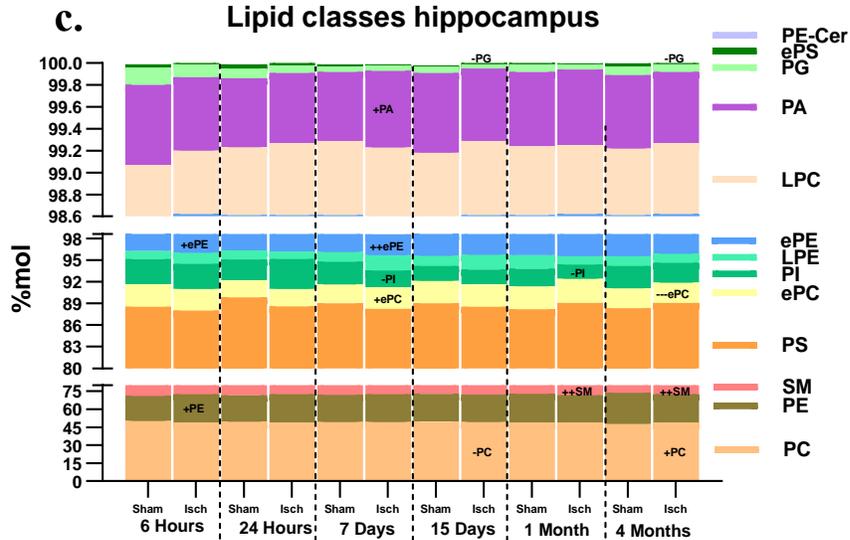
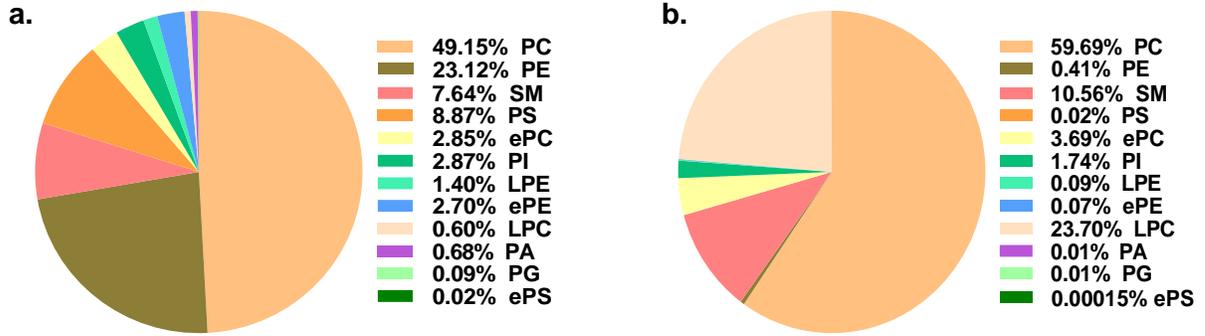


Figure 1. Perfil de fosfolípidos en el hipocampo y plasma. a. Perfil fosfolipídico hipocampo. **b.** Perfil fosfolipídico suero. **c.** Cambios fosfolipídicos longitudinales postisquemia en hipocampo. **d.** Cambios fosfolipídicos longitudinales postisquemia en suero. Prueba t-student para datos paramétricos y prueba de Wilcoxon no paramétricas. Datos presentados en la media y SD (* $p > 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

4. El análisis por PCA rescata el aporte en la variabilidad de los derivados PE en el hipocampo y derivados PC en el suero además de participación de la SM en las dinámicas fosfolípídicas provenientes de ambas muestras.

Al analizar los datos por medio de PCA en búsqueda de refinar la importancia de las especies lipídicas se logran identificar grupos de fosfolípidos discriminantes de manera longitudinal (Figura 2). En el hipocampo, los PCA1 presentaron un porcentaje que varió entre el 54.1% y 64.6%. Se destaca la contribución de derivados de etanolamina los cuales estuvieron presentes a las 6 horas como la PE con predominancia de poliinsaturados (38:0)(42:9)(42:10)(44:10), 7 días y 4 meses con la contribución de ePE (36:1-3) y ePE (38:6)(40:6) respectivamente. Los derivados de PC presentaron contribuciones tanto a las 24 horas PC (30:0)(38:0)(38:3)(44:8)(44:12), 15 días PC (42:2) y ePC (36:1)(36:3), 1 mes PC (40:3)(40:8) y 4 meses PC (32:0)(34:1)(42:2). Otro lípido de importancia en el hipocampo fue la SM la cual presentó contribuciones a las 6 horas SM (18:0), 7 días SM (24:1) y 1 mes (16:0)(18:0)(18:1). Por otra parte, en el suero las contribuciones del PCA1 estuvieron entre el 58.6% y 66.6% a lo largo de estudio longitudinal, los derivados de PC estuvieron presentes en todos los tiempos. De forma temprana los principales contribuyentes en la variación fueron PC (40:6)(36:3) y ePC (40:4) a las 6 horas, dentro de las primeras 24 horas las especies más discriminantes fueron ePC (38:0), PC (36:5)(38:5), además de ePE(40:4) y SM(18:0). Tanto a los 7 días y 15 días la principal participación fue de derivados de PC con variaciones en los ácidos grasos acompañantes. Al mes y 4 meses, a parte de la contribución de PC, ePC y se registró un aporte de ePE (40:4) y SM(16:1) al mes y PI (34:3) a los 4 meses.

En conjunto se identifica diferentes estados de variación y discriminación entre grupos a través del tiempo. En el hipocampo los grupos isquémicos mostraron elipsoides más pequeños a las 6 horas (PCA1,2 = 74.5%), 7 días (PCA1,2 = 75%) y 15 días (PCA1,2 = 70.9%), lo que indica disminución en la dispersión de los datos y menor variabilidad intragrupo, esto permite discriminar de mejor forma con respecto al grupo sham. Curiosamente a las 24 horas (PCA1,2 = 74.2%), la dispersión de los elipsoides sham e isquemia presentan un tamaño y distribución similar, además de un solapamiento entre ellas, al mes (PCA1,2 = 68.7%) y 4 meses (PCA1,2 = 74.4%) los animales isquémicos presentaron mayor dispersión con respecto al grupo sham indicando variabilidad entre el grupo. Por otra

parte, en el suero los grupos isquémicos de 6 horas ($PCA_{1,2} = 77.6\%$), 24 horas ($PCA_{1,2} = 72.7\%$) y 4 meses ($PCA_{1,2} = 86.4\%$) presentaron elipsoides menos dispersos que permiten separar de mejor forma entre grupos. Tanto a los 7 días ($PCA_{1,2} = 71.2\%$) y 15 días ($PCA_{1,2} = 74.6\%$) los grupos presentaron distribuciones similares y solapamientos, a diferencia del primer mes que el grupo isquémico presenta una mayor dispersión con respecto al sham ($PCA_{1,2} = 85,6\%$).

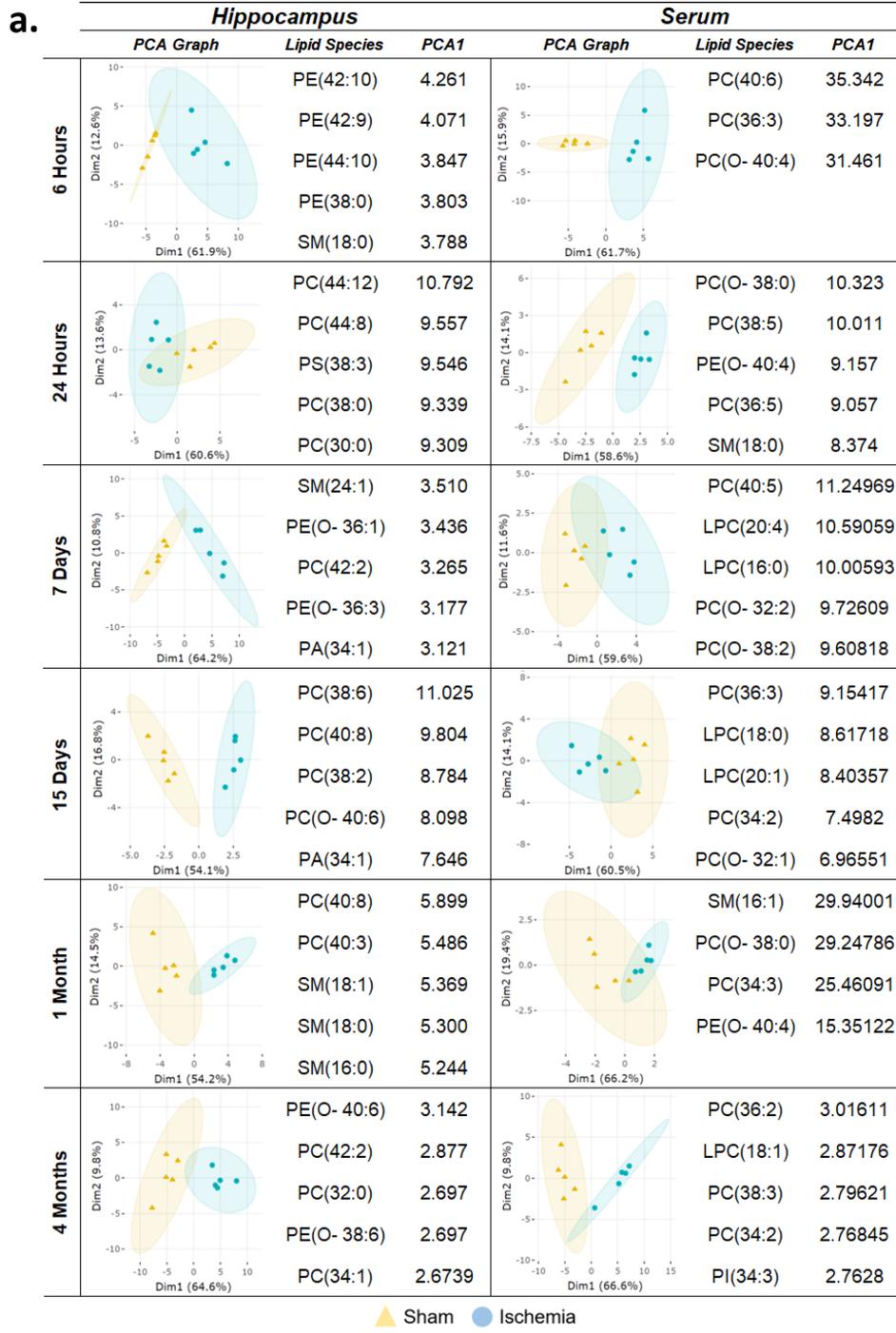


Figure 2. Top 5 especies lipídicas discriminadas por PCA. Análisis multivariado de los perfiles de lípidos en el hipocampo. PCA para discriminar entre las clases de lípidos. El panel PCA graph muestra las gráficas de nubes con los valores del PCA1 y PCA2. El panel PCA1 muestra las cargas factoriales para PC1 con los índices de varianza explicada para cada componente tanto en hipocampo como suero.

5. Comportamiento longitudinal subclases PC y PE postisquemia.

Para entender el comportamiento grupal de las clases de fosfolípidos involucradas en los cambios postisquemia tanto en hipocampo como en suero se analizaron las subclases de PC y PE junto con sus derivados plasminógenos (liso y eter) y como se relacionan entre ellas longitudinalmente a modo de ratio. Los derivados de etanolamina PE, ePE y LPE presentan comportamientos homogéneos tanto en hipocampo como en suero de forma longitudinal, a pesar de presentar variaciones se mantienen similares con el grupo control (Sham). Se registran cambios significativos en la razón ePE/PE a los 7 días en el hipocampo, en el estado postisquemia se presenta un aumento significativo de la proporción lo que indica un aumento de ePE con respecto a PE. En el resto de los tiempos en el hipocampo y en el suero no hay diferencias significativas excepto por un aumento de la proporción LPE/ePE en plasma (Figura 3f).

Por otra parte, al analizar las variaciones en los ratios de las subclases de PC se logra visualizar una tendencia en el comportamiento de ratio de LPC/PC. En el hipocampo desde las 6 horas se genera un aumento en la proporción indicando un aumento en LPC sobre PC (Figura 4c). Esto es sostenido hasta el primer mes donde se genera una disminución indicando cambio en la proporción. Curiosamente en el suero parece haber un reflejo de estas reacciones ya que desde las 6 horas se empieza a generar un leve aumento en la proporción LPC/PC la cual aumenta y se sostienen hasta el mes para luego presentar exacerbación a los 4 meses (Figura 4d). Los demás ratios no presentaron grandes diferencias, la relación LPC/ePC presentó cambios similares a LPC/PC, pero posiblemente generado por el aumento de LPC derivado de PC.

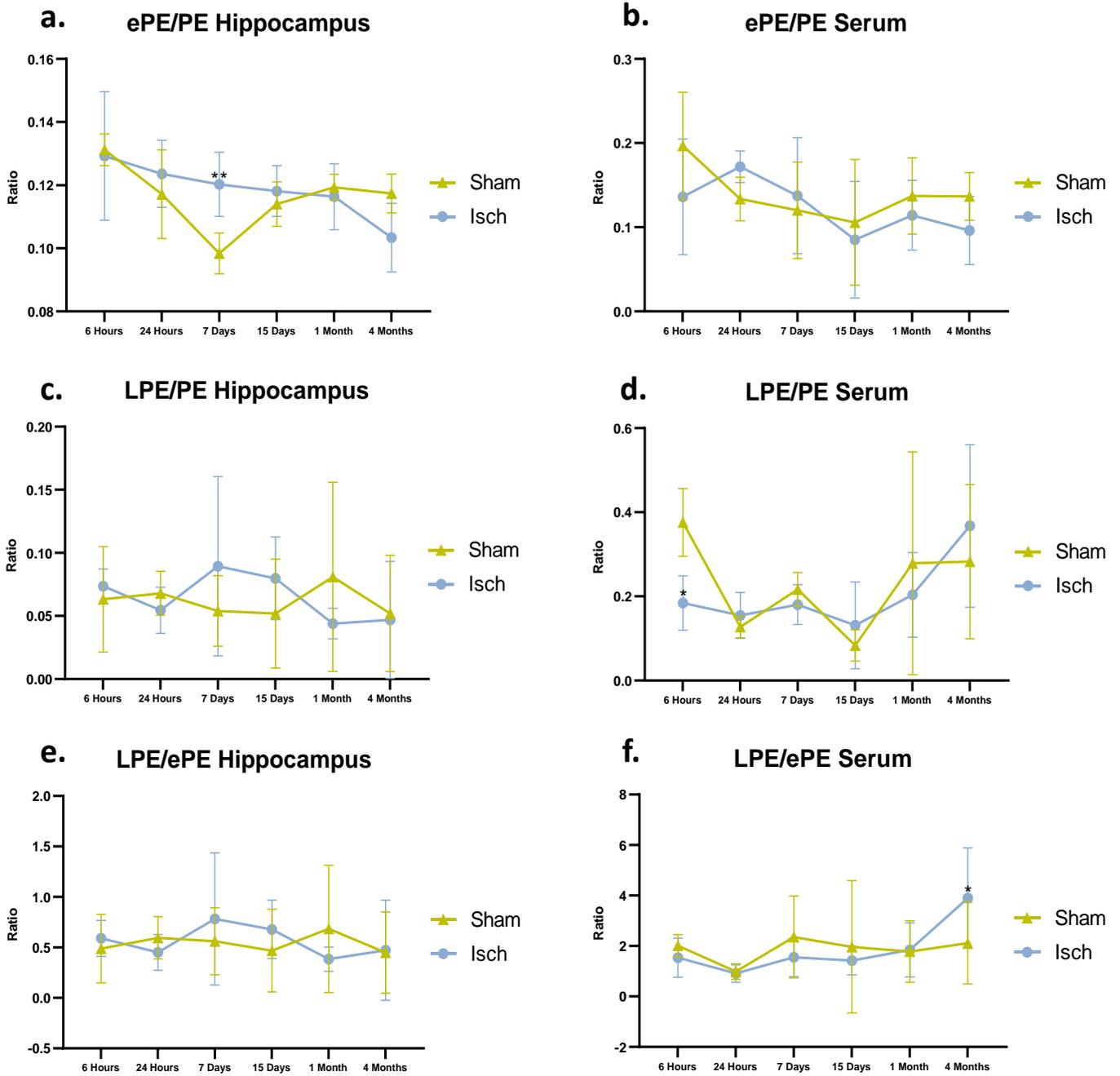


Figure 3. Cambio longitudinal de las relaciones entre las subclases de PE. Ratios de las proporciones molares de cada subclase. Múltiple T student. Datos presentados en la media y SD (* $p > 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

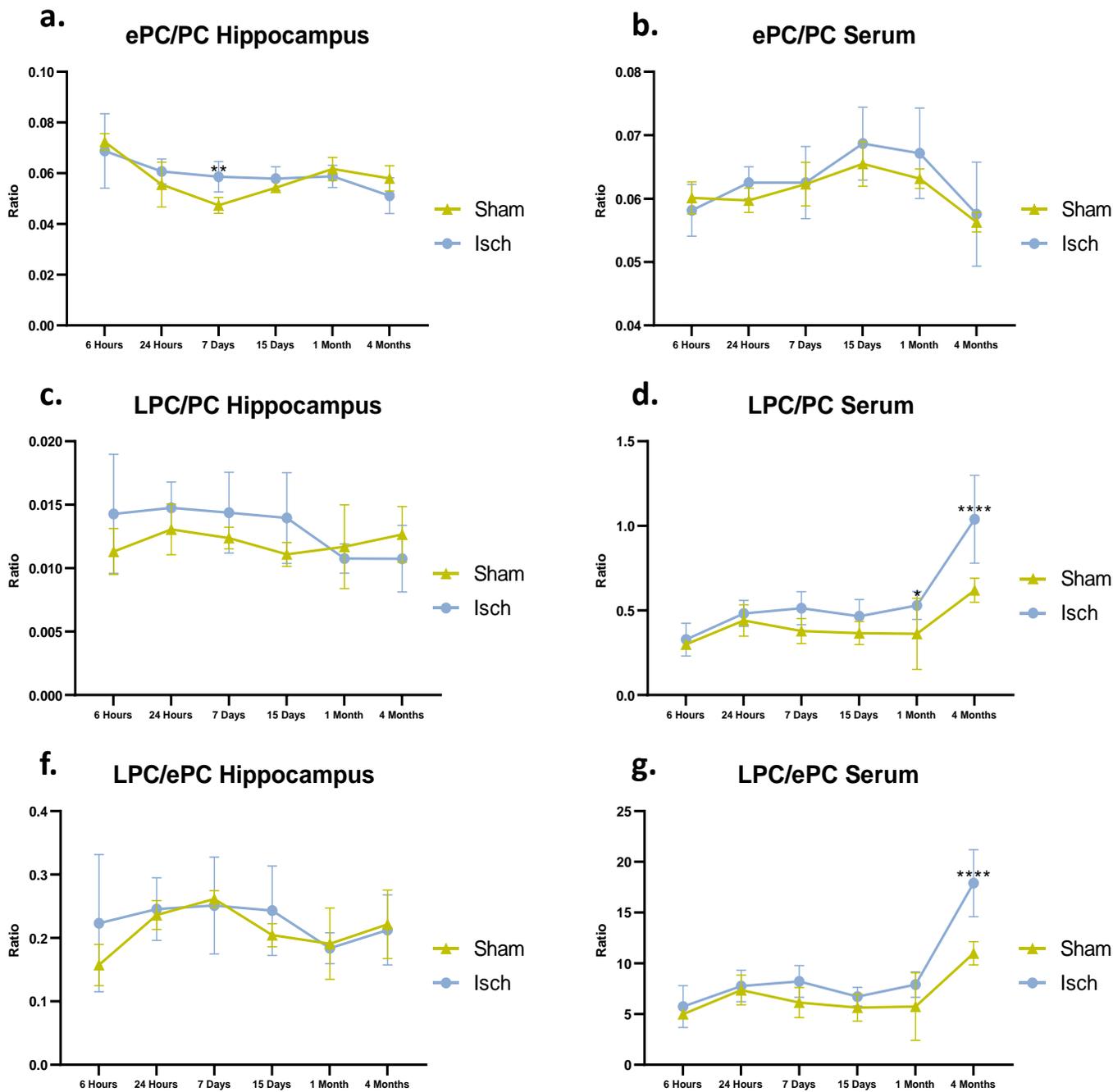


Figure 4. Cambio longitudinal de las relaciones entre las subclases de PC. Ratios de las proporciones molares de cada subclase. Múltiple T student. Datos presentados en la media y SD (* $p > 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

6. Correlación de las clases fosfolipídicas de hipocampo y suero con el desempeño motor postisquemia.

En conjunto con el análisis lipídico, se realizó la evaluación del desempeño motor en cada tiempo postisquemia por medio de la prueba de 18 puntos y plano inclinado lo que registró patrones temporales distintivos (Figura 5a y b). A las 6 horas postisquemia, las ratas exhibieron el nivel más bajo de desempeño neurológico en comparación con los animales simulados (16.5 a 7.5 puntos $p = 0.0002$ ***) (Figura 5a). Este déficit inicial mostró una mejoría gradual que se fue registrando a 24 horas (18 a 11.8 puntos $p = 0.0002$ ***), 7 días (17.9 a 16.5 puntos $p = 0.0064$ **), estabilizándose a los 15 días (18 a 18 puntos $p = 0.999$ exacto), lo que se mantuvo hasta un mes postisquemia (17.9 a 17.8 puntos $p = 0.999$ exacto). Sin embargo, se observó una recaída notoria después del primer mes, siendo significativa a los 4 meses (18 a 15.2 puntos $p = 0.0003$ ***). En el análisis de plano inclinado se logra evidenciar un proceso de recuperación similar que en el neuroscore donde los animales isquémicos presentaron un desempeño menor en comparación con los simulados. Por medio de análisis de correlación de Pearson se analizó la conducta de las clases lipídicas con respecto al desempeño neurológico, de forma general el análisis muestra que todas las clases presentan variaciones en las correlaciones tiempo a tiempo tanto en hipocampo (Figura 5b) y suero (Figura 5c).

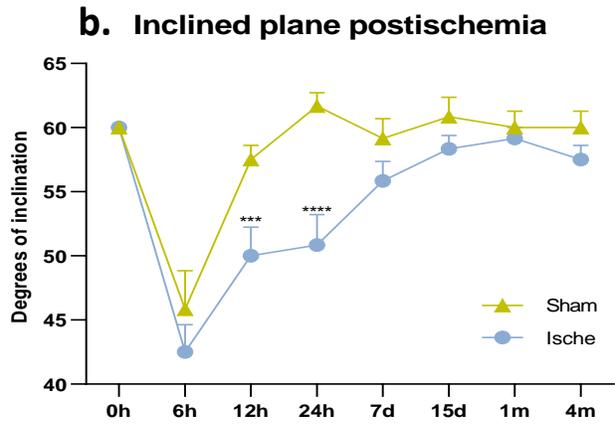
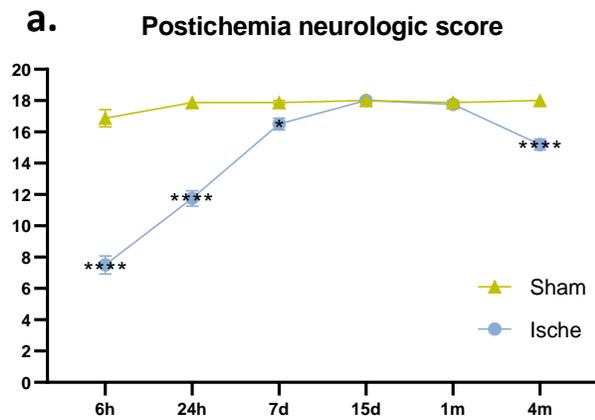
Al evaluar los valores de correlación durante el estado isquémico en comparación con el grupo de control (sham), se observa el comportamiento de diversas clases de fosfolípidos en respuesta al desempeño motor tanto en el hipocampo como en el suero. A las 6 horas, 24 horas y 4 meses, cuando el puntaje neurológico disminuye, las clases de mayor importancia debido a un aumento serían aquellas con valores de correlación negativos en el contexto de la isquemia, mientras que, a los 7 días, 15 días y un mes, la interpretación sería inversa. En el hipocampo a las 6 horas (Figura 5b – 6 hours) las clases con la correlación más negativa fueron PS ($r=-0.02$ to $r=-0.88$), PE-Cer ($r=0.37$ to $r = -0.76$) y PI ($r=0.23$ to $r=-0.71$), seguidos de LPC ($r=-0.10$ to $r=-0.67$), PE (0.32 to -0.55) y LPE (0.12 to -0.24), por el contrario las clases con correlación positiva, o que disminuyeron en isquemia fueron PC ($r = -0.28$ to $r=0.89$) y SM ($r = -0.35$ to $r = 0.70$). Por otro lado, en el suero a 6 horas postisquemia (Figura 5c – 6

hours) los valores de correlación negativos no fueron tan altos, pero si se presentaron desplazamientos de la correlación con respecto a los sham como en LPC ($r=-0.35$ to $r=-0.57$), SM ($r=0.41$ to $r=-0.21$) y PI ($r=0.29$ to $r=-0.26$). Los de mayor correlación positiva fueron PE (-0.43 to 0.88) y PC (-0.26 to 0.66), otras clases presentaron desplazamiento positivo de la correlación como ePC (0.24 to 0.65), LPE (0.21 to 0.35), PE-Cer (0 to 0.41), PA (0.10 to 0.56) y PG (0.28 to 0.74). A las 24 horas las correlaciones en el hipocampo (Figura 5b – 24 hours) no fueron tan fuertes, las clases lipídicas más correlacionadas negativamente fueron PI ($r=0.28$ to -0.52) y PS ($r=0.2$ to -0.5) y positivamente PC ($r=-0.78$ to $r=0.56$) y SM ($r=-0.95$ to $r=0.47$), además de pérdida de correlación de PE-cer (0.90 to 0) y PG (-0.48 to 0). En el suero (Figura 3c – 24 hours), las clases fosfolipídicas con mayores valores negativos con respecto al sham fueron PE (0.75 to -0.58), ePE (0.79 to -0.47) y PI (0.13 to -0.30), además de desplazamientos de correlación de LPE (0.93 to 0.25) y PS (-0.44 to -0.78). Por el contrario, no se registraron valores altos de correlación positiva, pero si desplazamientos como en PA (-0.52 to 0.38) y otros desplazamientos hacia 0 como SM (-0.97 to 0.08), PC (0.56 to 0.03), LPC (-0.31 to 0.03) y ePC (0.60 to 0.03).

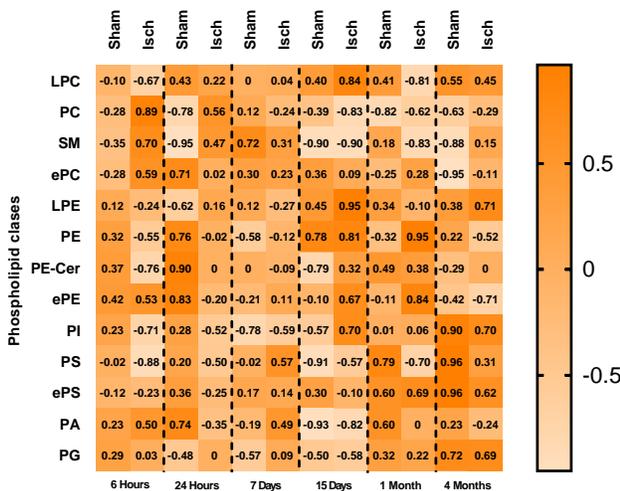
A los 7 días mientras el score motor se recuperaba, en el hipocampo (Figura 5b – 7 days) las clases con mayor correlación positiva fueron PS ($r=-0.02$ to $r=0.57$) y PA ($r=-0.19$ to $r=0.49$), por el contrario, con correlación negativa fueron PI ($r=-0.78$ to $r=-0.59$) y con correlación negativa no tan fuerte LPE ($r=-0.62$ to $r=$) y PC ($r=-0.12$ to $r=-0.24$). En el suero (Figura 5c – 7 days), se identifica una inversión en la relación de PC (0.73 to $0.-71$), LPC (-0.44 to 0.40) y ePC (0.37 to 0.36) con respecto a la recuperación en el desempeño motor, además de esto se detectan aumentos positivos en SM (-0.03 to 0.36), aumento negativo en ePS (0 to -0.84) y pérdidas de correlación en LPE (-0.75 to 0), PE (-0.46 to 0.07), PI (-0.92 to 0.12), PS (-0.63 to 0). A los 15 días cuando los animales isquémicos recuperaron el puntaje en el desempeño motor las clases fosfolipídicas con mayor correlación positiva en el hipocampo (Figura 5b – 15 days) fueron LPE ($r=0.45$ to $r=0.95$), LPC (0.40 to 0.84), ePE ($r=-0.10$ to $r=0.70$) y PI (-0.57 to 0.70), por el contrario, PC presenta correlación negativa más alta ($r=-0.39$ to -0.83). Por otra parte, en el suero (Figura 5c – 15 days) se mantiene la correlación inversa con aumento del valor entre PC (0.48 to -0.84) y LPC (-0.77 to 0.85), además de desplazamientos positivos en PE (-0.78 to 0.55), LPE (-0.93 to 0.44), ePE (-0.86 to 0.5) y PI

(-0.59 to 0.75). Las clases fosfolipídicas con disminución de la correlación fueron ePS (0.31 to -0.80) y SM (0.77 to -0.18).

En el hipocampo pasado el primer mes (Figura 5b – 1 month) los cambios en las clases fosfolipídicas correlacionados positivamente con el desempeño motor fueron PE ($r=-0.32$ to $r=0.96$) y ePE ($r=0.11$ to $r=0.84$), por el contrario, los que presentaron una mayor correlación negativa fueron LPC ($r=0.41$ to $r=-0.81$), SM ($r=0.18$ to $r=-0.83$) y PS ($r=0.79$ to -0.70). Al mismo tiempo en el suero, se identifica nuevamente una inversión en la correlación con respecto a PC (-0.39 to 0.47) y LPC (0.44 to -0.47) y el desempeño motor, otras clases lipídicas toman relevancia por aumentos en la correlación como PG (-0.01 to 0.61), PS (-0.85 to 0.35) y SM (-0.53 to 0.51), disminuciones LPE (0.81 to -0.46), PI (0.73 to -0.59) y pérdida de correlación en ePS (-0.96 to 0). Por último, a los 4 meses cuando se registró la recaída del desempeño motor, en el hipocampo (Figura 5b – 4 months) se presentó aumento en la correlación negativa de PE ($r=0.22$ to $r=-0.52$), PA (0.23 to -0.24), por el contrario, el de mayor correlación positiva fue LPE ($r=0.38$ to $r=0.71$) y aunque no tuvo una correlación muy alta la SM presentó un cambio hacia la correlación positiva ($r=-0.88$ to $r=0.15$). En el suero a los 4 meses, algunas clases lipídicas ganan importancia por cambios en su correlación. Las clases lipídicas que presentaron correlación negativa fueron ePE (-0.01 to -0.96), PE-Cer (0 to -0.88), además de PI (0.31 to -0.41), PA (0.38 to -0.42) y SM (0.10 to -0.49). Igualmente, algunas clases presentaron correlación positiva como PS (0.14 to 0.73) y ePS (0 to 0.80).



c. Postischemia hippocampal phospholipids correlated with neurological score



d. Postischemia serum phospholipids correlated with neurological score

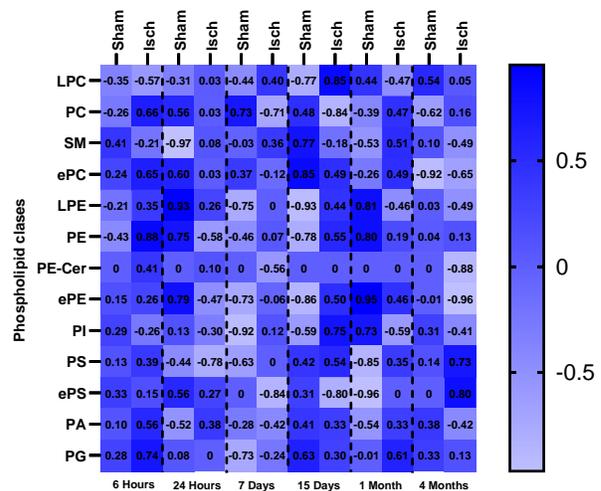


Figure 5. Correlación de las clases lipídicas con el score motor. a. Score neurológico postischemia. Múltiple T student. Datos presentados en la media y SD (* $p > 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). b. Correlación del desempeño cognitivo con los cambios fosfolipídicos postischemia en hipocampo. c. Correlación del desempeño cognitivo con los cambios fosfolipídicos postischemia en suero. Análisis de correlación de Pearson.

7. Implicaciones celulares asociadas a los perfiles fosfolipídicos del hipocampo y suero postisquemia, acercamiento bioinformático.

Después de examinar detenidamente los conjuntos de fosfolípidos y su comportamiento longitudinal, nos propusimos mejorar la interpretación de los cambios relacionados con los perfiles fosfolipídicos mediante el uso de herramientas de análisis lipidómico. Para este propósito, empleamos la plataforma LION/web: LION enrichment análisis (147). Esta herramienta, a través del enriquecimiento de vías, nos permitió interpretar los cambios en los perfiles de lípidos en comparación con un grupo control, y entender cómo se relacionan con procesos celulares, biofísicos y bioquímicos. En cuanto a los fosfolípidos, observamos que están estrechamente vinculados con la composición de diversas organelas celulares y desempeñan funciones importantes en las membranas biológicas, así como en la señalización celular. Entre las principales organelas asociadas a estos cambios se encuentran la mitocondria, el retículo endoplasmático y la membrana plasmática. Los enriquecimientos relacionados con la mitocondria (Figura 6a) exhibieron patrones distintivos. En el hipocampo, se observó un notable aumento en el enriquecimiento a las 6 horas (ES=0,236), seguido de disminución gradual hasta alcanzar los 4 meses (24h ES=0,174, 7d ES=0,181, 15d ES=0,108, 1m ES=-0,122, 4m ES=-0,179). En contraste, en el suero se evidenció un aumento progresivo en el enriquecimiento desde las 6 horas hasta los 7 días (6h ES=0,249, 24h ES=0,279, 7d ES=0,438), seguido de una disminución en el enriquecimiento a los 15 días (ES=-0,199), un nuevo incremento al mes (ES=0,24) y, finalmente, una reducción a los 4 meses (ES=-0,287). En cuanto al retículo endoplasmático (Figura 6b), se observa un aumento de enriquecimiento en el hipocampo a las 6 y 24 horas (6h=0,255), seguido de una disminución progresiva que se mantiene hasta los 4 meses (24h ES=0,283, 7d ES=-,134, 15d ES=-0,141, 1m ES=-0,13, 4m ES=-0,215). En el suero, se aprecian cambios relacionados con el retículo endoplasmático con un aumento de enriquecimiento a las 24 horas (ES=0,324), 7 días (ES=0,264), 15 días (ES=0,363) y 1 mes (ES=0,381). Sin embargo, tanto a las 6 horas (ES=-0,27) como a los 4 meses (ES=,0,41), se registra una disminución en el enriquecimiento.

Los enriquecimientos relacionados con la membrana plasmática (Figura 6c) exhibieron una participación notable, especialmente a nivel del suero. Se observaron aumentos en todos los

intervalos de tiempo posteriores a la isquemia (6h ES=0,342, 24h ES=0,323, 15d ES=0,357, 1m ES=0,334, 4m ES=0,47), con la excepción de los 7 días (ES=0,401), donde se registró una pérdida en el enriquecimiento. Por otro lado, en el hipocampo, el enriquecimiento mostró disminución de forma temprana a las 6 horas (ES=-0,154), 24 horas (ES=-0,21) y 7 días (ES=-0,131) y aumento significativo desde los 15 días hasta los 4 meses (15d ES=0,168, 1m ES=0,123, 4m ES=0,258). A parte de la función estructural y conformación de organelas membranosas, los fosfolípidos también tienen funciones involucradas en procesos de señalización mediados por lípidos. Los enriquecimientos en cuanto a la señalización mediada por lípidos (Figura 6d) tuvo mayor participación en los cambios presentados en el suero siendo mayor a los 15 días (ES=0,353) y 4 meses (ES=0,364), por otra parte, en el hipocampo presento dinámicas entre aumentos y disminuciones del enriquecimiento siendo los más altos a 7 días (ES=0,277) y 15 días (ES=0,221).

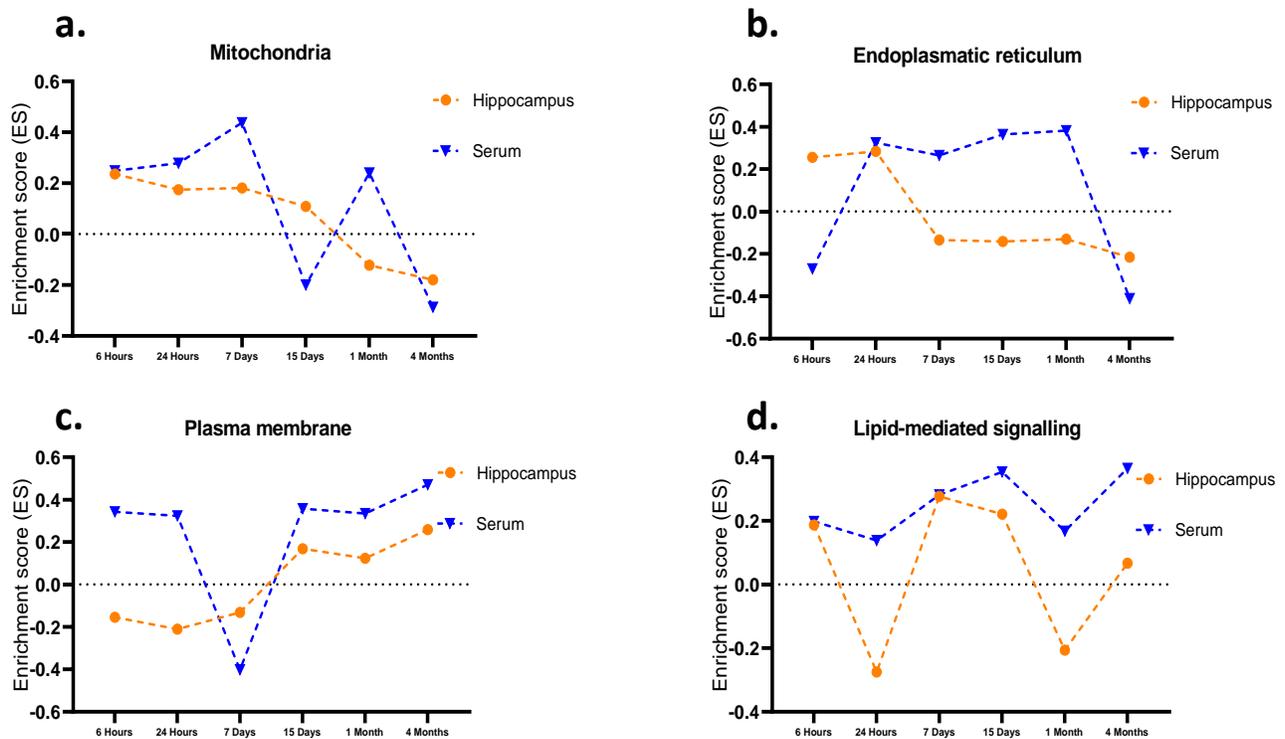


Figure 6. Comportamientos procesos organelares asociados con los cambios fosfolipídicos. Análisis de enriquecimiento utilizando una ontología relacionada con los lípidos en la plataforma LIONWeb. Algoritmo de análisis de enriquecimiento paquete R topGO.

8. Variaciones de características biofísicas de membranas basados en la composición fosfolipídica postisquemia.

Todas las variaciones en la composición de fosfolípidos o ácidos grasos asociados presentan implicaciones en las características biofísicas de las membranas o estructuras membranosas que componen (37,44). Los análisis bioinformáticos por enriquecimientos permiten identificar cómo se comportan ciertas características de las membranas dependiendo de los cambios en comparación con un control. La curvatura de la membrana es una característica que depende de la geometría de los fosfolípidos las cuales pueden generar curvas positivas, neutras o negativas (37). De manera longitudinal se detectan variaciones entre los cambios en la curvatura tanto en hipocampo como en suero (Figura 7a), existe una regulación entre aumentos y disminuciones en el enriquecimiento a modo de compensación o equilibrio. En el hipocampo la amplitud de los enriquecimientos es menor en comparación con los detectados del suero, aunque presenta desplazamientos en los diferentes tiempos, a las 6 horas y al mes postisquemia el hipocampo muestra en enriquecimiento más hacia el aumento de curvaturas positivas, en los demás tiempos, aunque se conserva la distribución se visualiza un desplazamiento a un tipo de membranas con curvaturas más negativas. Por el contrario, en el suero tanto a las 6 y 24 horas la distribución de enriquecimientos es similar a la del hipocampo con predominancia hacia curvaturas más positivas. Luego de los 7 días se registra una amplitud en el enriquecimiento hacia curvaturas positivas y negativas con predominancia de las positivas lo cual cambia a los 4 meses donde se genera un desplazamiento hacia curvaturas más negativas.

La segunda característica analizada por medio de enriquecimientos es el grosor de las membranas (Figura 7b), esta característica depende principalmente de la composición de ácidos grasos, la longitud de sus cadenas de carbonos y número de insaturaciones. El hipocampo muestra de forma longitudinal una distribución más amplia en el grosor de membrana con variación en el desplazamiento del enriquecimiento, de manera temprana a las 6 y 24 horas el desplazamiento es mayor hacia membranas con grosor mayor lo cual cambia a los 7 y 15 días presentando enriquecimiento hacia membranas menos gruesas. Al mes y cuarto mes nuevamente se detecta un desplazamiento hacia un grosor mayor. Por otro

lado, el suero presenta cambios más marcados en el grosor membranal. A las 6 horas la distribución del enriquecimiento muestra un balance con un desplazamiento hacia membranas más gruesas, luego de las 24 horas se genera un desplazamiento hacia grosores menores lo cual se mantiene a los 7 días y se intensifica a los 15 días y 1 mes donde la amplitud de la distribución pierde enriquecimiento de membranas más gruesas. A los 4 meses se registra nuevamente una amplitud en el enriquecimiento, pero manteniendo el desplazamiento a membranas menos gruesas.

La variación en las cabezas polares de los fosfolípidos está involucrada con la carga que pueden presentar las membranas biológicas, al analizar esta característica (Figura 7c) se rescata que de manera longitudinal tanto en el hipocampo y el suero la distribución del enriquecimiento es similar hacia ambas cargas (positiva y negativa). La principal diferencia está en la amplitud de los enriquecimientos. En el hipocampo a las 6 y 24 horas se mantiene la distribución de cargas la cual disminuye a los 7 días, 15 días y primer mes, siendo menor a los 15 días. Al cuarto mes se logra visualizar un aumento en la amplitud del enriquecimiento indicando ganancia en las cargas membranales. En el suero, se visualiza un aumento notorio en la amplitud de 6 a 24 horas el cual presenta una leve disminución hasta los 15 días y aumento al mes y 4 meses. Las membranas van sumando variaciones y presentado características emergentes como la capacidad de difusión y respuesta a la temperatura. La difusión depende de características como la relación entre saturados e insaturados, además de la carga de las cabezas polares, en la figura 6d se visualiza a nivel general que tanto el hipocampo como el suero van presentando desplazamientos hacia difusión baja con un cambio diferencial al mes donde en el hipocampo se generó un desplazamiento hacia difusión alta en cambio el suero perdió el enriquecimiento de difusión alta, lo que se recuperó a 4 meses manteniendo la carga negativa del desplazamiento. Los lípidos de membrana son susceptibles a los cambios de temperatura, en la Figura 7f se visualiza el proceso de transición de temperatura reflejado por cambios fosfolipídicos tanto en el hipocampo como en el suero. De manera temprana se registra un desplazamiento del enriquecimiento hacia altas temperaturas siendo más alta en el suero, pasadas las 24 horas se visualiza una inversión de enriquecimiento hacia temperatura baja, esto se mantuvo en el hipocampo a los 15 días. En el suero, a los 7 días se registra aumento que baja a los 15 días y se mantiene hasta los 4 meses.

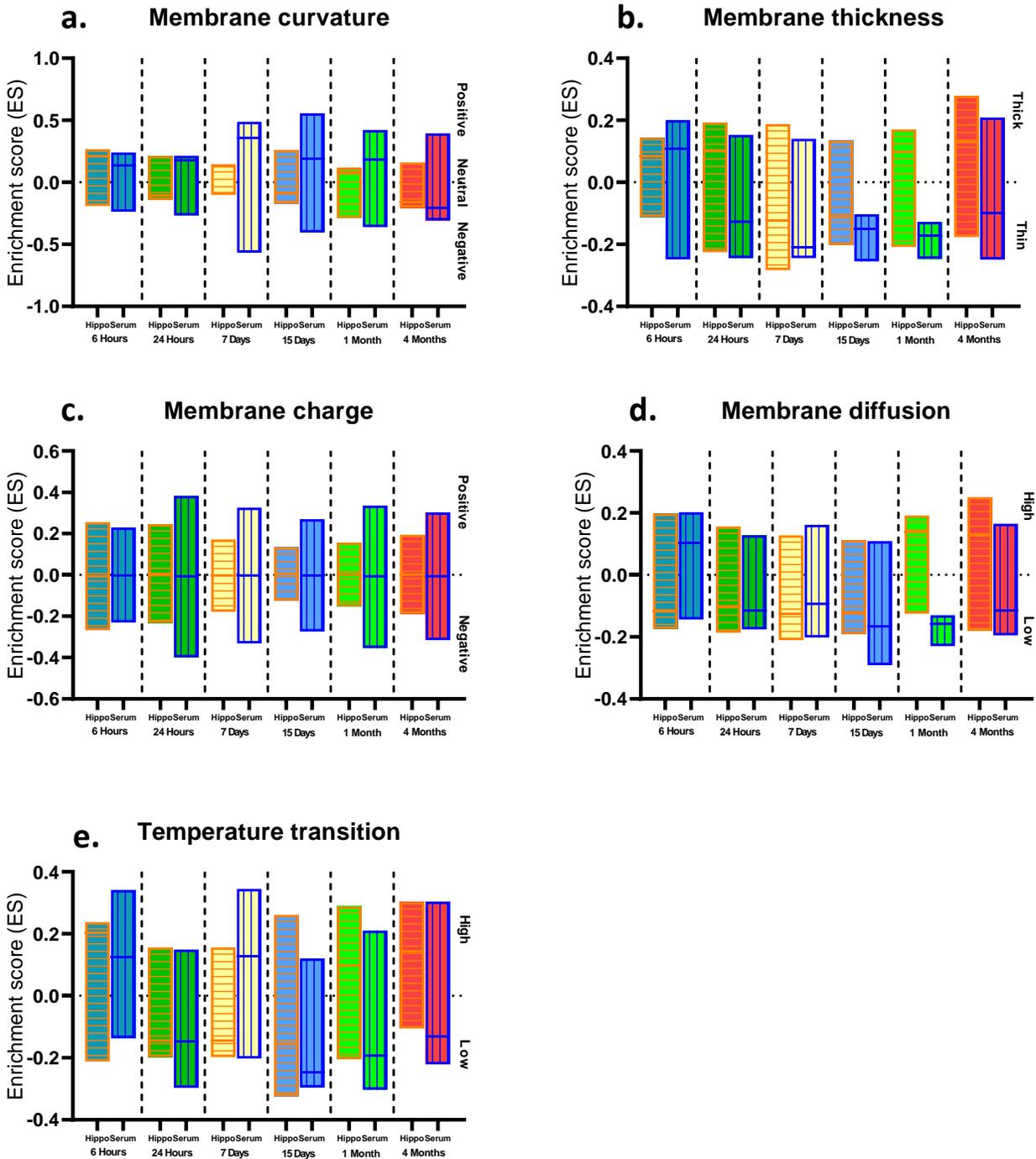


Figure 7. Características biofísicas membranales asociadas los cambios fosfolipídicos. Análisis de enriquecimiento utilizando una ontología dedicada relacionada con los lípidos en la plataforma LIONWeb. Algoritmo de análisis de enriquecimiento paquete R topGO.

9. Conversión y remodelamiento de fosfolípidos como respuesta a la injuria cerebral.

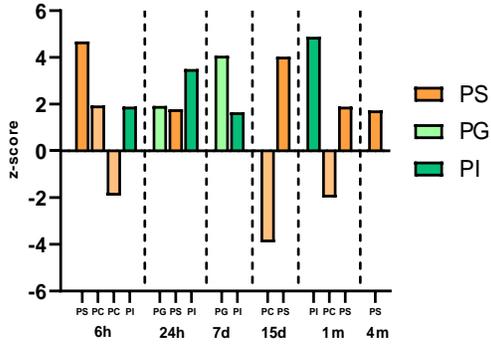
Las membranas biológicas se encuentran en constante remodelamiento adaptándose a las necesidades celulares (50,150). A nivel de fosfolípidos existen diversos mecanismos bioquímicos encargados de su regulación. Algunas clases son subproductos o precursoras de otras, como por ejemplo el PA es sustrato de PS, PI y PG (151). La herramienta web BioPAN (152), permite identificar cuáles son las principales reacciones e interacciones de un grupo de lípidos comparando con un grupo control. La conversión de PA toma diferentes momentos a lo largo del análisis longitudinal (Figura 8a), a los 6 meses se identifica una conversión más alta de PA \rightarrow PS y en menor cantidad PA \rightarrow PI, por el contrario, se registra también significancia de la vía que convierte PC \rightarrow PA. A las 24 horas disminuyó la procesividad hacia PS y se hacen relevantes el paso de PA \rightarrow PI y PA \rightarrow PG. A la primera semana, se registra aumento significativo en las vías de conversión hacia PG y PI. A los 15 días, nuevamente toma relevancia significativa la vía PA \rightarrow PS y activación de la vía PC \rightarrow PA. Al mes postisquemia se da un aumento en la vía hacia PI, y disminución en la vía PC \rightarrow PA y PA \rightarrow PS, que se sostiene hasta los 4 meses. En el suero (Figura 8b), a nivel general hay una disminución de reacciones asociadas a PA, a las 24 horas y 15 días no se registraron como reacciones activas. En cambio, a las 6 horas presentaron aumentos las vías hacia PS y PG además de PC \rightarrow PA, de estas, a los 7 días estuvieron aun activas la vía hacia PI con disminución y PC \rightarrow PA con aumento. A un mes y 4 meses solo se registraron las vías PA \rightarrow PI y PC \rightarrow PA respectivamente.

Luego de la conversión de PA \rightarrow PS, la PS puede pasar a ser PE y viceversa, al analizar el comportamiento de estas vías como reacciones activas en postisquemia. A nivel del hipocampo (Figura 8c) se visualiza un aumento principalmente de la vía PS \rightarrow PE con notoria participación a las 6 horas y dinámicas de disminución y aumento en los demás tiempos. Por otro lado, la vía PE \rightarrow PS tuvo participación activa a los 7 días, un mes y cuatro meses, siendo el mayor a este tiempo. En el suero (Figura 8d), estas vías solamente estuvieron activas a las 6 horas principalmente con una conversión de PE \rightarrow PS, y en menor actividad PS \rightarrow PE, a los 4 meses únicamente estuvo activa PE \rightarrow PS. Dentro de otras conversiones descritas entre

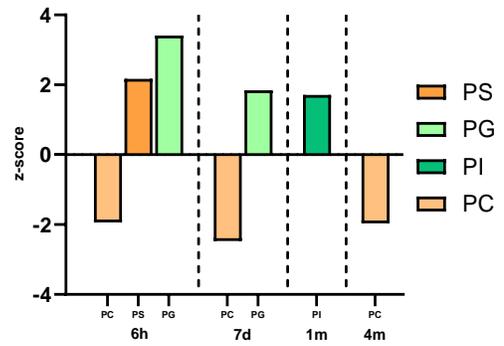
fosfolípidos se encuentra la conversión de PE → PC. En el hipocampo (Figura 8e), no se registró actividad a las 24 horas, pero sí en los demás tiempos siendo mucho mayor a los 4 meses. Por otra parte, en el suero (Figura 8f) solamente se registraron a las 24 horas y 4 meses siendo mayor en este último. Una conversión final, o que cerraría la inter conversión entre estos tres PL sería la PC → PS. En hipocampo (Figura 8g) fue similar al procesamiento de PE → PC, se visualiza participación desde las 6 horas, aumentando a 15 días y un mes, siendo muy activa a los 4 meses. Por otra parte, en el suero (Figura 8h) no se registraron actividad a las 24 horas ni 15 días, en los demás fue similar con un leve aumento a los 7 días.

Otras de las reacciones que permite identificar BiosPAN en la conversión y remodelamiento de los fosfolípidos es el cambio entre fosfolípidos y sus lípidos lisos, en este caso el paso de PC ↔ LPC y PE ↔ LPE. En el hipocampo (Figura 8i) fue mucho mayor el paso hacia los fosfolípidos completos PC y PE, con mayor participación de la vía LPC → PC, la cual estuvo presente desde las 24 horas siendo mayor a los 7 días y 4 meses. La vía LPE → PE tuvo participación a las 24 horas y 7 días. Por otra parte, la conversión PC → LPC fue activa y homogénea a lo largo del estudio, pero se presentó con bajo score. En cambio, PE → LPE solo fue activa desde los 7 días hasta los 4 meses con actividad mayor que la de PC. En el suero (Figura 8j) se visualiza un aumento superior en la vía PC → LPC la cual inicia a las 6 horas y se exagera desde las 24 horas manteniéndose activa hasta los 4 meses, pero siendo menor a los 7 días, 15 días y un mes donde registra la menor disminución. La vía PE → LPE tuvo participación a las 1 mes y 4 meses, pero con menor valor en comparación con la otra. Con respecto a las vías contrarias LPC → PC y LPE → PE se activaron de forma temprana a las 6 horas, a las 24 horas la vía LPC → PC se activó considerablemente, luego disminuyó a 7 días y 15 días siendo menor a los 7. La vía LPE → PE también presentó participación a los 7 días. Todas las reacciones identificadas se logran ver de forma más detallada en la **figura suplementaria 2**.

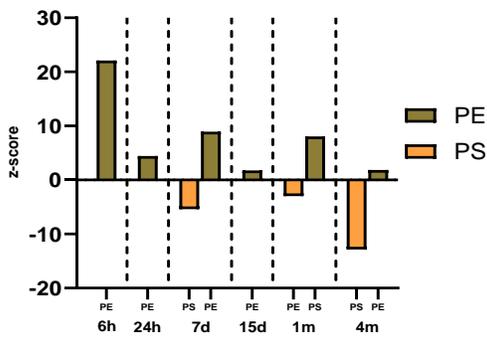
a. Phosphatidic acid exchange hippocampus



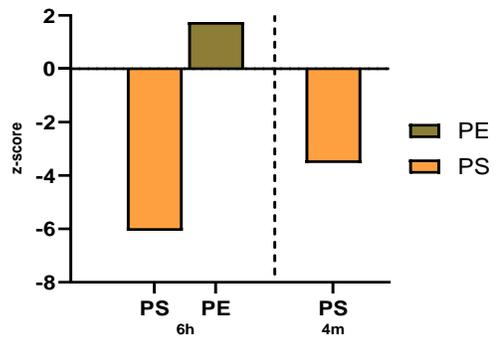
b. Phosphatidic acid exchange serum



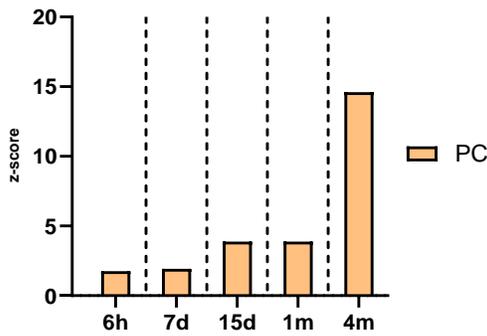
c. PS <-> PE conversion hippocampus



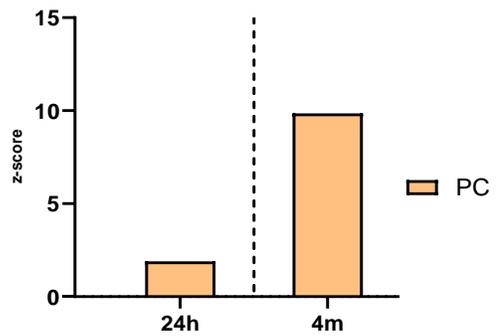
d. PS <-> PE conversion serum



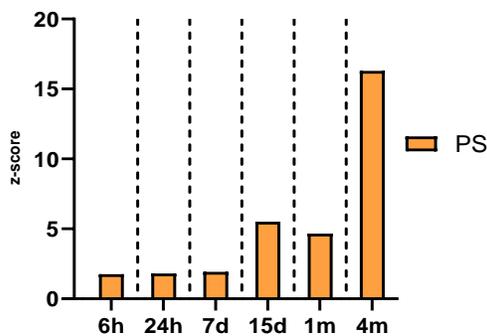
e. PE -> PC conversion hippocampus



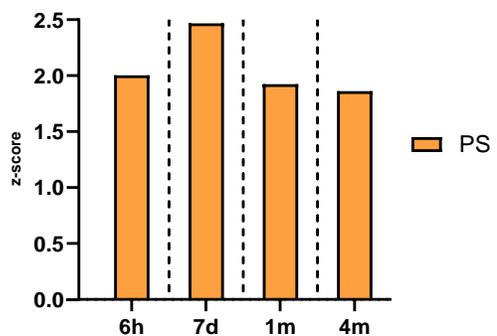
f. PE -> PC conversion serum



g. PC -> PS conversion hippocampus



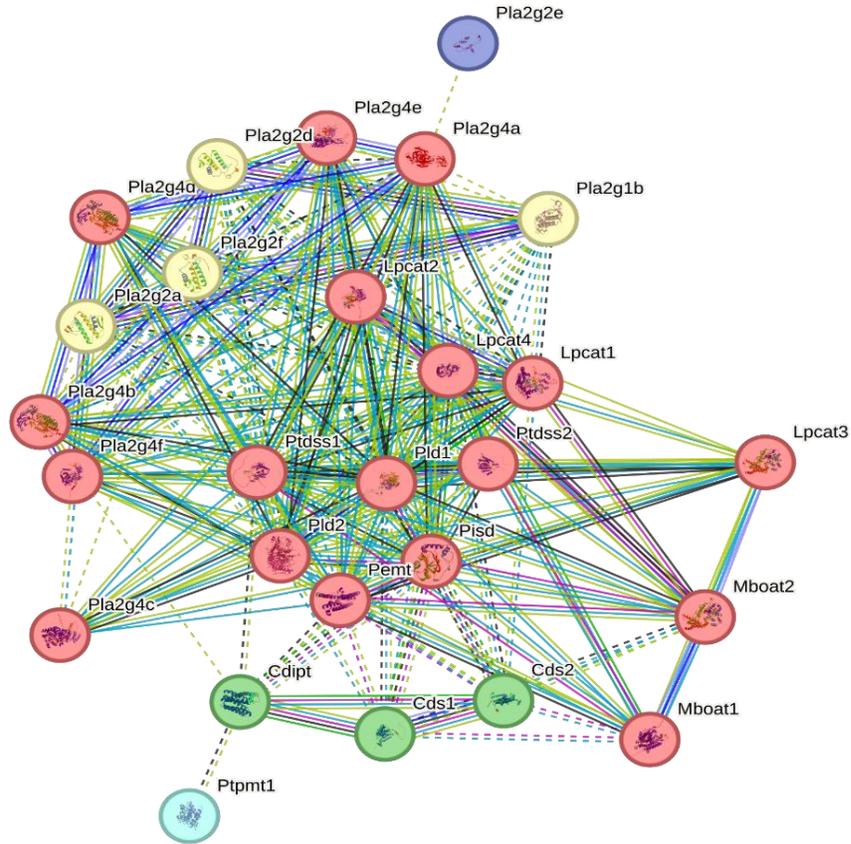
h. PC -> PS conversion serum



10. Principales genes asociados a los cambios fosfolipídicos en postisquemia.

Basadas en las principales reacciones se logran identificar las enzimas que teóricamente estarían directamente involucradas con esos cambios fosfolipídicos. Todas las enzimas detectadas hacen parte de mecanismos de remodelación de fosfolípidos. Con ayuda de la herramienta STRING (149) generamos una red de asociación de estas enzimas y por medio de un algoritmo de clasificación genero 5 clúster proteínas según mayor interacción (Figura 9a). El clúster número uno fue el presente más abundancia de enzimas debido a que concentró las diferentes isoformas de LPCAT, MBOAT, PLA2, además de las enzimas PEMT, PISD. El segundo clúster agrupó nuevamente isoformas de PLA2 y en los demás se distribuyeron las otras enzimas identificadas. Para mayor información revisar la **tabla suplementaria 2**. Luego de esto, integramos todas las enzimas en sus funciones y analizamos como fueron sus comportamientos a lo largo del tiempo. De manera general todos presentaron variaciones a lo largo del tiempo, de las enzimas del clúster numero 1 PLA2 y LPCAT presentaron comportamientos similares, siendo las más activas en los cambios fosfolipídicos del suero, en el hipocampo mantuvieron un comportamiento un poco más estable (Figuras 9b y d). MBOAT fue activo en las primeras etapas postisquemia, pero luego de los 7 días presentó una pérdida de enriquecimiento (Figura 9c). PEMT solo presentó actividad a los cuatro meses tanto en hipocampo como en suero (Figura 9k). PISD fue más activo en el hipocampo desde las 6 horas, pero luego de las 24 horas presento una pérdida de enriquecimiento, en el suero el enriquecimiento fue mucho menor (Figura 9e). Las enzimas del demás clúster presentaron comportamientos heterogéneos, PTDSS y CDIPT fueron más activas en etapas tardías (Figura 9g y h). En cambio, CDS fue más activa en hipocampo disminuyendo enriquecimiento a lo largo del tiempo (Figura 9f) y PLD también fue más activa en hipocampo desde 7 días, disminuyendo hasta los 4 meses (Figura 9j).

a.



bubble	cluster Id	gene count	protein names
●	Cluster 1	18	Lpcat1, Lpcat2, Lpcat3, Lpcat4, Mboat1, Mboat2, Pemt, Pisd, Pla2g4a, Pla2g4b, Pla2g4c, Pla2g4d, Pla2g4e, Pla2g4f, Pld1, Pld2, Ptdss1, Ptdss2
●	Cluster 2	4	Pla2g1b, Pla2g2a, Pla2g2d, Pla2g2f
●	Cluster 3	3	Cdipt, Cds1, Cds2
●	Cluster 4	1	Ptpmt1
●	Cluster 5	1	Pla2g2e

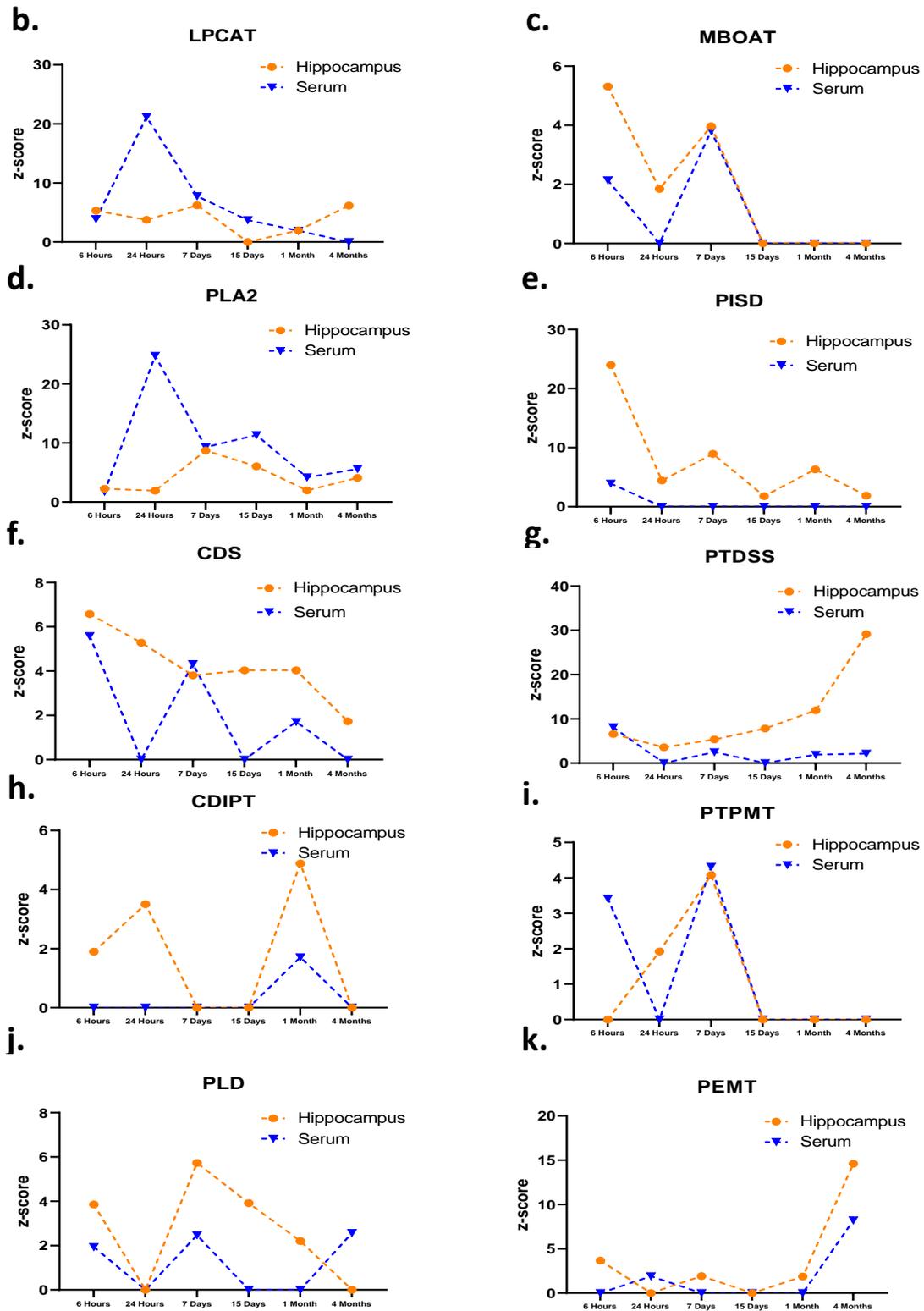


Figure 9. Genes asociados a la remodelación membranar. a. Red de clúster génicas por medio de un algoritmo de clasificación K-means. b-k. Combinación de análisis diferenciales t-studen y transformación a z-score. De forma predeterminada, BioPan calcula el valor P como el umbral de detección de las vías para que sea igual a 1,645. Para conocer el umbral de detección para el otro valor p se debe hacer el siguiente cálculo: $.05CDF^{-1}(1-Pvalue)$. ($p=0.1 z=1.282$) ($p=0.05 z=1.645$) ($p=0.02 z=2.054$) ($p=0.01 z=2.326$).

DISCUSIÓN

Este estudio presenta un análisis en un curso de tiempo de cambios en los perfiles de fosfolípidos en el hipocampo y el suero sanguíneo de ratas macho adultas sometidas a un evento isquémico inducido mediante el modelo de oclusión tMCAO. Inicialmente, se caracterizó el perfil de fosfolípidos en el tejido hipocampal y el suero sanguíneo además de la composición de las cadenas de los ácidos grasos, seguido se realizó la evaluación de los cambios temporales de estos perfiles en postisquemia. A través de análisis de correlación, se identificaron clases específicas de fosfolípidos asociadas al desempeño neurológico postisquémico. Además, mediante herramientas bioinformáticas, se describió cómo los cambios en los fosfolípidos postisquemia pueden reflejar el funcionamiento de algunos orgánulos membranosos mediados por cambios en las propiedades biofísicas de la membrana bajo remodelaciones fosfolipídicas inducidas por reacciones enzimáticas específicas. Estos hallazgos proporcionan una comprensión más profunda de las dinámicas membranales en el hipocampo y el suero sanguíneo después de un evento isquémico, permitiendo un enfoque lipidómico más interpretativo.

El hallazgo principal de la investigación muestra que el perfil fosfolipídico de hipocampo y suero presentan una relación inversa entre PC y LPC. Este cambio en la relación PC/LPC en el hipocampo, registra un aumento en la procesividad de PC a LPC desde las primeras horas hasta los 15 días postisquemia, seguido de una disminución en esta relación después del primer mes y una reducción marcada a los 4 meses. Este patrón temporal en el hipocampo coincidió con el aumento de la relación PC/LPC en el suero, el cual se intensificó hasta el primer mes y se mantuvo elevado hasta el cuarto mes postisquemia. Dichos cambios se correlacionaron con procesos agudos de inflamación, recuperación intrínseca en el estatus de patología neurológica al mes postisquemia, en concordancia con estudios previos (6,12); sin embargo, a los 3 meses posteriores a la recuperación se registró un empeoramiento tardío en el desempeño neurológico postisquemia. Dichos cambios específicos están relacionados al remodelamiento y generación de precursores de moléculas bioactivas que participan en la señalización celular proinflamatoria temprana, recuperación intermedia y pérdida de conectividad tardía. Sin embargo, se necesita más investigación para comprender

completamente los mecanismos subyacentes y validar la relevancia clínica en el contexto de infarto cerebral isquémico en humanos, debido a la fuerte sugerencia pronóstica y su valor en un tratamiento diferencial y preventivo.

Composición fosfolipídica hipocampal:

Las clases más abundantes de fosfolípidos presentes en el hipocampo fueron PC (47.9% mol), PE (21.2% mol), PS (11.06% mol), SM (8.09% mol), PI (3.2% mol), ePE (2.7% mol) y ePC (2.6% mol) (Figura 1a). Estos valores en orden de abundancia han sido reportados en varios estudios por diferentes técnicas de análisis incluidos estudios propios (6,7). En el estudio de lipidómica realizado por Jaewoo Choi et al en 2017 con ratas macho adultas se llevó a cabo un análisis comparativo entre diversos órganos (cerebro, hígado, riñón y corazón) donde se encontró que en general todos los tejidos mantienen una proporción similar de fosfolípidos siendo PE y PC los más abundantes con diferencias principalmente en la composición de ácidos grasos. El cerebro presentó el mayor porcentaje de lípidos con respecto al peso total siendo PE el más abundante (53.9 nmol/mg), cabe resaltar que en este estudio se sumó PE y sus plasminógenos en un único grupo. PC fue el segundo en abundancia (30.5 nmol/mg), tanto PS (7.78 nmol/mg), PI (5.13 nmol/mg) y PG (0.02 nmol/mg) mantuvieron una proporción similar a la que nosotros registramos (153). En otro estudio se describió la composición lipídica del cerebro completo de rata y ratón por medio de cromatografía de dos dimensiones en capa delgada, en los resultados se reportó una similitud en porcentaje de abundancia entre ambos modelos con pequeñas variaciones: PC (Rt 40% mol – Ms 37% mol), PE (Rt 36% mol – Ms 33% mol), PS (Rt 10% mol – Ms 14% mol), PI (Rt 6% mol – Ms 7% mol), PA (Rt 1% mol – Ms 3% mol) y SM (Rt 7% mol – Ms 4.5% mol), estos resultados corroboran las proporciones de los diversos fosfolípidos en el cerebro y similitud entre los modelos murinos (154). En un análisis en ratas Wistar se describió las proporciones de lípidos de cerebro completo y fracciones subcelulares en diferentes etapas de desarrollo. De forma general se identificaron a PC y PE como los PLs más abundantes, hasta los primeros 10 días PC mantuvo una proporción mayor que PE, pero luego del día 12 esta relación cambió hasta la etapa adulta (>100 días de desarrollo) siendo más abundante PE

(48.8 umol/g) que PC (42.8 umol/g). Los siguientes PLs en orden de abundancia fueron plasminógenos (26.5 umol/g), PS (13.8 umol/g), SM (7.16 umol/g), PI (6 umol/g) y cardiolipina (5.5 umol/g). En el estado posnatal la relación de colesterol y PLs totales fue de 0.32 (CE/PLs), la cual cambió en el estado adulto a 0.8 indicando una variación en las proporciones lipídicas en el desarrollo. Otra clase de PLs analizado en este estudio fueron los cerebrósidos, lo cuales fueron detectables desde el día 10 posnatal (0.18 umol/g) aumentando con el desarrollo hasta lograr una concentración de 22.2 umol/g en la etapa adulta. A nivel de fracciones subcelular la mielina fue la que presentó mayor abundancia lipídica tanto de colesterol, PLs y cerebrósidos, la segunda fracción con más abundancia fueron los microsomas, se resalta que la composición lipídica y relevancia de algunas clases van variando con el desarrollo y envejecimiento (155).

En el estudio titulado “**Regional lipid composition in the rat brain**” se buscó discernir la composición lipídica de varias regiones cerebrales (corteza frontal, ganglio basal, hipocampo, corteza entorrinal, medula oblonga y corteza cerebral) en ratas Wistar adultas. A grosso modo las regiones con más abundancia lipídica por gramo de muestra fueron la medula oblonga (111 mg/g) seguida del hipocampo (72.6 mg/g), las demás regiones presentaron abundancias similares que oscilaron entre 53.3 – 62.7 mg/g. En cuanto a los PLs, los más abundantes fueron PC y PE con un pequeño aumento de PC sobre PE excepto en la medula oblonga donde fue mayor PE (25.48 mg/g) que PC (20.22 mg/g). En el hipocampo PC (17.72 mg/g) y PE (17.1 mg/g) fueron los más abundantes seguidos de PS (5.34 mg/g), SM (2.08 mg/g) y PI (0.9 mg/g)(156). En los últimos años y gracias a los avances tecnológicos se ha logrado mejorar la resolución espacial para la identificación más detallada de la composición lipídica en diferentes tipos de muestras. En un estudio llevado a cabo en un modelo de ratón se utilizó la tecnología **Pressurized Liquid Extraction Surface Analysis (PLESA)** para determinar la composición lipídica de varias regiones del cerebro incluida el cerebelo, hipocampo, neocórtex, tálamo, septum basal del prosencéfalo y caudamen putado. En los resultados obtenidos se logra visualizar que todas las regiones mantienen una proporción en la composición de PLs con algunas diferencias, por ejemplo, el tálamo presentó una disminución significativa en la abundancia de PC (18% mol) con respecto a las demás regiones (>28% mol). La abundancia de los demás PLs se mantienen en proporciones molares similares. En cuanto al hipocampo las proporciones molares

encontradas en este modelo de ratón se ajusta en orden de abundancia a los registrados en nuestro análisis siendo PC el más abundante (33 % mol), seguido de PE (23 % mol), un aporte interesante de ePE (16 % mol) en comparación con el registrado por nosotros (2.7% mol), PS (13% mol), PI (5% mol), SM (2.5% mol) y en abundancias menores ePC, LPC, LPE, LPS, PA, PG y Cer (157). El hipocampo es una estructura cerebral que interviene en la cognición (aprendizaje y memoria) y en el procesamiento emocional. Se cree que estas funciones están reguladas diferencialmente por subregiones a lo largo del eje longitudinal del hipocampo, desde los polos dorsal a ventral en roedores, o desde los polos posterior a anterior en humanos, respectivamente (158). Además, se observó que nivel interno el hipocampo mantiene un alto grado de similitud entre sus tres regiones dorsal, intermedia y ventral, siendo la dorsal e intermedia más similares en comparación con la ventral. Las principales diferencias de la porción ventral están dadas por aumentos de PC, PE, SM, LPE y plasminógenos de etanolamina además de disminuciones en la abundancia de cerebrósidos (159).

En humanos, se han realizado varios estudios para determinar la composición lipídica cerebral. En búsqueda de determinar la composición normal del cerebro en 1865 Jhon O'Brien y Lois Sampson realizaron un estudio tomando muestras de corteza frontal en individuos clasificados como normales o sanos a diferentes edades (10 meses, 6 años, 9 años y 55 años). Es este estudio se determinó que la PE era el PL más abundante (10.5 %) seguido de PC (9.39 %) y en menor cantidad PS (3.98 %) y SM (2 %), también se determinó la distribución de estos fosfolípidos en porciones de materia gris, blanca y mielina, siendo la mielina la porción más enriquecida de lípidos incluyendo colesterol, y otros esfingolípidos como cerebrósidos y glucolípidos sulfatados (160). A gran escala, en un trabajo reciente de revisión llevado a cabo por Jong Hyuk Yoon y colaboradores, se generalizó la composición lipídica del cerebro completo de humanos determinando como la composición promedio de lípidos cerebrales en las siguientes proporciones CHO 30%, PC 33%, PE 16%, PS 6%, SM 6% y otros 9% (161). A nivel hipocampal, en humanos se describió que las proporciones de fosfolípidos de mayor abundancia son PC (40%), PE (34%), SM (10%), PS (6%) y PI(5%) (162).

Se ha descrito que la población celular del hipocampo es heterogénea (163,164). En los últimos años por medio de nuevas tecnologías de transcriptómica y genómica se ha buscado caracterizar las poblaciones celulares presentes en el hipocampo en diferentes modelos incluyendo a los humanos (158,163,165–169). Por medio de estos análisis, se ha logrado describir la variabilidad en tipos celulares, además de los cambios en composición en etapas de desarrollo y envejecimiento (165), según la región hipocampal (158) y en respuesta a enfermedad (164,168). Dentro de las poblaciones hipocampales identificadas se han descrito diversos tipos de neuronas (169), astrocitos (166), microglía (167), oligodendrocitos (170), células endoteliales, murales, entre otras (158,165,168). Todos estos tipos celulares se diferencian, caracterizan y clasifican según marcadores proteicos asociados y otras características morfológicas y funcionales, además se ha registrado que cada tipo celular y cada estructura membranal mantienen una composición lipídica distintiva (171). Todas estas variaciones hacen que los muestreos de tejidos y en especial del cerebro deban ser más rigurosos junto con la elección del método de análisis para obtener resultados con el detalle que se busca (171).

En conjunto, estos datos nos permiten interpretar que, tanto en modelos murinos rata y ratón como en humanos, el cerebro presenta un perfil lipídico basal con variaciones en algunas regiones y subregiones lo que depende directamente de la composición celular y estructural del tejido; además, que esta composición varía con el tiempo de desarrollo y envejecimiento de los individuos. Es importante destacar que la mayoría de los estudios mencionados se realizaron hace varios años, utilizando diferentes enfoques y métodos de análisis. Además, muchos de estos estudios no desglosan los lípidos a nivel de especie como se conocen actualmente, lo que podría explicar las variaciones entre los resultados obtenidos. Todo esto recalca la necesidad de consolidar y estandarizar los métodos de análisis e información lipídica para mejorar la interpretación y comparación entre estudios.

Composición fosfolipídica sérica:

En cuanto al suero, en nuestros resultados se muestra una clara diferencia entre el perfil fosfolipídico del suero con el del hipocampo caracterizada por la disminución o ausencia de

varias clases como PG (0.009% mol), PA (0.011% mol), PS (0.091% mol), ePE (0.06% mol), PE (0.5% mol), LPE (0.089% mol), PI (1.5% mol) y ePC (3.5% mol); por el contrario, se registra un aumento significativo de LPC (25.1% mol) que junto a PC (57.7% mol) y SM (12% mol) son las clases de fosfolípidos más abundantes en suero, estos últimos manteniendo un porcentaje molar similar al del hipocampo (Figura 1a). En ratas Wistar macho de dos meses se describió que la composición lipídica plasmática estaba enriquecida principalmente por PLs (125 mg/100 ml), seguida de TAG (68.4 mg/100 ml), ST (36.2 mg/100 ml), FFA (28.5 mg/100 ml) y FC (15.9 mg/100 ml)(172). Estas proporciones pueden variar dependiendo del estado, dieta y momento de toma de la muestra de los individuos. En cuanto a la composición de fosfolípidos en ratas se ha descrito una distribución de abundancia en PC (42.5%), seguido de LPC (17.12%), SM (13.8%), ePC (13.2%), Cer (4.4%), PE (3.8%) y en menor abundancia ePE (2.7%) y LPE (2.2%)(173), estos resultados presentan semejanza y respaldan a los encontrados en nuestros análisis. En otro estudio, se realizó un análisis comparativo de la composición de PLs de plasma sanguíneo en varias especies de mamíferos (gato, vaca, perro, cabra, cerdo de guinea, caballo, cerdo, conejo, rata y oveja), donde se encontró similitud en el porcentaje de la composición siendo PC el más abundante en todas las especies con un promedio de 70.1%. Tanto LPC y SM fueron los segundos PLs más abundantes en las muestras con variaciones en la relación. El LPC fue más abundante en comparación con SM en las muestras de cerdo de guinea (13.9% - 7.8%), conejo (20.3% - 6.7%) y rata (22.7% - 7.7%); por el contrario, SM fue más abundante en comparación con LPC en vaca (14.9% - 8.4%) y cabra (12.5% - 8.7%), en las demás especies las proporciones de LPC y SM fueron similares. En menor abundancia se registraron PE excepto en el cerdo de guinea con una abundancia de 21.7% por encima del promedio (2%) registrado en las demás especies; PI si presento una menor abundancia en todas las especies (174). En otras clases de animales no mamíferos como anfibios, reptiles, peces y aves se han registrado proporciones similares de estos PLs en plasma (175).

Por otra parte, en humanos se realizó un estudio para caracterizar la composición lipídica del tejido sanguíneo dividiéndola en las porciones de plasma, eritrocitos y componente plaquetario. El plasma fue la porción con mayor abundancia de lípidos, el ST tuvo una abundancia mucho mayor (213.3 mg/dL) en comparación con la de los eritrocitos (19.4 mg/dL) y plaquetas (20.13 mg/dL). Los TAG solo se reportaron en la porción plasmática

(121.6 mg/dL). La abundancia de PLs fue notablemente mayor en plasma (222 mg/dL) sobre 25 mg/dL en eritrocitos y 80.1 mg/dL en plaquetas. Al analizar la distribución de PLs se encontró que PC fue el más abundante en las tres porciones: plasma (70.96% total de PLs), eritrocitos (32% total de PLs) y plaquetas (34.7% total de PLs). La SM presentó abundancia un tanto similar: plasma (18.5% total de PLs), eritrocitos (25% total de PLs) y plaquetas (15.2% total de PLs). PE fue más abundante en las porciones celulares: eritrocitos (27.3% total de PLs) y plaquetas (22.6) en comparación con el 2.9 % total de PLs registrado en el plasma. Por último se analizó la abundancia de LPC la cual solo se reportó en la porción plasmática (7.7 % total de PLs) y PS solo reportado en las porciones celulares: eritrocitos (15.6% total de PLs) y plaquetaria (176). Estas proporciones de PLs en el plasma humano han sido confirmadas en otros estudios por diversos métodos de análisis (5,177–180).

El análisis de la distribución de lípidos en plasma o suero sanguíneo revela una mayor concentración en estructuras lipoproteicas en comparación con las estructuras vesiculares, según un artículo de revisión de Bendix Johnsen y colaboradores, se describió que existe un enriquecimiento de 10^{16} partículas HDL x ml de plasma, 10^{15} partículas LDL x ml de plasma, 10^{13} partículas CM x ml de plasma y tan solo 10^{10} partículas vesiculares x ml de plasma (181,182). Al revisar bibliografía sobre la composición fosfolípida de las diferentes lipoproteínas se encontró que en general están compuestas por PC, SM, LPC, PI y en algunos aumentos significativos de PE como el las VLDL. Las proporciones relativas de PC, SM y PI se distribuyeron similar en todo el grupo de lipoproteínas además no se detectaron o fueron muy bajas, LPC fue más abundante en las LDL seguido en las HDL (183). En cuanto a las vesículas extracelulares se ha descrito que son lipídicamente heterogéneas, los principales fosfolípidos descritos en vesículas de diferentes orígenes son la SM, PC, PS y PE (184,185) además de otras especies que son más variables como plasminógenos y lisofosfolípidos (186,187). En un estudio comparativo se analizó la composición de lipídica de EVs y lipoproteínas HDL y LDL encontrando un aumento significativo en la abundancia lipídica en las lipoproteínas en comparación con las EVs, pero al analizar los perfiles de composición relativa se describió que la mayoría de fosfolípidos analizados estaban presentes en los 3 grupos (188). Lo anterior, muestra que existe una composición lipídica basal en el suero o plasma sanguíneo la cual se ha mantenido a nivel evolutivo, además la mayor proporción de

los lípidos plasmáticos está asociados a estructuras lipoproteicas las cuales mantienen perfiles lipídicos específicos asociados a sus roles en el transporte de moléculas en el plasma.

Cambios en el perfil fosfolipídico postisquemia en hipocampo:

Al analizar tiempo a tiempo los cambios en la composición de los fosfolípidos en el hipocampo logramos visualizar variaciones significativas en clases específicas. En la etapa aguda postisquemia se generaron aumentos en la proporción molar de derivados de etanolamina como PE y ePE (Figura 1b – 6 hours), estos fosfolípidos hacen parte fundamental de las dinámicas de membrana y están implicados en cambios estructurales y biofísicos (20,50). La PE se ha visto involucrada en procesos específicos como la fusión de membranas en la formación de autofagosomas, regulando su curvatura y fluidez mejorando la lipidación mediada por LC3B (189,190). Las principales especies de PE que aumentaron estaban enriquecidas por PUFAs que variaron en la suma de sus cadenas desde los 38 hasta los 44 carbonos y sumas de insaturaciones desde los 4 hasta los 12 dobles enlaces (Figura S1a y Figura 2 - 6 hours) esto indica membranas con características más fluidas y móviles (38,44). La PE puede ser sintetizada por diferentes rutas metabólicas (191), al revisar las principales reacciones involucradas en estos cambios logramos visualizar que a las 6 horas las rutas más enriquecidas fueron en el cambio de PS a PE (Figura 8a), específicamente cargados con PUFAs como 42:9, 44:10, 36:1 y 38:4 (Figura S2a) lo cual teóricamente fue mediado por la actividad de la proteína *Phosphatidylserine Decarboxylase* codificada por el gen PISD el cual presentó un mayor enriquecimiento a las 6 horas (Figura 9e). En estudios anteriores se validó que la autofagia mediada por LC3B estaba implicada en la reducción de Tau hiperfosforilado y mejora cognitiva en un modelo de isquemia 2VO dentro los primeros 15 días postisquemia (192).

A parte de esto, la PE al ser un componente esencial y abundante del tejido nervioso actúa como fuente precursora de diversas moléculas con importancia bioactiva como los lisofosfolípidos y plasminógenos (193). Al revisar las proporciones entre los derivados de PE en el hipocampo solo se registró una variación significativa en la relación ePE/PE a los 7 días postisquemia (Figura 3a). Los plasminógenos de etanolamina y en general de otras

subclases de PLs difieren al presentar un ácido graso unido por un enlace vinilo-éter en la posición sn-1 del glicerol, esta variación le confiere al plasminógeno propiedades biofísicas y bioquímicas únicas que se han visto involucradas en el tráfico de membranas, formación de balsas lipídicas y cambios en la remodelación de membrana (194). Los plasmalógenos son abundantes en todo el cuerpo, en los seres humanos presenta niveles altos en el cerebro y el corazón y niveles más bajos en el hígado (195). En general, en nuestros resultados los plasminógenos registraron cambios a lo largo del tiempo postisquemia, en total presentaron una abundancia promedio en el hipocampo del 5.138% con abundancias similares de ePC (2.6% mol) y ePE (2.5% mol), y en menor abundancia ePS (0.038% mol) (Figura 1a). Tanto ePE y ePC presentaron participaciones notables en los diferentes tiempos postisquemia, esto les da un rol relevante en todos los procesos que preceden los daños generados en la oclusión y reperfusión. En estudios anteriores se evidenció disminuciones en ePC en el hipocampo a un mes postisquemia (6) en nuestros resultados registramos cambios significativos de ePC a nivel de clase a 7 días y 4 meses donde se registró una marcada disminución (Figura 1b), además de variaciones en especies específicas en los distintos tiempos (Figura S1). En general, las especies ePE presentaron una tendencia a aumentos en cambio las especies ePC presentaron mayor tendencia a la disminución.

Diversos estudios sugieren que cambios en la abundancia de plasminógenos pueden estar involucrados en alteraciones de estructuras membranosas como la mielina, deterioro de las sinapsis, apoptosis neuronal y neuroinflamación, lo que puede desencadenar alteraciones cognitivas (194,196). En procesos neurodegenerativos se ha asociado principalmente como compuestos protectores contra el estrés oxidativo y actividad del peroxisoma, pero su principal rol se le ha atribuido por tener propiedades únicas para la forma, organización y estructura de las biomembranas, lo que ahora se considera su característica más esencial. Además, se les atribuyen diversas funciones biológicas, incluyendo roles versátiles en varias vías de señalización (195,196). En estudios recientes se ha descrito que la maquinaria biosintética encargada de la síntesis de plasminógeno se encuentra localizada cerca a acoples de peroxisomas con LD (197). En un modelo murino de neurodegeneración se mostró que los ePLs derivados de células endoteliales tenían implicaciones en procesos vasculares y desarrollo de la enfermedad (198). En enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson se ha asociado a procesos de muerte celular como la ferroptosis (199). Sumado a esto, en

estudios anteriores se demostró que el silenciamiento de BACE1, responsable de iniciar la vía amiloidogénica en la enfermedad de Alzheimer conllevaba a una recuperación cognitiva asociada al restablecimiento de ePE y LPE en el hipocampo de ratones triple transgénicos para la enfermedad de Alzheimer (200). En conjunto esta información demuestra que los plasminógenos derivados de etanolamina y colina tienen un rol importante en procesos neurodegenerativos lo que los postula como potenciales indicadores de la salud cerebral y posibles targets terapéuticos.

Otros cambios importantes identificados en el hipocampo se presentaron después de los 7 días postisquemia, se generó un aumento significativo de PA, disminuciones de PI y PG y un aumento pronunciado de SM a un mes y 4 meses (Figura 1b). Entre los lípidos celulares, el PA es de vital importancia, ya que es un componente clave tanto en la síntesis de fosfolípidos como en la transmisión de señales como segundo mensajero lipídico. Se cree que su papel en la señalización ocurre mayormente debido a su capacidad para reclutar y/o activar proteínas específicas en compartimentos restringidos y en áreas submembranas definidas. Asimismo, debido a su geometría en forma de cono, el PA puede cambiar localmente la topología de la membrana, siendo crucial en eventos de tráfico de membranas, especialmente en las etapas de fusión y fisión, donde la remodelación de los lípidos es esencial (151). La principal función del PA incluyen la síntesis y homeostasis de fosfolípidos, lo que sugiere que perturbaciones en el metabolismo del PA podrían conducir a condiciones patológicas graves.

Los análisis de intercambio entre PA y los PLs directamente involucrados en su conversión (PS, PG y PI) mostraron variaciones a lo largo del tiempo mostrando que es un mecanismo relevante para los diversos procesos desencadenados en postisquemia (Figura 8a). Todos estos procesos de conversión están mediados por enzimas específicas; la conversión de PA a PI se regula por medio de la actividad de *CDP-diacylglycerol-inositol-3-phosphatidyltransferase* (CDIPT), esta enzima presenta un enriquecimiento de actividad en el hipocampo de a las 6 y 24 horas, y al mes postisquemia (Figura 9h). Curiosamente, aunque por bioinformática se registró este aumento de la conversión de PA > PI al mes postisquemia (Figura 8a), en este mismo tiempo fue cuando se registró una disminución significativa en la proporción molar de PI, esto podría indicar un aumento en la fosforilación involucrada en la señalización mediada por PI u otros procesos de degradación en postisquemia como la

degradación realizada por *Phospholipasa D* (PLD) la cual presento actividad significativa desde los 7 días hasta el mes postisquemia (Figura 9j) (201). Esta disminución ha sido reportada en otros tipos de neurodegeneración como en CADASIL y Alzheimer esporádico (202). El PI es un PL altamente involucrado en procesos de señalización celular, en diversos estudios se ha descrito que está asociado a procesos proinflamatorios principalmente regulados por la microglía (203). También se ha encontrado que tiene importantes roles en los procesos de vascularización, vasoconstricción y vasodilatación (204). Además de estar involucrado en procesos de tráfico membranal, acidificación de lisosomas y procesamiento de AB en enfermedad de Alzheimer (205). Dentro de las conversiones de PA como sustrato, el cambio a PG tiene importante relevancia ya que da el paso para la síntesis de cardiolipina la cual es vital en la función mitocondrial (151,206). Esta reacción presentó enriquecimientos a las 24 horas y aumento a los 7 días (Figura 8a), las principales especies identificadas fueron PA > PG (36:3), (32:0) y (34:1) (Figuras S2c, S2e). Las enzimas identificadas como mediadoras de esta reacción fueron la *Phosphatidate cytidyltransferase* (CDS) (Figura 9f) y *Phosphatidylglycerophosphatase and protein-tyrosine phosphatase 1* (PTPMT1) (Figura 9i). La PTPMT da el paso limitante en la conversión de PA a PG, esta enzima solo registró actividad en las primeras etapas de la postisquemia teniendo un pico de actividad a los 7 días. El PG presentó disminuciones significativas a los 15 días y a los 4 meses (Figura 1b) lo que se podría asociar a un poca producción o a la conversión de este en otros lípidos como la cardiolipina (207). Un proceso descrito que involucra estas reacciones y recambios son los procesos de mitofagia y autofagia mediados por las mitocondrias, desbalances en esto se han visto asociados a diversas enfermedades incluyendo enfermedades neurodegenerativas (190).

Otra clase fosfolipídica que tuvo participación en los cambios de los perfiles lipídicos postisquemia en el hipocampo fue la SM la cual presentó aumentos significativos al mes y 4 meses (Figura 1b). Como se mencionó, la SM es un PL que se encuentra presente en varias membranas biológicas, en el cerebro se enriquece en materia blanca, balsas lipídicas, botones sinápticos y tiene participación en la producción de VEs (208,209). El cerebro debe mantener un metabolismo homeostático en la producción y degradación de SM importante en procesos de mielinización y remielinización (210). A parte de la función estructural se ha descrito que la SM y en general los SLs tiene diversas funciones celulares como la proliferación, apoptosis, autofagia, inflamación, angiogénesis, senescencia o polarización (211). En los

últimos años, se ha descrito que el metabolismo de los SLs se ve comprometido en diversas enfermedades neurodegenerativas (140). En eventos postisquémicos, la SM puede tomar roles distintos en los diferentes eventos de la cascada isquémica, además se ha descrito que en eventos tardíos se han encontrado acumulaciones intracelulares de SM y derivados lo cual se asoció a lipotoxicidad y muerte celular (212). En general todos los cambios significativos identificados a lo largo del tiempo en los perfiles fosfolipídicos del hipocampo fueron heterogéneos y cada uno podría obedecer a los estados de la progresión postisquemia. Analizar detalladamente el comportamiento específico de cada clase podría generar información de mecanismos específicos, pero también podría prestarse para generar diversas interpretaciones, los fosfolípidos actúan como un conjunto de moléculas que se autorregulan por medio de vías metabólicas específicas (213) para lo cual es necesario empezar a generar interpretaciones tomando la participación de todos como un grupo.

Cambios en el perfil fosfolipídico postisquemia en suero:

En el suero, el cambio más relevante de forma longitudinal es la inversión que se comienza a generar por aumentos de especies de LPC y disminuciones de PC (Figura 1c). Cabe resaltar que en los animales sham esta relación en el tiempo tuvo un comportamiento similar pero menos exacerbado indicando que también es un mecanismo asociado al paso del tiempo. Esta relación de inversión en suero PC/LPC, ya había sido descrita por nuestro grupo a un mes postisquemia asociado a deterioro cognitivo y alteraciones en el CA1 del hipocampo caracterizado por acumulación de proteína de mielina, astrogliosis, aumento de COX-1 asociado a inflamación y pérdida de adhesión celular (6). Además, estas variaciones han sido observadas en otros tipos de enfermedades, como parte de mecanismos proinflamatorios, cáncer, reumatismo y enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson (214,215). Llamativamente, al analizar las relaciones de PC/LPC del suero y del hipocampo se visualiza una posible relación temporal. En el hipocampo desde las 6 horas se da un aumento en la procesividad de PC a LPC que se mantiene hasta los 15 días postisquemia, pero luego al mes esta relación decae hasta el 4to mes (Figura 4c). Al mismo tiempo en el suero (Figura 4d), desde las 6 horas postisquemia se comienza a notar un aumento en esta

relación que se intensifica a los 7 días hasta el mes donde gana significancia que se sostiene y exacerba en el 4to mes.

En el trabajo de Lifeng Zheng y colaboradores utilizaron un modelo de isquemia tMCAO en ratones a los cuales se les realizó lipidómica de la corteza cerebral a 1, 3, 7, 14 y 28 días postisquemia. El principal hallazgo que ellos reportan fue la fuerte correlación inversa en los niveles de PC (16:0/16:0) y LPC (16:0), la cual aumenta hasta los 14 días y se estabilizan a los 28 días, esto se asoció a procesos de recuperación postisquemia como disminución del volumen de infarto y recuperación de la condición cognitiva, lo cual concuerda con lo que nosotros registramos. Además, ellos evaluaron que con la inhibición de la fosfolipasa citosólica A2 (cPLA2) se lograba revertir esta relación postulando a esta enzima como un importante actor en este mecanismo (216). A pesar de que se ha descrito que la principal función de la actividad cPLA2 es la liberación de PUFAs (AA y DHA) con roles en vías de señalización pro y antiinflamatoria, en este estudio se sugiere que en principal FA liberado es el ácido palmítico (16:0). Cuando comparamos con nuestro estudio, de manera temprana la reacción de producción de LPC que más tuvo enriquecimiento fue el paso de PC (34:3) a LPC (18:3) indicando una liberación de (16:0) (Figura S2a) y en suero en este tiempo se registró un cambio de PC (36:5) a LPC (20:4) indicando liberación de ácido palmitoleico (16:1) (Figura S2b). En general los ácidos grasos más liberados a lo largo del estudio longitudinal tanto en hipocampo como en suero fueron 16:0 y 16:1 (Figuras 10l y 10m), a las 6 horas a parte de estos dos también se registró enriquecimiento en liberación de ácido docosatetraenoico (20:4) y ácido eicosapentainoico (22:5) en hipocampo.

La superfamilia de enzimas *Phospholipasa A2* (PLA2) hidroliza el enlace éster en la posición sn-2 de los fosfolípidos, generando un ácido graso libre y un lisofosfolípido (217). La actividad PLA2 está involucrada en procesos de remodelación de membrana como el ciclo de Lands, este ciclo describe un reciclaje de FAs mediado por el corte de PLA2 a un PL y la posterior unión de otro FA por el conjunto de enzimas liso-aciltransferasas como la *Lysophosphatidylcholine acyltransferase* (LPCAT) y *Membrane-bound O-acyltransferase domain-containing* (MBOAT). De manera interesante, nuestro estudio registró que la actividad PLA2 (Figuras 11d) y LPCAT (Figura 9a) presentaron comportamientos similares a lo largo del tiempo tanto en el hipocampo como en el suero, lo que sugiere que el ciclo de

Lands es un proceso que opera de manera simultánea. En suero, estos genes fueron los que mayor enriquecimiento registraron, presentando un aumento notorio a las 24 horas el cual fue disminuyendo hasta los 4 meses. Por otra parte, MBOAT tuvo un enriquecimiento menor pero también registró mayor actividad en las etapas más tempranas (Figura 9c). De igual forma que el hipocampo, los FA más liberados por este mecanismo en suero fueron (16:0) y (16:1), por el contrario, tanto en el hipocampo como el suero los FAs más recaptados fueron ácido araquídico (20:0), ácido eicosapentainoico (22:5) y ácido docosahexaenoico (22:6) (Figura 8l y 8m). En estudios anteriores, se demostró que la depleción de BACE1 y SCD1 en ratas isquémicas podría prevenir el aumento de cPLA2, lo que se asoció a una reducción en acumulación de lípidos proinflamatorios en el cerebro y aclaramiento de especies lipídicas adversas en circulación, lo que apoyó la recuperación neurológica (218). Esta información apoya que los procesos de remodelación de membrana y en especial mecanismos como el ciclo de Lands, son reacciones de importancia en los procesos celulares llevados a cabo en el cerebro en eventos postisquemia, hace falta más investigación para dilucidar la relevancia en las diferentes etapas de la cascada isquémica.

Al momento en que la PC es convertida en LPC se genera un cambio estructural en la membrana lipídica, este proceso se ha asociado a aumento en la diversidad de dinámicas membranales (219,220). La remodelación entre tipos de fosfolípidos ayuda a establecer las curvaturas necesarias para la formación de las diferentes estructuras ya que cada especie de fosfolípido favorece una curvatura diferente según su geometría (221). Se ha descrito que aumentos en LPC, LPA, LPS y LPE favorecen una curvatura positiva, mientras que DAG, EC, PA y PE favorecen una curvatura negativa. Otras especies sin embargo son "neutras" y no favorecen ningún tipo de curvatura, como la PC y la PS (13,37,222). La conversión PC > LPC se ha descrito como un mecanismo activo en la formación de lipid droplets (LDs) donde se necesita que una de las capas de fosfolípidos adquiriera una curvatura positiva para la acumulación de lípidos neutros como TAG y CEs (29,222,223).

Se ha descrito que las LDs tienen diversas funciones, a nivel cerebral se han asociado principalmente a procesos de almacenamiento de antioxidantes, neutralización y eliminación de lípidos peroxidados (100,224). En eventos neurodegenerativos se ha identificado un aumento de LDs intracelulares en varios tipos celulares (225,226). Además que las

acumulaciones lipídicas en el cerebro ha sido una marca asociada con el envejecimiento y desarrollo de patologías como el Alzheimer (2). En un modelo de ratón tMCAO, se analizó de forma longitudinal a 3, 7, 14 y 30 días la formación de LD donde se encontró que en la etapa aguda se da una acumulación de LD principalmente en células microgliales, las LDs se mantuvieron a los 14 días después de la MCAO, pero empezaron a disminuir hasta ser casi indetectables a los 30 días postisquemia (227). Un hallazgo interesante fue que varias LDs comenzaron a encontrarse fuera de las células Iba1+ desde los 14 días. Ellos sugieren que las LDs se estaban acumulando en otros tipos de células o siendo transportadas desde la microglía hacia células adyacentes. Todo este proceso fue asociado con el tiempo de recuperación postisquemia (227), este periodo de tiempo concuerda con los aumentos de la procesividad de PC a LPC lo que se podría asociar a una mayor producción de LDs como un mecanismo de recuperación postisquemia. Recientemente se ha descrito que las principales vías que contrarrestan las consecuencias negativas de la isquemia-reperusión son la autofagia y el metabolismo de las ILDs (228).

Luego de la muerte celular generada en el evento isquémico, todo el material celular liberado debe ser fagocitado para su neutralización o eliminación, en estudios previos se ha destacado la importancia de la eliminación de restos membranosos especialmente de cargos mielina para prevenir el aumento de citotoxicidad y promover la regeneración del sistema (229,230). En algunos estudios se ha demostrado que la desmielinización es un proceso marcado en eventos postisquemia (231) y que los procesos de desmielinización se pueden generar en regiones que no fueron afectadas directamente por la isquemia (232). Se ha descrito que la microglía es la célula fagocítica del cerebro aunque se ha demostrado que los astrocitos tienen también esta capacidad (229). En un modelo de isquemia pMCAO se reportó un aumento de la fagocitosis en los primeros 7 días postisquemia por parte de células mieloides (233). Luego de los proceso de fagocitosis se ha reportado la acumulación de LDs en diferentes tipos de células (227,234–236). En particular, las células microgliales expresaron un perfil diferencial de genes luego de la fagocitosis enriquecidos en metabolismo de lípidos, formación de LDs, transporte de lípidos y metabolismo del CHO (237). En un modelo de isquemia global se analizó de manera longitudinal la composición celular del hipocampo mostrando muerte neuronal en el CA1 de manera progresiva desde las 6 horas hasta los 6 meses. Sumado a esto, se registró un aumento de población microglial que inicia a las 24

horas y aumenta gradualmente hasta los 7 días y luego disminuye hasta los 6 meses. Por otro lado, el número de astrocitos se ve un poco disminuido a las 6 horas, pero luego es estable hasta los 7 días. Pasado el mes, los astrocitos aumentan significativamente y se sostienen hasta los 6 meses pero presentando morfología hiperreactiva (238).

Las LDs pueden ser metabolizadas por mecanismos como la lipólisis, lipofagia o autofagia. En diversos estudios se ha evidenciado un aumento en marcadores de autofagia como LC3B y colocalización con LDs indicado activación de procesos de lipólisis (227,239,240). Las LDs ricas en TAG podrían usarse más fácilmente en gasto energético que LDs ricas en CHO (239). La lipofagia conduce a la hidrólisis del éster de CHO (CE), aumentando la secreción de colesterol libre (FC), el cual no puede ser metabolizado o usado como fuente de energía, por lo que se hace necesario su eliminación por medio de transportadores específicos o vías de exocitosis no convencionales (241). Se ha descrito que el CHO puede ser eliminado desde el parénquima hacia la periferia por medio de la lipidación en lipoproteínas HDL y salida por procesos de transcitosis por la *blood-brain barrier* (BBB) y la *blood-CSF barrier* (BCSFB)(242). Aunque hasta el momento no se ha evaluado este mecanismo en post isquemia, se podría asociar que, luego del evento isquémico y la generación de muerte celular principalmente de neuronas es necesario activar procesos de limpieza donde todos los restos celulares son fagocitados y posteriormente metabolizados por procesos de fagia celular (228,243). Los lípidos al ser moléculas no solubles necesitan ser almacenados en estructuras como las LDs para su correcta gestión dentro de las células. El CHO y otros productos de desecho que no pueden ser metabolizados y fueron almacenados en LDs en el parénquima durante las primeras etapas postisquemia podrían ser transportados y liberados por diversos mecanismos hacia la periferia, lo cual podría verse reflejado en el suero sanguíneo. Un posible mecanismo involucrado en este proceso es el transporte de lípidos mediado por partículas HDL, que mantienen una conexión con el sistema periférico. Este mecanismo ha ganado importancia en los últimos años debido a su implicación en el desarrollo de diversas enfermedades neurodegenerativas, especialmente en la enfermedad de Alzheimer. (242). Toda la información presentada recrea este proceso como un evento activo hasta el primer mes postisquemia, de manera novedosa nosotros registramos que pasado este tiempo se genera una disminución en el procesamiento de PC a LPC en el hipocampo (Figura 4c) pero se presenta un aumento de la inversión en el suero de manera exacerbada (Figura 4d).

A parte de la actividad PLA2, se han involucrado otros mecanismos para la producción LPC como la esterificación de colesterol libre. Esta reacción está mediada principalmente por la enzima *lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT)* la cual toma un ácido graso de la posición sn-2 de la PC y lo esterifica al CHO generando CE y LPC. Este proceso se ha descrito como paso fundamental en la maduración de partículas HDL plasmáticas además que favorece el transporte del colesterol al aumentar su polaridad y mejorar su empaquetamiento y transporte (244). En el cerebro la actividad LCAT se ha descrito principalmente en células gliales como astrocitos y microglía, y toma roles fundamentales en la formación de lipoproteínas y el transporte lipídico cerebral (245). Esta reacción podría explicar el aumento generado de LPC en suero en la etapa tardía, además de estar ligado al proceso de eliminación de colesterol desde el parénquima a la periferia.

Correlación de clases lipídicas con el desempeño neurológico postisquemia:

Los resultados del desempeño motor registrado en este estudio permiten evidenciar las diferentes etapas de la cascada postisquemia, nos muestran como con el paso del tiempo se genera una recuperación inicial, luego una estabilización y una recaída tardía (Figura 5a). Esto ha sido reportado en varios análisis, los procesos de recuperación postisquemia dependen de la gravedad del insulto primario, entre mayor sea el daño generado por la oclusión menor pronóstico de recuperación tendrá el individuo. Además si no se generan intervenciones terapéuticas tempranas que apoyen la recuperación del tejido se generarán conexiones sinápticas y vasculares aberrantes lo que desencadena daños posteriores ya sea por la presencia de nuevos ictus (ictus a repetición) o acumulación de toxinas en el parénquima cerebral (246,247). Al asociar de manera genérica el desempeño neurológico con lo discutido anteriormente podríamos interpretar que existe una asociación entre los mecanismos descritos de limpieza con la recuperación en las etapas agudas, y los cambios exacerbados en los perfiles fosfolipídicos tardíos con la recaída neurológica presentada por los animales a los 4 meses. El análisis de correlación nos permite identificar que clases de fosfolípidos (por aumento o disminución) fueron los más asociados a las variaciones en el score neurológico. Este abordaje genera un acercamiento en la identificación de posibles

perfiles que puedan ser utilizados como biomarcadores asociados al estado cerebral. Se logra rescatar la importancia de clases lipídicas que fueron significativas en los anteriores análisis, en el hipocampo de manera longitudinal las clases lipídicas más asociadas a la disminución de score neurológico fueron PE y PI, y asociadas con recuperación fueron PS y ePE. Otras clases tuvieron relevancia en ambos estados como LPE, LPC y PA, algo importante para rescatar es que las ceramidas a pesar de ser la clase lipídica con menor abundancia molar presentaron relevancia en la etapa hiperaguda (6 horas) postisquemia. (Figura 5d - Hippocampus). Por otro lado, en el suero se remarca la importancia de la asociación con LPC y PC los cuales ganaron relevancia en varios estados postisquemia además de la SM, ePE y PI (Figura 5d - Serum).

Interpretación lipidómica basada en abordaje bioinformático:

Los análisis bioinformáticos del comportamiento de los lípidos respecto a su control, permite generar interpretaciones un poco más allá de lo netamente estadístico. En los últimos años la lipidómica ha tomado gran protagonismo en diversas ramas de investigación, genera amplias bases de datos para las cuales ha sido necesario la creación de herramientas como LipidSig, LIONWeb y BioPAN, estas permiten organizar, visualizar e interpretar los datos en otros tipos de niveles.

- **Acercamiento celular:**

Inicialmente a nivel celular los cambios lipídicos se pueden asociar dependiendo del perfil lipídico que presente, cada población celular y cada orgánulo membranoso mantienen un perfil lipídico basal. En la revisión llevada a cabo por Doralicia Casares y colaboradores (39) se describe de manera general la composición fosfolipídica de las principales organelas celulares, a pesar de estar compuestas por las mismas clases sus proporciones varían notablemente, además existen organelas como la mitocondria que presentan lípidos casi exclusivos como la cardiolipina (207). Teniendo en cuenta esto, nuestro estudio nos permitió

visualizar como se asociaba los cambios fosfolipídicos con el comportamiento de algunas organelas y funciones celulares a lo largo del estudio longitudinal. Tanto la mitocondria, retículo plasmático, membrana plasmática y señalización mediada por lípidos presentaron variaciones a lo largo del tiempo (Figura 6). A pesar de que estos acercamientos pueden ser un poco ambiguos y generar varios tipos de interpretaciones, brindan una guía para enfocar futuros análisis y apoyar los abordajes diagnósticos y terapéuticos. Una gran limitante es que el análisis indica que existe un enriquecimiento, pero no específicamente asociada a que proceso específico. Por literatura se ha descrito que cada organela presenta una afectación en eventos postisquémico, además existen cambios en el metabolismo de los lípidos que son exclusivos de una ubicación celular (248,249). El estrés mitocondrial y el estrés del retículo son mecanismos altamente descritos en procesos isquémicos y otras enfermedades neurodegenerativas (250). La mitocondria es una organela susceptible a los eventos de hipoxia, fallas bioenergéticas, aumentos de ROS y desbalances de calcio (251). En eventos de perfusión reperusión se ha evidenciado reactividad mitocondrial en el hemisferio alterado en búsqueda de balancear los procesos energéticos y metabólicos, además que la energía producida por la mitocondria es necesaria para llevar a cabo todos los procesos de reconexión sináptica y de vasodilatación en el cerebro (252). En modelos de arresto cardiaco se ha evidenciado que las mitocondrias cerebrales son las más sensibles a la hipoxia en comparación con las presentes en otros órganos, además que presentaron cambios asociados el metabolismo y remodelación de PLs (253). En nuestro resultado evidenciamos que en el hipocampo los cambios lipídicos asociados a la mitocondria presentaron enriquecimientos en las etapas de recuperación lo cual disminuyó pasados los 15 días (Figura 6a). En estudios recientes se ha demostrado que existe una relación de acople entre las mitocondrias y LD donde se generan procesos de lipofagia por medio de oxidación de ácidos grasos para la generación de energía (254).

Por otra parte, en el suero, los cambios lipídicos asociados a la mitocondria mostraron variaciones a lo largo del tiempo siendo más enriquecidos en etapas tempranas y al mes postisquemia (Figura 6a). En estudios recientes se encontró variaciones en plasma del contenido de EVs posteriores a un evento cerebral traumático, al analizar marcadores celulares específicos se encontró un aumento de exosomas derivados de células macrófagos/microglía y astrocitos en la etapa aguda y subaguda del evento. Además uno de

los principales marcadores identificados fue un aumento de ADN mitocondrial y curiosamente un aumento de apolipoproteínas como ApoB, ApoA1, ApoA2, ApoC2 y ApoC3 (255). Las EVs, liberadas de forma ubicua por prácticamente todos los tipos de células, incluidas las específicas del cerebro, pueden atravesar la barrera hematoencefálica, proteger su carga y rastrear hasta su origen celular, lo que las convierte en una fuente potencialmente rica de biomarcadores adecuados.

El retículo endoplásmico (RE) es el principal orgánulo responsable de la síntesis de proteínas, el tráfico celular y el mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular. La respuesta al estrés del RE se desencadena cuando esta homeostasis se altera. En eventos isquémicos se ha evidenciado que se activa la respuesta proteica desplegada (*Unfolded protein response* - UPR), que se considera un mecanismo de protección en etapas agudas postisquemia. La UPR se activa en respuesta a una acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas en el lumen del retículo endoplásmico. La capacidad de la UPR para balancear entre la supervivencia y la apoptosis subraya su papel crítico en la homeostasis celular y en la respuesta al estrés (256). Para disminuir la respuesta al estrés el RE necesita regular los balances de Ca^{+} , en diversos estudios se ha evidenciado que la señalización mediada por PI es necesaria para llevar a cabo toda esta regulación, los PI pueden actuar como moléculas de señalización y asociarse a diversas proteínas para generar la regulación del Ca^{+} (257,258). En nuestros resultados en el hipocampo el cambio de fosfolípidos asociado del RE presentó enriquecimiento a las primeras horas postisquemia con disminución sostenida desde los 7 días (Figura 6b). Por el contrario, en el suero se presentó un enriquecimiento desde las 24 horas hasta el mes postisquemia, el RE es fundamental para la formación y exocitosis de EVs (259) además para el empaquetamiento y formación de lipoproteínas (260) lo cual podría verse reflejado en el suero sanguíneo como respuesta a los procesos celulares.

Las modificaciones en la membrana plasmática y la señalización mediada por lípidos presentaron variaciones en los enriquecimientos y diferencias entre el hipocampo y el suero, se resalta que en suero fueron activas a lo largo del estudio excepto por una disminución en el enriquecimiento de la membrana plasmática a los 7 días (Figura 6c) de resto presentaron una tendencia al aumento hasta los 4 meses. Esto podría asociarse a los procesos anteriormente mencionados que median el transporte de cargos en estructuras lipídicas,

además de la señalización mediada por la liberación de FA y generación de LPs . Por otra parte, en el hipocampo los cambios asociados a membrana plasmática fueron más enriquecidos en las etapas sub agudas y crónica lo que se podría asociar a modificaciones en las membranas para la formación y restauración de nuevas conexiones sinápticas y procesos de angiogénesis (261). La señalización mediada por lípidos en el hipocampo (Figura 6d) fue variada y solo presentó disminuciones a las 24 horas y al mes postisquemia, su mayor enriquecimiento estuvo en la etapa subaguda donde los animales lograron restablecer el rendimiento neurológico. Toda esta información se vuelve relevante a la hora de analizar y generar interpretaciones más específicas de los cambios asociados a variaciones en los perfiles de fosfolípidos en alguna condición específica. Hace falta aumentar la información sobre como variaciones en lípidos pueden ser específicas de una organela o hasta de una población celular en particular. Esta información mejoraría la comprensión que tenemos sobre los perfiles lipídicos además de lograr identificar procedencias.

- **Acercamiento biofísico:**

Otro nivel de interpretación que se puede abordar basado en los perfiles lipídicos es como la variación en su composición interviene en las características biofísicas de las membranas. De manera virtual se puede ir generando información teórica sobre el comportamiento biofísico de las membranas ante eventos específicos. Los cambios en la biofísica de las membranas han tomado gran interés en los últimos años, están directamente relacionadas en modificaciones estructurales como la curvatura, el grosor, difusión, carga eléctrica y adaptaciones a los cambios en temperatura. Algo interesante de nuestros hallazgos es que casi todas las características mostraban un balance en sus amplitudes (Figura 7). Anteriormente se pensaba que los lípidos estaban mezclados de formas aleatorias y no mantenían algún tipo de orden, luego del descubrimiento de estados fluidos y los micro dominios membranales se ha entendido que los lípidos mantienen una composición y un “orden” que se adapta a las condiciones del ambiente (31,42,58). Al analizar las características se evidencia que el suero fue el que presentó más variaciones en las simetrías y amplitudes de los enriquecimientos. Cabe resaltar que estas características son emergentes

y se presentan de manera simultánea en las membranas. Es así que, cambios en la curvatura de la membrana pueden influenciar sobre la difusión y al mismo tiempo sobre su grosor. Todas estas características se han visto como eventos o consecuencias pasivas de los procesos celulares, pero los avances en investigación han mostrado que son características necesarias para realizar ciertas funciones y que existen todo un conjunto de proteínas encargadas para mediar estos cambios (42,50,61). Directamente la composición de lípidos de membrana influye en estas características, como evidenciamos anteriormente cambios en el procesamiento de PLs por medio de la actividad PLA2 pueden generar curvaturas positivas necesarias para la formación de estructuras como las LDs. Los cambios en la curvatura están asociados a todos los procesos que necesiten modificaciones de membrana incluido, movilidad, fagocitosis, crecimiento, división, entre otros. En nuestros resultados evidenciamos diferencias notorias en los cambios en la curvatura, en el hipocampo las curvaturas se mantuvieron más estables con tendencia a estados más neutros (Figura 7a), en el suero luego de los 7 días se generaron enriquecimientos hacia membranas más curvas principalmente positivas (Figura 7a), podríamos asociar esto con un aumento de partículas lipoproteicas y/o vesiculares presentes en el suero.

El grosor de la membrana es una característica que está directamente relacionada con la composición de FAs, su número de carbonos y número de saturaciones. En teoría, al tener FAs con más carbonos y menos saturaciones se tendría un grosor mayor, esto aumenta el área y distancia hidrofóbica de la bicapa modulando procesos de difusión y el establecimiento de proteínas (262,263). El grado de difusión es importante para el balance celular, además de estar relacionado con la longitud de los FAs también depende del número de insaturaciones. A pesar que existen varios canales específicos para iones, la membrana puede permitir el transporte de moléculas más pequeñas como gases (264). En nuestros resultados el comportamiento de la difusión presentó tendencia al desplazamiento a membranas con una difusión baja dentro los primeros 15 días tanto en hipocampo como en plasma. Probablemente en el hipocampo, las células buscan regular la entrada de moléculas de oxígeno y agua como mecanismo protector evitando los daños generados por la reperfusión, aumentos de ROS y formación de edemas, los cambios en la difusión celular han sido asociados principalmente al funcionamiento de canales membranales como la bomba Na^+/K^+ ATPasa (265). Novedosamente mostramos como los cambios en los perfiles lipídicos postisquemia podrían

estar involucrados en las variaciones de esta característica en las diferentes etapas postisquemia. Curiosamente al mes postisquemia, se da una inversión en el enriquecimiento de la difusión hacia una difusión más alta en el hipocampo lo que se mantuvo a los 4 meses, en cambio en el suero se mantuvo hacia valores de baja difusión (Figura 7d).

Otra característica biofísica evaluada que depende de la composición de FAs es la temperatura, en eventos isquémicos la temperatura cerebral es un tema que se ha abordado desde hace mucho tiempo. En diversos estudios se ha demostrado que posterior a un evento isquémico se genera aumentos en la temperatura cerebral y corporal lo cual se ha asociado principalmente a estados inflamatorios (266). La hipotermia cerebral inducida en eventos postisquémicos es un mecanismo médico que puede reducir los daños tisulares al estar asociado con la disminución de los estados inflamatorios, pero en diversos estudios se ha abordado la respuesta clínica de los pacientes con ictus agudo a estados de hipotermia e hipertermia dando diversos resultados, a pesar de esto no existe evidencia clínica clara que demuestre como controlar la temperatura podría mejorar o empeorar la respuesta al daño generado en el evento isquémico (267). Las membranas biológicas son susceptibles a los cambios de temperatura del ambiente, las modificaciones en la composición lipídica para adaptarse al ambiente y mantener los procesos biológicos se ha conservado a lo largo de la escala biológica (268). Las membranas en temperaturas bajas tienden a perder fluidez lo que genera estados más rígidos por lo cual se modifican las saturaciones de FAs lo que les permite adaptarse y ganar fluidez, por el contrario en condiciones de temperaturas más elevadas las membranas contrarrestan esto con modificaciones y aumento de FAs saturados lo que aporta mayor rigidez (269). Los mamíferos mantienen una temperatura corporal constante la cual regulan por medio de gasto energético en el tejido adiposo, se ha evidenciado que los cambios en la temperatura están directamente relacionados con la formación de LDs, lipofagia y metabolismo lipídico (270), además en eventos de estrés térmico se genera un aumento de la concentración de LDs intracelulares y las variaciones en la temperatura pueden modificar su forma y tamaño (271). En nuestros resultados se evidenció cambios fosfolipídicos asociados a aumentos de temperatura a las primeras horas postisquemia, luego de las 24 horas se generaron variaciones tanto en el hipocampo como en el suero (Figura 9e). Estos resultados remarcan la importancia de la temperatura en las modificaciones fosfolipídicas, en eventos postisquemia la temperatura juega un rol importante en el comportamiento de las membranas

celulares, además de estar involucrado en procesos de almacenamiento y transporte de cargos lipídicos. Ampliar el conocimiento de cómo la temperatura tiene efecto en la composición de lípidos en suero provenientes del cerebro podría ser una herramienta valiosa para conocer el estado y tener un mejor pronóstico en la recuperación.

Los fosfolípidos de membrana mantienen una carga fisicoquímica que interactúa constantemente con las condiciones del ambiente donde se encuentran. Esta carga depende directamente de la composición de las cabezas polares y el área hidrofóbica contenida en la bicapa (36). En el cerebro la composición y carga de las membranas son fundamentales para procesos como la transmisión sináptica y producción energética mitocondrial (272). Curiosamente esta característica mostró patrones muy simétricos en cuanto enriquecimientos de cargas positivas y negativas a lo largo del tiempo tanto en hipocampo como en suero (Figura 9c), esto podría indicar que las membranas siempre mantienen un balance de carga lo cual regulan por medio de remodelaciones en los PLs. En enfermedades neurodegenerativas esta característica se ha visto asociada principalmente a las interacciones que ejerce la superficie de las membranas sobre el plegamiento de proteínas. Las variaciones en la carga pueden generar mal plegamiento en proteínas y posteriores acumulaciones las cuales son característica de varias enfermedades clasificadas como proteinopatías (273). En isquemia otras alteraciones asociadas a cambios en el carga membranal se han involucrado con el flujo y la distribución de iones y agua que conducen a hinchazón y edema celular, y defectos físicos en la integridad de la membrana en células gravemente dañadas (274).

Actualmente, estos acercamientos biofísicos podrían tomarse como un apoyo de entendimiento sobre qué está pasando con el conjunto de lípidos bajo diferentes estímulos. Comprender los mecanismos subyacentes a los efectos de las propiedades de las membranas biológicas en los procesos celulares podría arrojar datos sobre el desarrollo de nuevas estrategias preventivas y terapéuticas para el abordaje de distintas enfermedades. Perspectivas futuras incluyen la necesidad de profundizar en la comprensión de los mecanismos específicos que regulan estas características e identificar intervenciones terapéuticas que puedan mejorar la progresión y el pronóstico de la lesión miocárdica. Además, investigar los cambios en la composición de la bicapa de fosfolípidos podría ofrecer

nuevas estrategias para preservar la integridad celular y mejorar los resultados clínicos en pacientes con enfermedades isquémicas y neurodegenerativas.

- **Acercamiento por reacciones enzimáticas:**

Por último, uno de los niveles de acercamiento bioinformático que están directamente asociados con los cambios en los perfiles lipídicos son las posibles reacciones que se presentaron entre ellos y las enzimas teóricamente involucrados en esos cambios. Como lo fuimos abordando en la discusión, esta información fue un poco más fácil de asociar ante los cambios que se iban generando tiempo a tiempo en los perfiles lipídicos. Todas las rutas identificadas están asociadas a la remodelación de membranas, específicamente a la remodelación de PLs. La remodelación de PLs de membrana es crucial para la funcionalidad y la integridad de las células. Este proceso dinámico permite a las células adaptar su composición lipídica en respuesta a diversos estímulos fisiológicos y patológicos, asegurando así una correcta señalización celular, transporte de nutrientes y mantenimiento de la homeostasis. En particular, la remodelación de fosfolípidos juega un papel fundamental en la respuesta a lesiones y estrés celular, contribuyendo a la reparación de la membrana y la regulación de procesos como fagocitosis, autofagia y apoptosis. Además, alteraciones en la remodelación de fosfolípidos se han asociado con diversas enfermedades, incluidas las cardiovasculares y neurodegenerativas (150). Por lo tanto, comprender los mecanismos que subyacen a este proceso ofrece perspectivas prometedoras para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, enfocadas en restaurar la composición y funcionalidad de las membranas celulares afectadas. En la **Figura suplementaria 2** podemos visualizar cuales fueron las principales reacciones asociadas al remodelamiento de PLs en postisquemia tanto en el hipocampo como en el suero. En la **Figura 10** se resumen como fue el comportamiento a lo largo del tiempo y se destaca que el hipocampo presentó un nivel más complejo de reacciones en comparación con lo registrado en suero. Es necesario tener en cuenta que muchas de estas reacciones dependen de una anterior o en ocasiones forman un bucle de cambio como es el paso de PA > PS > PE > PC > PA, cualquier alteración en alguno de estos pasos podrían desencadenar una cascada de alteraciones que aumentarían los desbalances fosfolipídicos.

Los acercamientos bioinformáticos nos permitieron dilucidar las principales enzimas encargadas de la remodelación de PLs y como fueron sus comportamientos a lo largo de los eventos postisquemia. Nuestros resultados han identificado un conjunto de enzimas involucradas en la remodelación de fosfolípidos, destacando su relevancia en procesos neurodegenerativos. Mediante el uso de la herramienta STRING, generamos una red de asociación que permitió clasificar estas enzimas en cinco clústeres según sus interacciones (Figura 11a). El clúster número uno, que mostró la mayor abundancia de enzimas, incluía diferentes isoformas de LPCAT, MBOAT, PLA2, además de PEMT y PISD. Este análisis sugiere que estas enzimas desempeñan un papel crucial en la remodelación de fosfolípidos tanto en el suero como en el hipocampo, lo que podría tener implicaciones importantes para la comprensión de los eventos subyacentes a la cascada postisquemia. Las enzimas PLA2 (Figura 11d) y LPCAT (Figura 11b), pertenecientes al clúster número uno, presentaron un comportamiento similar, siendo altamente activas en la modificación de PLs en el suero, mientras que en el hipocampo su actividad fue más estable. Este hallazgo sugiere que estas enzimas podrían estar modulando la composición lipídica en respuesta a la isquemia, contribuyendo a la homeostasis de la membrana celular y apoyando mecanismos de limpieza y reparación. En algunos estudios se han relacionado como componentes activos de la homeostasis fisiológica y en procesos de neurodegeneración y progresión de otras enfermedades (150). La enzima MBOAT mostró una actividad significativa en las etapas iniciales postisquemia, pero su enriquecimiento disminuyó después de los siete días, lo que indica su participación en la respuesta temprana al daño isquémico. En conjunto estas enzimas hacen parte del mecanismo de remodelación de PLs conocido como ciclo de Lands, como se ha venido mencionando en estudios propios (6,218) y de otros investigadores (12) esta reacción ya había sido descrita como un actor en los cambios generados en el hipocampo en eventos postisquemia. Nuestro abordaje nos permite validar y afianzar el conocimiento generado en los estudios anteriores, además de afianzar no solo su papel como respuesta a procesos inflamatorios y liberación de moléculas bioactivas sino también con un rol de importancia en las modificaciones estructurales de la membrana.

Por otro lado, enzimas como la PEMT (Figura 11k) mostró actividad únicamente a los cuatro meses tanto en el hipocampo como en el suero, lo que podría estar relacionado con procesos de reparación/recaída tardía. Esta enzima es la encargada de llevar a cabo la biosíntesis de

colina siendo la única vía endógena en los mamíferos, lo que sugiere, que la desregulación de la PEMT podría provocar un desequilibrio en el metabolismo de los PLs principalmente de PC (275). En contraste la enzima PISD, fue más activa en el hipocampo desde las primeras horas postisquemia, aunque su actividad disminuyó después de las 24 horas, sugiriendo un papel en la respuesta inmediata al daño. Esta enzima se ha visto principalmente activa en procesos mitocondriales, algunas mutaciones han estado implicadas en daños del tejido cerebral, específicamente en materia blanca (276,277). Las enzimas de los demás clústeres presentaron comportamientos más heterogéneos. PTDSS y CDIPT fueron más activas en etapas tardías, lo que podría implicar su participación en la remodelación de membranas asociadas a la recuperación y recaída tardía. La enzima CDS mostró una mayor actividad en el hipocampo, disminuyendo con el tiempo, lo que sugiere su implicación en los cambios iniciales de la membrana postisquemia. La enzima PLD, presento activa desde los siete días postisquemia y disminuyendo hasta los cuatro meses, podría estar relacionada con la estabilización de la membrana en fases posteriores del daño neuronal, señalización celular mediada por PA y síntesis de lípidos mitocondriales.

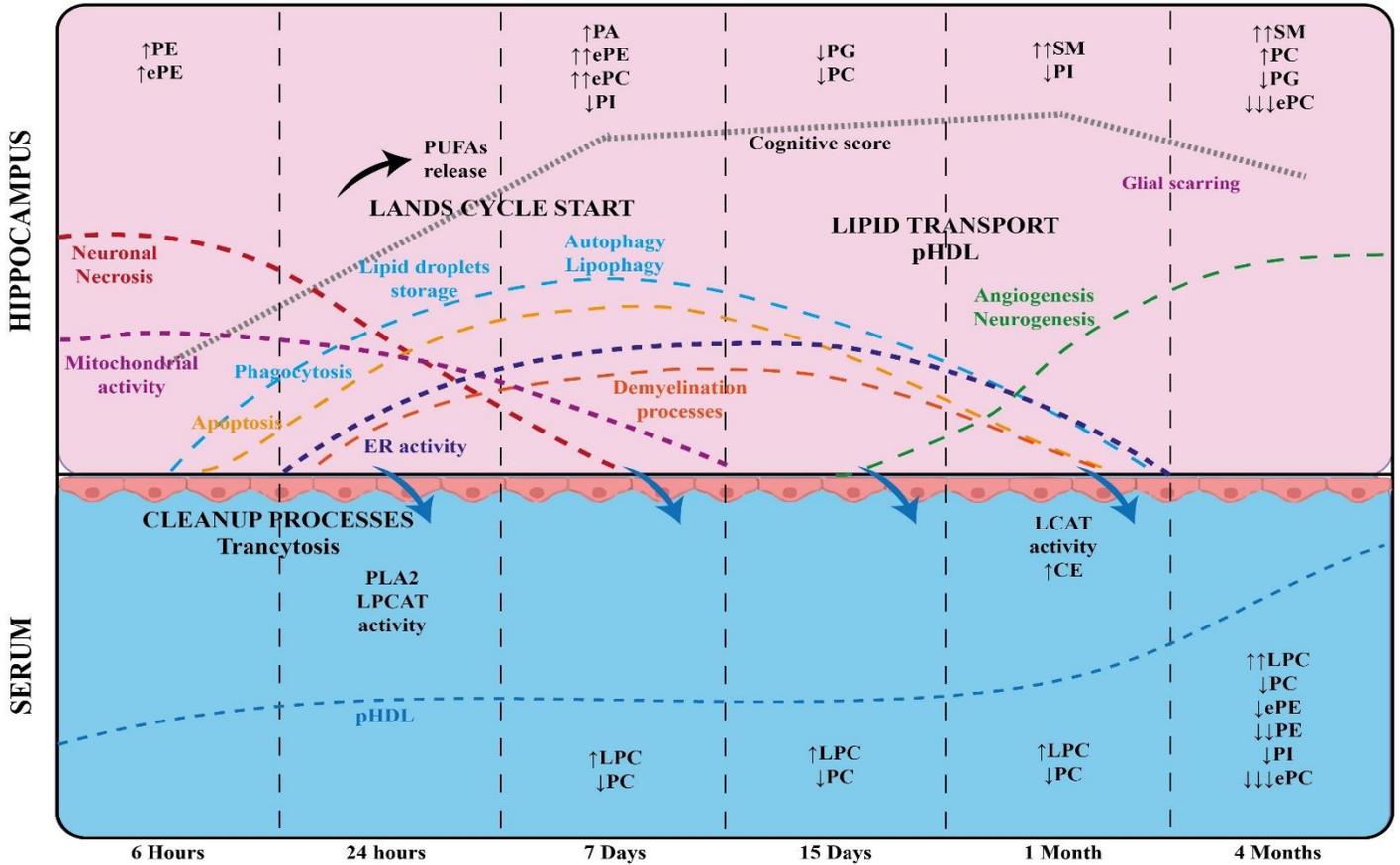
En conjunto, estos resultados destacan la complejidad y la dinámica de la remodelación de fosfolípidos en el contexto de la isquemia cerebral. Las variaciones temporales en la actividad de estas enzimas subrayan su papel crucial en la evolución del daño neuronal y en la conversión de lesiones reversibles a irreversibles. Comprender los mecanismos subyacentes a estos cambios puede arrojar luz sobre nuevas estrategias terapéuticas para abordar enfermedades neurodegenerativas, enfocándose en la modulación de la remodelación de fosfolípidos para proteger y reparar la integridad neuronal.

Este estudio nos permitió identificar un posible mecanismo asociado al remodelamiento de fosfolípidos que podría estar vinculado a los procesos celulares que ocurren tras un evento isquémico. En particular, observamos cómo estos procesos de remodelación podrían afectar los cambios en los niveles de fosfolípidos plasmáticos mejorando nuestro conocimiento sobre la comunicación cerebro-periferia. Dichos cambios podrían desempeñar un papel crucial en la respuesta celular al daño isquémico, influenciando tanto la reparación celular como las vías inflamatorias y posterior recaída homeostática. La comprensión de este mecanismo postularía nuevos biomarcadores sanguíneos que reflejan procesos del estado cerebral,

también dan la posibilidad de generar nuevos tratamientos que modulen el metabolismo de los fosfolípidos, con el objetivo de mejorar la recuperación y reducir el daño neuronal en enfermedades neurodegenerativas. En eventos postisquémicos podrían ser claves para identificar y pronosticar pacientes que puedan estar presentando recaídas o daños secundarios. Es necesario validar si estos procesos vistos en modelos animales se replican en humanos y afianzar la información.

MODELO HIPOTÉTICO

HYPOTHETICAL MODEL SUMMARY



- Neuronal Necrosis - - - - -
- Mitochondrial activity - - - - -
- Apoptosis - - - - -
- Phagocytosis - - - - -
- Lipid droplets storage - - - - -
- Autophagy - Lipophagy - - - - -
- ER activity - - - - -
- Demyelination processes - - - - -
- Angiogenesis Neurogenesis - - - - -
- pHDL - - - - -
- Cognitive score

Modelo hipotético. El modelo representa los principales cambios fosfolipídicos generados en el hipocampo posterior a un evento isquémico transitorio. En las primeras horas se genera muerte neuronal y se activan mecanismos de limpieza, almacenamiento y degradación los cuales se asocian con la activación del ciclo de Lands y remodelaciones de membrana, todo esto asociado a actividad de la mitocondria y el ER. Los productos de desecho son transportados por partículas HDL y luego por mecanismos de transcitosis se intercambian al suero generando los aumentos de LPC y disminuciones en PC. En la etapa tardía este recambio se ve asociado a procesos de esterificación de CHO los cuales aumentan la proporción de LPC/PC. Todo esto asociado con el desempeño cognitivo.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El análisis lipidómico reveló una posible conexión entre los cambios en los fosfolípidos del hipocampo y del suero, sugiriendo la implicación de procesos de limpieza, almacenamiento y eliminación de desechos desde el cerebro hacia la periferia. Además, se observó un deterioro posterior a la recuperación que exacerbó este comportamiento fosfolipídico. A partir de esto se generan necesidades de validación de los procesos descritos. Se han propuesto diversas estrategias para esta validación, como el análisis inmunomarcado de proteínas asociadas, western blot y análisis de la composición de lipoproteínas en suero postisquemia. Otras ventajas de este estudio incluyen la posibilidad de aplicar análisis similares en otros modelos de neurodegeneración, lo que contribuye significativamente al estudio de biomarcadores periféricos para enfermedades neurodegenerativas y a la comprensión de los mecanismos patológicos, proporcionando información valiosa para desarrollar estrategias de diagnóstico y tratamiento más efectivas, mejorando así la detección y manejo temprano de estas enfermedades y potencialmente mitigando su progresión.

REFERENCIAS

1. Hansson O. Biomarkers for neurodegenerative diseases. *Nat Med* [Internet]. 2021;27(6):954–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-021-01382-x>
2. Selkoe DJ. Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiol Rev* [Internet]. 2001 Apr 1;81(2):741–66. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.2001.81.2.741>
3. Lista S, O'Bryant SE, Blennow K, Dubois B, Hugon J, Zetterberg H, et al. Biomarkers in Sporadic and Familial Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis*. 2015;47(2):291–317.
4. Doecke JD, Pérez-Grijalba V, Fandos N, Fowler C, Villemagne VL, Masters CL, et al. Total A β 42/A β 40 ratio in plasma predicts amyloid-PET status, independent of clinical AD diagnosis. *Neurology*. 2020;94(15):E1580–91.
5. Torkhovskaya TI, Zakharova TS, Korotkevich EI, Ipatova OM, Markin SS. Human Blood Plasma Lipidome: Opportunities and Prospects of Its Analysis in Medical Chemistry. *Russ J Bioorganic Chem*. 2019;45(5):335–46.
6. Sabogal-Guáqueta AM, Villamil-Ortiz JG, Arias-Londoño JD, Cardona-Gómez GP. Inverse Phosphatidylcholine/Phosphatidylinositol Levels as Peripheral Biomarkers and Phosphatidylcholine/Lysophosphatidylethanolamine-Phosphatidylserine as Hippocampal Indicator of Postischemic Cognitive Impairment in Rats. *Front Neurosci* [Internet]. 2018 Dec 21;12(December):1–16. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2018.00989/full>
7. Sabogal-Guáqueta AM, Posada-Duque R, Cortes NC, Arias-Londoño JD, Cardona-Gómez GP. Changes in the hippocampal and peripheral phospholipid profiles are associated with neurodegeneration hallmarks in a long-term global cerebral ischemia model: Attenuation by Linalool. *Neuropharmacology*. 2018;135:555–71.
8. Li Y, Zhang J. Animal models of stroke. *Anim Model Exp Med*. 2021;4(3):204–19.
9. Piomelli D, Astarita G, Rapaka R. A neuroscientist's guide to lipidomics. *Nat Rev*

- Neurosci [Internet]. 2007 Oct;8(10):743–54. Available from:
<http://www.nature.com/articles/nrn2233>
10. Lin WJ, Shen PC, Liu HC, Cho YC, Hsu MK, Lin IC, et al. LipidSig: a web-based tool for lipidomic data analysis. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2021 Jul 2;49(W1):W336–45. Available from:
<https://academic.oup.com/nar/article/49/W1/W336/6287848>
 11. Liebisch G, Fahy E, Aoki J, Dennis EA, Durand T, Ejsing CS, et al. Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures. *J Lipid Res* [Internet]. 2020;61(12):1539–55. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1194/jlr.S120001025>
 12. Zheng L, Xie C, Zheng J, Dong Q, Si T, Zhang J, et al. An imbalanced ratio between PC(16:0/16:0) and LPC(16:0) revealed by lipidomics supports the role of the Lands cycle in ischemic brain injury. *J Biol Chem* [Internet]. 2021;296:100151. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.016565>
 13. Montesinos J, Guardia-Laguarta C, Area-Gomez E. The fat brain. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* [Internet]. 2020 Mar;23(2):68–75. Available from:
<http://journals.lww.com/10.1097/MCO.0000000000000634>
 14. Barber CN, Raben DM. Lipid Metabolism Crosstalk in the Brain: Glia and Neurons. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2019 May 21;13(May):1–5. Available from:
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2019.00212/full>
 15. Ledesma MD, Martin MG, Dotti CG. Lipid changes in the aged brain: Effect on synaptic function and neuronal survival. *Prog Lipid Res*. 2012;51(1):23–35.
 16. Vance JE, Hayashi H. Formation and function of apolipoprotein E-containing lipoproteins in the nervous system. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2010 Aug;1801(8):806–18. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.02.007>
 17. De Fabiani E. Lipids IN the brain: Crossing the “insurmountable” barrier for a fatty, happy life. *Eur J Lipid Sci Technol* [Internet]. 2014 Aug;116(8):941–2. Available

from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201400260>

18. Wang H, Eckel RH. What are lipoproteins doing in the brain? *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2014 Jan;25(1):8–14. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043276013001720>
19. Meisenberg G, Simmons WH. Principles of medical biochemistry. *Biochem Educ* [Internet]. 1999 Jan;27(1):61. Available from: <https://books.google.com.co/books?id=AtsqDQAAQBAJ>
20. Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. Glycerophospholipids in brain: Their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. *Chem Phys Lipids*. 2000;106(1):1–29.
21. Paltauf F. Ether lipids in biomembranes. *Chem Phys Lipids*. 1994;74(2):101–39.
22. Brites P, Waterham HR, Wanders RJA. Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2004;1636(2–3):219–31.
23. Wood PL, Phillipps A, Woltjer RL, Jeffrey A, Quinn JF. Increased lysophosphatidylethanolamine and diacylglycerol levels in Alzheimer ' s disease plasma. *JSM Alzheimer's Dis Relat Dement*. 2014;2(1):1005.
24. Hussain G, Wang J, Rasul A, Anwar H, Imran A, Qasim M, et al. Role of cholesterol and sphingolipids in brain development and neurological diseases. *Lipids Health Dis*. 2019;18(1):1–12.
25. Brady ST, Siegel GJ, Albers RW, Price DL. Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular and Medical Neurobiology. In: *Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular and Medical Neurobiology*. 2012.
26. Schmitt S, Cantuti Castelvetri L, Simons M. Metabolism and functions of lipids in myelin. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2015;1851(8):999–1005. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.12.016>
27. Li J, Wang X, Zhang T, Wang C, Huang Z, Luo X, et al. A review on phospholipids

- and their main applications in drug delivery systems. *Asian J Pharm Sci* [Internet]. 2015;10(2):81–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.004>
28. Escribá P V. Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine. *Trends Mol Med* [Internet]. 2006 Jan;12(1):34–43. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471491405002637>
 29. Chorlay A, Monticelli L, Veríssimo Ferreira J, Ben M'barek K, Ajjaji D, Wang S, et al. Membrane Asymmetry Imposes Directionality on Lipid Droplet Emergence from the ER. *Dev Cell*. 2019;50(1):25-42.e7.
 30. Watson H. Biological membranes. *Essays Biochem*. 2015;59:43–70.
 31. Yeagle PL. Biogenesis of Membrane Lipids. In: *The Membranes of Cells* [Internet]. Elsevier; 2016. p. 57–71. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128000472000036>
 32. Lombard J, López-García P, Moreira D. The early evolution of lipid membranes and the three domains of life. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2012 Jul 11;10(7):507–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2815>
 33. Zuniga-Hertz JP, Patel HH. The Evolution of Cholesterol-Rich Membrane in Oxygen Adaption: The Respiratory System as a Model. *Front Physiol* [Internet]. 2019 Oct 29;10(October):1–18. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2019.01340/full>
 34. Itoh YH, Sugai A, Uda I, Itoh T. The evolution of lipids. *Adv Sp Res*. 2001;28(4):719–24.
 35. Peretó J, López-García P, Moreira D. Ancestral lipid biosynthesis and early membrane evolution. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2004 Sep;29(9):469–77. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000404001574>
 36. Ma Y, Poole K, Goyette J, Gaus K. Introducing Membrane Charge and Membrane Potential to T Cell Signaling. *Front Immunol* [Internet]. 2017 Nov 9;8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01513/full>

37. West A, Brummel BE, Braun AR, Rhoades E, Sachs JN. Membrane remodeling and mechanics: Experiments and simulations of α -Synuclein. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2016;1858(7):1594–609. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.03.012>
38. Ibarguren M, López DJ, Encinar JA, González-Ros JM, Busquets X, Escribá P V. Partitioning of liquid-ordered/liquid-disordered membrane microdomains induced by the fluidifying effect of 2-hydroxylated fatty acid derivatives. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 2013 Nov;1828(11):2553–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.06.014>
39. Casares D, Escribá P V., Rosselló CA. Membrane Lipid Composition: Effect on Membrane and Organelle Structure, Function and Compartmentalization and Therapeutic Avenues. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 May 1;20(9):2167. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/9/2167>
40. Arsenault D, Julien C, Tremblay C, Calon F. DHA improves cognition and prevents dysfunction of entorhinal cortex neurons in 3xTg-AD mice. *PLoS One*. 2011;6(2).
41. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2008 Feb;9(2):112–24. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrm2330>
42. McMahon HT, Boucrot E. Membrane curvature at a glance. *J Cell Sci*. 2015;128(6):1065–70.
43. Vega-Cabrera LA, Pardo-López L. Membrane remodeling and organization: Elements common to prokaryotes and eukaryotes. *IUBMB Life*. 2017;69(2):55–62.
44. Garba L, Shukuri Mo M, Nurbaya Os S, Noor Zalih R. Review on Fatty Acid Desaturases and their Roles in Temperature Acclimatisation. *J Appl Sci* [Internet]. 2017 May 15;17(6):282–95. Available from: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=jas.2017.282.295>
45. Cai Y, Yu XH, Chai J, Liu CJ, Shanklin J. A conserved evolutionary mechanism permits $\Delta 9$ desaturation of very-long-chain fatty acyl lipids. *J Biol Chem* [Internet].

- 2020 Aug;295(32):11337–45. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.RA120.014258>
46. Scott HL, Kennison KB, Enoki TA, Doktorova M, Kinnun JJ, Heberle FA, et al. Model Membrane Systems Used to Study Plasma Membrane Lipid Asymmetry. *Symmetry (Basel)* [Internet]. 2021 Jul 26;13(8):1356. Available from:
<https://www.mdpi.com/2073-8994/13/8/1356>
 47. Spector AA, Yorek MA. Membrane lipid composition and cellular function. *J Lipid Res* [Internet]. 1985 Sep;26(9):1015–35. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3906008>
 48. Engberg O, Hautala V, Yasuda T, Dehio H, Murata M, Slotte JP, et al. The Affinity of Cholesterol for Different Phospholipids Affects Lateral Segregation in Bilayers. *Biophys J* [Internet]. 2016;111(3):546–56. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2016.06.036>
 49. Levental I, Levental KR, Heberle FA. Lipid Rafts: Controversies Resolved, Mysteries Remain. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2020;1–13. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.01.009>
 50. McMahon HT, Gallop JL. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature*. 2005;438(7068):590–6.
 51. Cebecauer M, Amaro M, Jurkiewicz P, Sarmiento MJ, Šachl R, Cwiklik L, et al. Membrane Lipid Nanodomains. *Chem Rev*. 2018;118(23):11259–97.
 52. Kawarabayashi T, Nakamura T, Sato K, Seino Y, Ichii S, Nakahata N, et al. Lipid Rafts Act as a Common Platform for Amyloid- β Oligomer-Induced Alzheimer's Disease Pathology. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2022 May 31;87(3):1189–203. Available from:
<https://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-215662>
 53. Nguyen AT, Sathe SR, Yim EKF. From nano to micro: topographical scale and its impact on cell adhesion, morphology and contact guidance. *J Phys Condens Matter*

- [Internet]. 2016 May 11;28(18):183001. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1088/0953-8984/28/18/183001>
54. Schiera G, Di Liegro CM, Di Liegro I. Extracellular Membrane Vesicles as Vehicles for Brain Cell-to-Cell Interactions in Physiological as well as Pathological Conditions. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
 55. Südhof TC. The cell biology of synapse formation. *J Cell Biol* [Internet]. 2021 Jul 5;220(7). Available from:
<https://rupress.org/jcb/article/220/7/e202103052/212258/The-cell-biology-of-synapse-formationMechanisms-of>
 56. Milior G, Castro MA Di, Sciarria LP, Garofalo S, Branchi I, Ragozzino D, et al. Electrophysiological Properties of CA1 Pyramidal Neurons along the Longitudinal Axis of the Mouse Hippocampus. *Sci Rep*. 2016;6(November):1–9.
 57. Sengupta B, Stemmler M, Laughlin SB, Niven JE. Action potential energy efficiency varies among neuron types in vertebrates and invertebrates. *PLoS Comput Biol*. 2010;6(7):35.
 58. Marquardt D, Geier B, Pabst G. Asymmetric Lipid Membranes: Towards More Realistic Model Systems. *Membranes (Basel)* [Internet]. 2015 May 6;5(2):180–96. Available from: <http://www.mdpi.com/2077-0375/5/2/180>
 59. PARKIN ET, TURNER AJ, HOOPER NM. Amyloid precursor protein, although partially detergent-insoluble in mouse cerebral cortex, behaves as an atypical lipid raft protein. *Biochem J* [Internet]. 1999 Nov 15;344(1):23–30. Available from:
<https://portlandpress.com/biochemj/article/344/1/23/35544/Amyloid-precursor-protein-although-partially>
 60. Mohmmad Abdul H, Butterfield DA. Protection against amyloid beta-peptide (1–42)-induced loss of phospholipid asymmetry in synaptosomal membranes by tricyclodecan-9-xanthogenate (D609) and ferulic acid ethyl ester: Implications for Alzheimer’s disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2005 Jun;1741(1–2):140–8. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092544390400273X>

61. Hankins HM, Baldrige RD, Xu P, Graham TR. Role of Flippases, Scramblases and Transfer Proteins in Phosphatidylserine Subcellular Distribution. *Traffic* [Internet]. 2015 Jan;16(1):35–47. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tra.12233>
62. Hankins HM, Baldrige RD, Xu P, Graham TR. Role of Flippases, Scramblases and Transfer Proteins in Phosphatidylserine Subcellular Distribution. *Traffic*. 2015 Jan;16(1):35–47.
63. Poitelon Y, Kopec AM, Belin S. Myelin Fat Facts: An Overview of Lipids and Fatty Acid Metabolism. *Cells* [Internet]. 2020 Mar 27;9(4):812. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/4/812>
64. Vance JE, Hayashi H. Formation and function of apolipoprotein E-containing lipoproteins in the nervous system. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2010 Aug 1 [cited 2023 Jan 19];1801(8):806–18. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198110000429>
65. Vance JE, Hayashi H, Karten B. Cholesterol homeostasis in neurons and glial cells. *Semin Cell Dev Biol*. 2005;16(2):193–212.
66. Kao YC, Ho PC, Tu YK, Jou IM, Tsai KJ. Lipids and alzheimer's disease [Internet]. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. p. 1505. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/4/1505>
67. Hejazi L, Wong JWH, Cheng D, Proschogo N, Ebrahimi D, Garner B, et al. Mass and relative elution time profiling: two-dimensional analysis of sphingolipids in Alzheimer's disease brains. *Biochem J* [Internet]. 2011 Aug 15;438(1):165–75. Available from: <https://portlandpress.com/biochemj/article/438/1/165/45724/Mass-and-relative-elution-time-profiling>
68. Grösgen S, Grimm MOW, Frieß P, Hartmann T. Role of amyloid beta in lipid homeostasis. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2010 Aug;1801(8):966–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.05.002>
69. Schnaar RL. Gangliosides of the Vertebrate Nervous System. *J Mol Biol* [Internet].

- 2016;428(16):3325–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2016.05.020>
70. Hogan-Cann AD, Anderson CM. Physiological Roles of Non-Neuronal NMDA Receptors. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 2016;37(9):750–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2016.05.012>
 71. Edmond J, Higa TA, Korsak RA, Bergner EA, Lee WNP. Fatty acid transport and utilization for the developing brain. *J Neurochem*. 1998;70(3):1227–34.
 72. Loving BA, Bruce KD. Lipid and Lipoprotein Metabolism in Microglia. *Front Physiol*. 2020;11(April):1–20.
 73. Yu X, Ji C, Shao A. Neurovascular Unit Dysfunction and Neurodegenerative Disorders. *Front Neurosci*. 2020;14(April):1–8.
 74. Tracey TJ, Steyn FJ, Wolvetang EJ, Ngo ST. Neuronal Lipid Metabolism: Multiple Pathways Driving Functional Outcomes in Health and Disease. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 2018 Jan 23;11(January):1–25. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2018.00010/full>
 75. Testen A, Sepulveda-Orengo MT, Gaines CH, Reissner KJ. Region-specific reductions in morphometric properties and synaptic colocalization of astrocytes following cocaine self-administration and extinction. *Front Cell Neurosci*. 2018;12(August):1–12.
 76. Allen NJ, Eroglu C. Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron* [Internet]. 2017;96(3):697–708. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.056>
 77. Kimelberg HK. Functions of mature mammalian astrocytes: A current view. *Neuroscientist*. 2010;16(1):79–106.
 78. Zhou B, Zuo YX, Jiang RT. Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS Neurosci Ther*. 2019;25(6):665–73.
 79. Brown GC, Neher JJ. Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2014;15(4):209–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3710>

80. Fu R, Shen Q, Xu P, Luo JJ, Tang Y. Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases. *Mol Neurobiol*. 2014;49(3):1422–34.
81. Rawji KS, Gonzalez Martinez GA, Sharma A, Franklin RJM. The Role of Astrocytes in Remyelination. *Trends Neurosci* [Internet]. 2020;43(8):596–607. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.05.006>
82. Bohatschek M, Kloss CUA, Kalla R, Raivich G. In vitro model of microglial deramification: Ramified microglia transform into amoeboid phagocytes following addition of brain cell membranes to microglia-astrocyte cocultures. *J Neurosci Res*. 2001;64(5):508–22.
83. Voskuhl RR, Peterson RS, Song B, Ao Y, Morales LBJ, Tiwari-Woodruff S, et al. Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. *J Neurosci*. 2009;29(37):11511–22.
84. Jha MK, Jo M, Kim JH, Suk K. Microglia-Astrocyte Crosstalk: An Intimate Molecular Conversation. *Neuroscientist*. 2019;25(3):227–40.
85. Leyrolle Q, Layé S, Nadjar A. Direct and indirect effects of lipids on microglia function. *Neurosci Lett* [Internet]. 2019;708(January):134348. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.134348>
86. Chausse B, Kakimoto PA, Kann O. Microglia and lipids: how metabolism controls brain innate immunity. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2021;112(June 2020):137–44. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.08.001>
87. Button EB, Mitchell AS, Domingos MM, Chung JHJ, Bradley RM, Hashemi A, et al. Microglial Cell Activation Increases Saturated and Decreases Monounsaturated Fatty Acid Content, but Both Lipid Species are Proinflammatory. *Lipids* [Internet]. 2014 Apr 29;49(4):305–16. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1007/s11745-014-3882-y>
88. Garcia Corrales A V., Haidar M, Bogie JFJ, Hendriks JJA. Fatty Acid Synthesis in Glial Cells of the CNS. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Jul 29;22(15):8159. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/15/8159>

89. Liu L, MacKenzie KR, Putluri N, Maletić-Savatić M, Bellen HJ. The Glia-Neuron Lactate Shuttle and Elevated ROS Promote Lipid Synthesis in Neurons and Lipid Droplet Accumulation in Glia via APOE/D. *Cell Metab* [Internet]. 2017 Nov;26(5):719-737.e6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S155041311730551X>
90. Vasile F, Dossi E, Rouach N. Human astrocytes: structure and functions in the healthy brain. *Brain Struct Funct*. 2017;222(5):2017–29.
91. Ben Haim L, Rowitch DH. Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2016;18(1):31–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn.2016.159>
92. van Deijk ALF, Camargo N, Timmerman J, Heistek T, Brouwers JF, Mogavero F, et al. Astrocyte lipid metabolism is critical for synapse development and function in vivo. *Glia*. 2017;65(4):670–82.
93. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(1):41–53.
94. Andreone BJ, Chow BW, Tata A, Lacoste B, Ben-Zvi A, Bullock K, et al. Blood-Brain Barrier Permeability Is Regulated by Lipid Transport-Dependent Suppression of Caveolae-Mediated Transcytosis. *Neuron* [Internet]. 2017 May;94(3):581-594.e5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627317302878>
95. Sweeney MD, Kisler K, Montagne A, Toga AW, Zlokovic B V. The role of brain vasculature in neurodegenerative disorders. *Nat Neurosci* [Internet]. 2018;21(10):1318–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41593-018-0234-x>
96. Bonvento G, Bolaños JP. Astrocyte-neuron metabolic cooperation shapes brain activity. *Cell Metab*. 2021;33(8):1546–64.
97. Watts ME, Pocock R, Claudianos C. Brain energy and oxygen metabolism: Emerging role in normal function and disease. *Front Mol Neurosci*. 2018;11(June):1–13.
98. Schönfeld P, Reiser G. Brain energy metabolism spurns fatty acids as fuel due to

their inherent mitotoxicity and potential capacity to unleash neurodegeneration. *Neurochem Int* [Internet]. 2017 Oct;109:68–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuint.2017.03.018>

99. Jeffery KJ, Rovelli C. Transitions in Brain Evolution: Space, Time and Entropy. *Trends Neurosci* [Internet]. 2020;43(7):467–74. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.04.008>
100. Welte MA. Expanding Roles for Lipid Droplets. *Curr Biol* [Internet]. 2015 Jun;25(11):R470–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.04.004>
101. Mishra A, Reynolds JP, Chen Y, Gourine A V., Rusakov DA, Attwell D. Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles. *Nat Neurosci* [Internet]. 2016;19(12):1619–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nn.4428>
102. An Y, Varma VR, Varma S, Casanova R, Dammer E, Pletnikova O, et al. Evidence for brain glucose dysregulation in Alzheimer’s disease. *Alzheimer’s Dement* [Internet]. 2018 Mar;14(3):318–29. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.09.011>
103. Munger EL, Edler MK, Hopkins WD, Hof PR, Sherwood CC, Raghanti MA. Comparative analysis of astrocytes in the prefrontal cortex of primates: Insights into the evolution of human brain energetics. *J Comp Neurol* [Internet]. 2022 Jul 20; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cne.25387>
104. Fernandes IA, Rocha MP, Campos MO, Mattos JD, Mansur DE, Rocha HNM, et al. Reduced arterial vasodilatation in response to hypoxia impairs cerebral and peripheral oxygen delivery in hypertensive men. *J Physiol*. 2018;596(7):1167–79.
105. Kiyatkin EA. Brain temperature and its role in physiology and pathophysiology: Lessons from 20 years of thermorecording. *Temperature* [Internet]. 2019;6(4):271–333. Available from: <https://doi.org/10.1080/23328940.2019.1691896>
106. Rich LR, Harris W, Brown AM. The Role of Brain Glycogen in Supporting Physiological Function. *Front Neurosci*. 2019;13(November):1–13.

107. Hofmann K, Rodriguez-Rodriguez R, Gaebler A, Casals N, Scheller A, Kuerschner L. Astrocytes and oligodendrocytes in grey and white matter regions of the brain metabolize fatty acids. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–12.
108. Chen J, Zhang X, Kusumo H, Costa LG, Guizzetti M. Cholesterol efflux is differentially regulated in neurons and astrocytes: Implications for brain cholesterol homeostasis. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2013;1831(2):263–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.09.007>
109. Polo-Hernández E, Tello V, Arroyo AA, Domínguez-Prieto M, de Castro F, Tabernero A, et al. 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 Res* [Internet]. 2014 Jun;1570:13–25. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899314005861>
110. Medina JM, Tabernero A. Astrocyte-synthesized oleic acid behaves as a neurotrophic factor for neurons. *J Physiol Paris*. 2002;96(3–4):265–71.
111. Zhang L, Ge L, Parimoo S, Stenn K, Prouty SM. Human stearoyl-CoA desaturase: Alternative transcripts generated from a single gene by usage of tandem polyadenylation sites. *Biochem J*. 1999;340(1):255–64.
112. Mahley RW. Central nervous system lipoproteins: ApoE and regulation of cholesterol metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36(7):1305–15.
113. Feingold KR, Grunfeld C. Introduction to Lipids and Lipoproteins. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA); 2000. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26247089>
114. Flowers SA, Rebeck GW. APOE in the normal brain. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2020;136(December 2019):104724. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104724>

115. Stukas S, Robert J, Wellington CL. High-Density Lipoproteins and Cerebrovascular Integrity in Alzheimer's Disease. *Cell Metab* [Internet]. 2014 Apr;19(4):574–91. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413114000096>
116. Lanfranco MF, Ng CA, Rebeck GW. ApoE lipidation as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17):1–19.
117. Dekroon RM, Armati PJ. Synthesis and processing of apolipoprotein E in human brain cultures. *Glia*. 2001;33(4):298–305.
118. Carvajal C. Lipoproteínas: metabolismo y lipoproteínas aterogénicas. Revisión bibliográfica. *Med Leg Costa Rica Edición virtual* [Internet]. 2014;31(2):829–37. Available from: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152014000200010
119. Camejo Berroeta G, Davidsson P. Contribución de la apolipoproteína CIII a la aterogenicidad de las dislipidemias. *Clínica e Investig en Arterioscler* [Internet]. 2012 Sep;24(5):252–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arteri.2012.02.006>
120. Hirsch-Reinshagen V, Zhou S, Burgess BL, Bernier L, McIsaac SA, Chan JY, et al. Deficiency of ABCA1 impairs apolipoprotein E metabolism in brain. *J Biol Chem*. 2004;279(39):41197–207.
121. De Roeck A, Van Broeckhoven C, Sleegers K. The role of ABCA7 in Alzheimer's disease: evidence from genomics, transcriptomics and methylomics. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2019 Aug 22;138(2):201–20. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00401-019-01994-1>
122. Lanfranco MF, Ng CA, Rebeck GW. ApoE Lipidation as a Therapeutic Target in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Sep 1;21(17):6336. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/17/6336>
123. Gustavsson AM, van Westen D, Stomrud E, Engström G, Nägga K, Hansson O. Midlife Atherosclerosis and Development of Alzheimer or Vascular Dementia. *Ann Neurol*. 2020;87(1):52–62.

124. Raval AP, Liu C, Hu BR. Rat model of global cerebral ischemia: The two-vessel occlusion (2VO) model of forebrain ischemia. *Anim Model Acute Neurol Inj*. 2009;77–86.
125. Céspedes ÁE, Arango CA, Cardona GP. Análisis comparativo de marcadores de lesión en modelos de isquemia cerebral focal y global en ratas. *Biomédica* [Internet]. 2012 Nov 1;33(2):292–305. Available from: <http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/830>
126. Lee RC, Lee MHH, Wu CC, Couto e Silva A, Possoit H, Hsieh TH, et al. Cerebral ischemia and neuroregeneration. *Neural Regen Res* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2022 May 20];13(3):373. Available from: <https://journals.lww.com/10.4103/1673-5374.228711>
127. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* [Internet]. 2008 Sep;55(3):310–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390808000099>
128. Khoshnam SE, Winlow W, Farzaneh M, Farbood Y, Moghaddam HF. Pathogenic mechanisms following ischemic stroke. *Neurol Sci*. 2017;38(7):1167–86.
129. Gennaro M, Mattiello A, Pizzorusso T. Rodent models of developmental ischemic stroke for translational research: Strengths and weaknesses. *Neural Plast*. 2019;2019.
130. Posada-Duque RA, Barreto GE, Cardona-Gomez GP. Protection after stroke: cellular effectors of neurovascular unit integrity. *Front Cell Neurosci*. 2014;8(August):1–19.
131. Popp A, Jaenisch N, Witte OW, Frahm C. Identification of ischemic regions in a rat model of stroke. *PLoS One*. 2009;4(3).
132. Sadowski M, Wisniewski HM, Jakubowska-Sadowska K, Tarnawski M, Lazarewicz JW, Mossakowski MJ. Pattern of neuronal loss in the rat hippocampus following experimental cardiac arrest-induced ischemia. *J Neurol Sci*. 1999;168(1):13–20.
133. Bendszus M, Bonekamp S, Berge E, Boutitie F, Brouwer P, Gizewski E, et al. A randomized controlled trial to test efficacy and safety of thrombectomy in stroke with extended lesion and extended time window. *Int J Stroke* [Internet]. 2019 Jan

29;14(1):87–93. Available from:
<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1747493018798558>

134. Grefkes C, Fink GR. Recovery from stroke: current concepts and future perspectives. *Neurol Res Pract.* 2020 Dec;2(1):17.
135. Phelan AM, Lange DG. Ischemia/reperfusion-induced changes in membrane fluidity characteristics of brain capillary endothelial cells and its prevention by liposomal-incorporated superoxide dismutase. *BBA - Biomembr.* 1991;1067(1):97–102.
136. Kim J a, Montagnani M, Chandrasekran S, Quon MJ. Role of Lipotoxicity in Endothelial Dysfunction. *Heart Fail Clin [Internet].* 2012 Oct;8(4):589–607. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1551713612000700>
137. Lee RHC, Lee MHH, Wu CYC, Couto E Silva A, Possoit HE, Hsieh TH, et al. Cerebral ischemia and neuroregeneration. *Neural Regen Res.* 2018;13(3):373–85.
138. Guglielmotto M, Aragno M, Autelli R, Giliberto L, Novo E, Colombatto S, et al. The up-regulation of BACE1 mediated by hypoxia and ischemic injury: Role of oxidative stress and HIF1 α . *J Neurochem.* 2009;108(4):1045–56.
139. Salminen A, Kauppinen A, Kaarniranta K. Hypoxia/ischemia activate processing of Amyloid Precursor Protein: impact of vascular dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 2017;140(4):536–49.
140. Ouro A, Correa-Paz C, Maqueda E, Custodia A, Aramburu-Núñez M, Romaus-Sanjurjo D, et al. Involvement of Ceramide Metabolism in Cerebral Ischemia. *Front Mol Biosci.* 2022 Apr;9.
141. Wei J, Wong LC, Boland S. Lipids as Emerging Biomarkers in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci [Internet].* 2023 Dec 21;25(1):131. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/1/131>
142. Björkhem I, Meaney S, Fogelman AM. Brain Cholesterol: Long Secret Life behind a Barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(5):806–15.
143. Kao Y chia, Ho P chuan, Tu Y kun, Jou I ming, Tsai K jer. Lipids and Alzheimer ' s

Disease.

144. Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu X jiang. Neurological Deficit and Extent of Neuronal Necrosis Attributable to Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. *Stroke* [Internet]. 1995 Apr;26(4):627–35. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/01.STR.26.4.627>
145. Folch J, Lees M, Stanley GHS. A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES. *J Biol Chem* [Internet]. 1957 May;226(1):497–509. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925818648495>
146. Villamil-Ortiz JG, Barrera-Ocampo A, Arias-Londoño JD, Villegas A, Lopera F, Cardona-Gómez GP. Differential Pattern of Phospholipid Profile in the Temporal Cortex from E280A-Familiar and Sporadic Alzheimer’s Disease Brains. *J Alzheimer’s Dis* [Internet]. 2018 Nov 28;61(1):209–19. Available from: <https://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/JAD-170554>
147. Molenaar MR, Jeucken A, Wassenaar TA, van de Lest CHA, Brouwers JF, Helms JB. LION/web: a web-based ontology enrichment tool for lipidomic data analysis. *Gigascience* [Internet]. 2019 Jun 1;8(6). Available from: <https://academic.oup.com/gigascience/article/doi/10.1093/gigascience/giz061/5505544>
148. Kim M, Jung S, Kim SY, Lee SH, Lee JH. Prehypertension-Associated Elevation in Circulating Lysophosphatidylcholines, Lp-PLA2 Activity, and Oxidative Stress. Buch SJ, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 May 6;9(5):e96735. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0096735>
149. Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, Kuhn M, Simonovic M, Roth A, et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2012 Nov 29;41(D1):D808–15. Available from: <http://academic.oup.com/nar/article/41/D1/D808/1057425/STRING-v91-proteinprotein-interaction-networks>

150. Wang B, Tontonoz P. Phospholipid Remodeling in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol* [Internet]. 2019 Feb 10;81(1):165–88. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-physiol-020518-114444>
151. Tanguy E, Wang Q, Moine H, Vitale N. Phosphatidic Acid: From Pleiotropic Functions to Neuronal Pathology. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2019 Jan 23;13. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2019.00002/full>
152. Gaud C, Sousa B, Nguyen A, Fedorova M, Ni Z, O'Donnell VB, et al. BioPAN: a web-based tool to explore mammalian lipidome metabolic pathways on LIPID MAPS. *F1000Research* [Internet]. 2021 Jun 9;10:4. Available from: <https://f1000research.com/articles/10-4/v2>
153. Choi J, Yin T, Shinozaki K, Lampe JW, Stevens JF, Becker LB, et al. Comprehensive analysis of phospholipids in the brain, heart, kidney, and liver: brain phospholipids are least enriched with polyunsaturated fatty acids. *Mol Cell Biochem* [Internet]. 2018 May 9;442(1–2):187–201. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11010-017-3203-x>
154. Pollet S, Ermidou S, Le Saux F, Monge M, Baumann N. Microanalysis of brain lipids: multiple two-dimensional thin-layer chromatography. *J Lipid Res* [Internet]. 1978 Sep;19(7):916–21. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022227520407072>
155. Cuzner ML, Davison AN. The lipid composition of rat brain myelin and subcellular fractions during development. *Biochem J* [Internet]. 1968 Jan 1;106(1):29–34. Available from: <https://portlandpress.com/biochemj/article/106/1/29/3388/The-lipid-composition-of-rat-brain-myelin-and>
156. Chavko M, Nemoto EM, Melick JA. Regional Lipid Composition in the Rat Brain Chavko, Nemoto, and Melick. Vol. 123, *Molecular and Chemical Neuropathology*. 1993.
157. Almeida R, Berzina Z, Arnspang EC, Baumgart J, Vogt J, Nitsch R, et al. Quantitative Spatial Analysis of the Mouse Brain Lipidome by Pressurized Liquid Extraction Surface Analysis. *Anal Chem* [Internet]. 2015 Feb 3;87(3):1749–56.

Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac503627z>

158. Ayhan F, Kulkarni A, Berto S, Sivaprakasam K, Douglas C, Lega BC, et al. Resolving cellular and molecular diversity along the hippocampal anterior-to-posterior axis in humans. *Neuron* [Internet]. 2021 Jul;109(13):2091-2105.e6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627321003299>
159. Miranda AM, Bravo FV, Chan RB, Sousa N, Di Paolo G, Oliveira TG. Differential lipid composition and regulation along the hippocampal longitudinal axis. *Transl Psychiatry* [Internet]. 2019;9(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41398-019-0478-6>
160. O'Brien JS, Sampson EL. Lipid composition of the normal human brain: gray matter, white matter, and myelin. *J Lipid Res* [Internet]. 1965 Oct;6(4):537-44. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S00222752039619X>
161. Yoon JH, Seo Y, Jo YS, Lee S, Cho E, Cazenave-Gassiot A, et al. Brain lipidomics: From functional landscape to clinical significance. *Sci Adv*. 2022;8(37):1-15.
162. Söderberg M, Edlund C, Kristensson K, Dallner G. Lipid compositions of different regions of the human brain during aging. *J Neurochem*. 1990 Feb;54(2):415-23.
163. Chang C, Zuo H, Li Y. Recent advances in deciphering hippocampus complexity using single-cell transcriptomics. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2023 Apr;179:106062. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969996123000761>
164. Bakulski KM, Dou JF, Thompson RC, Lee C, Middleton LY, Perera BPU, et al. Single-Cell Analysis of the Gene Expression Effects of Developmental Lead (Pb) Exposure on the Mouse Hippocampus. *Toxicol Sci* [Internet]. 2020 Aug 1;176(2):396-409. Available from: <https://academic.oup.com/toxsci/article/176/2/396/5847619>
165. Yao Z, van Velthoven CTJ, Nguyen TN, Goldy J, Seden-Cortes AE, Baftizadeh F, et al. A taxonomy of transcriptomic cell types across the isocortex and hippocampal formation. *Cell* [Internet]. 2021 Jun;184(12):3222-3241.e26. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867421005018>

166. Batiuk MY, Martirosyan A, Wahis J, de Vin F, Marneffe C, Kusserow C, et al. Identification of region-specific astrocyte subtypes at single cell resolution. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Mar 5;11(1):1220. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-14198-8>
167. Masuda T, Sankowski R, Staszewski O, Böttcher C, Amann L, Sagar, et al. Spatial and temporal heterogeneity of mouse and human microglia at single-cell resolution. *Nature* [Internet]. 2019 Feb 13;566(7744):388–92. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41586-019-0924-x>
168. Arneson D, Zhang G, Ying Z, Zhuang Y, Byun HR, Ahn IS, et al. Single cell molecular alterations reveal target cells and pathways of concussive brain injury. *Nat Commun* [Internet]. 2018 Sep 25;9(1):3894. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-018-06222-0>
169. Harris KD, Hochgerner H, Skene NG, Magno L, Katona L, Bengtsson Gonzales C, et al. Classes and continua of hippocampal CA1 inhibitory neurons revealed by single-cell transcriptomics. Jonas P, editor. *PLOS Biol* [Internet]. 2018 Jun 18;16(6):e2006387. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.2006387>
170. Schmitt A, Tatsch L, Vollhardt A, Schneider-Axmann T, Raabe FJ, Roell L, et al. Decreased Oligodendrocyte Number in Hippocampal Subfield CA4 in Schizophrenia: A Replication Study. *Cells* [Internet]. 2022 Oct 15;11(20):3242. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/20/3242>
171. Dawson G. Measuring brain lipids. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2015 Aug;1851(8):1026–39. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198115000554>
172. Ruggieri S, Fallani A. Lipid composition of yoshida ascites hepatoma and of livers and blood plasma from host and normal rats. *Lipids* [Internet]. 1979 Apr 1;14(4):323–33. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF02533415>
173. Senko D, Gorovaya A, Stekolshchikova E, Anikanov N, Fedianin A, Baltin M, et al. Time-Dependent Effect of Sciatic Nerve Injury on Rat Plasma Lipidome. Vol. 23,

International Journal of Molecular Sciences. 2022.

174. Nelson GJ. The phospholipid composition of plasma in various mammalian species. *Lipids* [Internet]. 1967 Jul;2(4):323–8. Available from: <https://aocs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1007/BF02532119>
175. Belsare DK, Roy Chowdhuri D. Phospholipid distribution in blood and tissues of some submammalian species. *Lipids* [Internet]. 1968 Jan;3(1):21–3. Available from: <https://aocs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1007/BF02530963>
176. Dougherty RM, Galli C, Ferro-Luzzi A, Iacono JM. Lipid and phospholipid fatty acid composition of plasma, red blood cells, and platelets and how they are affected by dietary lipids: a study of normal subjects from Italy, Finland, and the USA. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 1987 Feb;45(2):443–55. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002916523401141>
177. Bradamante S, Barchiesi E, Barenghi L, Zoppi F. An alternative expeditious analysis of phospholipid composition in human blood plasma by ³¹P NMR spectroscopy. *Anal Biochem* [Internet]. 1990 Mar;185(2):299–303. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000326979090297M>
178. Quehenberger O, Armando AM, Brown AH, Milne SB, Myers DS, Merrill AH, et al. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *J Lipid Res* [Internet]. 2010 Nov;51(11):3299–305. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022227520409630>
179. Rowe CE. The phospholipids of human-blood plasma and their exchange with the cells. *Biochem J* [Internet]. 1960 Sep 1;76(3):471–5. Available from: <https://portlandpress.com/biochemj/article/76/3/471/52298/The-phospholipids-of-human-blood-plasma-and-their>
180. Williams JH, Kuchmak M, Witter RF. Phospholipids of human serum. *Lipids* [Internet]. 1966 Mar;1(2):89–97. Available from: <https://aocs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1007/BF02532997>
181. Johnsen KB, Gudbergsson JM, Andresen TL, Simonsen JB. What is the blood

- concentration of extracellular vesicles? Implications for the use of extracellular vesicles as blood-borne biomarkers of cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* [Internet]. 2019 Jan;1871(1):109–16. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304419X1830180X>
182. Simonsen JB. What Are We Looking At? Extracellular Vesicles, Lipoproteins, or Both? *Circ Res* [Internet]. 2017 Sep 29;121(8):920–2. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.117.311767>
183. Dashti M, Kulik W, Hoek F, Veerman EC, Peppelenbosch MP, Rezaee F. A Phospholipidomic Analysis of All Defined Human Plasma Lipoproteins. *Sci Rep* [Internet]. 2011 Nov 7;1(1):139. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep00139>
184. Skotland T, Sagini K, Sandvig K, Llorente A. An emerging focus on lipids in extracellular vesicles. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2020;159:308–21. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X20300144>
185. Skipski V, Barclay M, Barclay R, Fetzer V, Good J, Archibald F. Lipid composition of human serum lipoproteins. *Biochem J* [Internet]. 1967 Aug 1;104(2):340–52. Available from: <https://portlandpress.com/biochemj/article/104/2/340/2986/Lipid-composition-of-human-serum-lipoproteins>
186. Record M, Carayon K, Poirot M, Silvente-Poirot S. Exosomes as new vesicular lipid transporters involved in cell–cell communication and various pathophysiologicals. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2014 Jan;1841(1):108–20. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198113002199>
187. Ghadami S, Dellinger K. The lipid composition of extracellular vesicles: applications in diagnostics and therapeutic delivery. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2023 Jul 13;10. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2023.1198044/full>
188. Sun, Saito, Saito. Lipid Profile Characterization and Lipoprotein Comparison of Extracellular Vesicles from Human Plasma and Serum. *Metabolites* [Internet]. 2019 Nov 1;9(11):259. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-1989/9/11/259>

189. Piedrahita D, Castro-Alvarez JF, Boudreau RL, Villegas-Lanau A, Kosik KS, Gallego-Gomez JC, et al. β -Secretase 1's targeting reduces hyperphosphorylated tau, implying autophagy actors in 3xTg-AD mice. *Front Cell Neurosci*. 2016;9(JAN2016):1–19.
190. Hsu P, Shi Y. Regulation of autophagy by mitochondrial phospholipids in health and diseases. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2017 Jan;1862(1):114–29. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1388198116302232>
191. Gibellini F, Smith TK. The Kennedy pathway— De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life* [Internet]. 2010 Jun 6;62(6):414–28. Available from: <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/iub.337>
192. Villamil-Ortiz JG, Cardona-Gomez GP. Comparative analysis of autophagy and tauopathy related markers in cerebral ischemia and Alzheimer's disease animal models. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2015 May 19;7(APR):1–14. Available from: http://www.frontiersin.org/Aging_Neuroscience/10.3389/fnagi.2015.00084/abstract
193. Calzada E, Onguka O, Claypool SM. Phosphatidylethanolamine Metabolism in Health and Disease. In: *International Review of Cell and Molecular Biology* [Internet]. 2016. p. 29–88. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1937644815000970>
194. Udagawa J, Hino K. Plasmalogen in the brain: Effects on cognitive functions and behaviors attributable to its properties. *Brain Res Bull* [Internet]. 2022 Oct;188:197–202. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0361923022002003>
195. Dorninger F, Forss-Petter S, Wimmer I, Berger J. Plasmalogens, platelet-activating factor and beyond – Ether lipids in signaling and neurodegeneration. *Neurobiol Dis*. 2020;145(August).
196. Dorninger F, Forss-Petter S, Berger J. From peroxisomal disorders to common

- neurodegenerative diseases – the role of ether phospholipids in the nervous system. *FEBS Lett* [Internet]. 2017 Sep 7;591(18):2761–88. Available from: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.12788>
197. Exner T, Romero-Brey I, Yifrach E, Rivera-Monroy J, Schrul B, Zouboulis CC, et al. An alternative membrane topology permits lipid droplet localization of peroxisomal fatty acyl-CoA reductase 1. *J Cell Sci* [Internet]. 2019 Jan 1; Available from: <https://journals.biologists.com/jcs/article/doi/10.1242/jcs.223016/265756/An-alternative-membrane-topology-permits-lipid>
198. Spears LD, Adak S, Dong G, Wei X, Spyropoulos G, Zhang Q, et al. Endothelial ether lipids link the vasculature to blood pressure, behavior, and neurodegeneration. *J Lipid Res* [Internet]. 2021;62:100079. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022227521000614>
199. Mahoney-Sanchez L, Bouchaoui H, Boussaad I, Jonneaux A, Timmerman K, Berdeaux O, et al. Alpha synuclein determines ferroptosis sensitivity in dopaminergic neurons via modulation of ether-phospholipid membrane composition. *Cell Rep* [Internet]. 2022 Aug;40(8):111231. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124722010488>
200. Villamil-Ortiz JG, Barrera-Ocampo A, Piedrahita D, Velásquez-Rodríguez CM, Arias-Londoño JD, Cardona-Gómez GP. BACE1 RNAi restores the composition of phosphatidylethanolamine-derivates related to memory improvement in aged 3xTg-AD mice. *Front Cell Neurosci*. 2016;10(NOV2016):1–14.
201. Wikieł H, Strosznajder J. Phosphatidylinositol degradation in ischemic brain specifically activated by synaptosomal enzymes. *FEBS Lett* [Internet]. 1987 May 25;216(1):57–61. Available from: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/0014-5793%2887%2980756-1>
202. Sabogal-Guáqueta AM, Arias-Londoño JD, Gutierrez-Vargas J, Sepulveda-Falla D, Glatzel M, Villegas-Lanau A, et al. Common disbalance in the brain parenchyma of dementias: Phospholipid profile analysis between CADASIL and sporadic Alzheimer’s disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* [Internet]. 2020

- Aug;1866(8):165797. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165797>
203. Ernest James Phillips T, Maguire E. Phosphoinositides: Roles in the Development of Microglial-Mediated Neuroinflammation and Neurodegeneration. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2021 Mar 26;15. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2021.652593/full>
 204. Thakker GD, Hajjar DP, Muller WA, Rosengart TK. The Role of Phosphatidylinositol 3-Kinase in Vascular Endothelial Growth Factor Signaling. *J Biol Chem* [Internet]. 1999 Apr;274(15):10002–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925819736746>
 205. Morel E, Chamoun Z, Lasiecka ZM, Chan RB, Williamson RL, Vetanovetz C, et al. Phosphatidylinositol-3-phosphate regulates sorting and processing of amyloid precursor protein through the endosomal system. *Nat Commun* [Internet]. 2013 Aug 2;4(1):2250. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncomms3250>
 206. Quan X, Bakovic M. Regulation of Membrane Phospholipid Homeostasis in Neurodegenerative Diseases. *OBM Geriatr* [Internet]. 2020 Dec 21;05(03):1–1. Available from: <http://www.lidsen.com/journals/geriatrics/geriatrics-05-03-176>
 207. Tatsuta T, Langer T. Intramitochondrial phospholipid trafficking. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2017 Jan;1862(1):81–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.08.006>
 208. Quinville BM, Deschenes NM, Ryckman AE, Walia JS. A Comprehensive Review: Sphingolipid Metabolism and Implications of Disruption in Sphingolipid Homeostasis. *Int J Mol Sci*. 2021 May;22(11):5793.
 209. Giussani P, Prinetti A, Tringali C. The role of Sphingolipids in myelination and myelin stability and their involvement in childhood and adult demyelinating disorders. *J Neurochem*. 2021 Feb;156(4):403–14.
 210. Giussani P, Prinetti A, Tringali C. The role of Sphingolipids in myelination and myelin stability and their involvement in childhood and adult demyelinating disorders. *J Neurochem* [Internet]. 2021 Feb 25;156(4):403–14. Available from:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jnc.15133>

211. Quinville BM, Deschenes NM, Ryckman AE, Walia JS. A Comprehensive Review: Sphingolipid Metabolism and Implications of Disruption in Sphingolipid Homeostasis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 May 28;22(11):5793. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/11/5793>
212. Ouro A, Correa-Paz C, Maqueda E, Custodia A, Aramburu-Núñez M, Romaus-Sanjurjo D, et al. Involvement of Ceramide Metabolism in Cerebral Ischemia. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2022 Apr 20;9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmolb.2022.864618/full>
213. Köberlin MS, Snijder B, Heinz LX, Baumann CL, Fauster A, Vladimer GI, et al. A Conserved Circular Network of Coregulated Lipids Modulates Innate Immune Responses. *Cell*. 2015;162(1):170–83.
214. Angelini R, Vortmeier G, Corcelli A, Fuchs B. A fast method for the determination of the PC/LPC ratio in intact serum by MALDI-TOF MS: An easy-to-follow lipid biomarker of inflammation. *Chem Phys Lipids* [Internet]. 2014 Oct;183:169–75. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009308414000929>
215. Miletić Vukajlović J, Drakulić D, Pejić S, Ilić T V., Stefanović A, Petković M, et al. Increased plasma phosphatidylcholine/lysophosphatidylcholine ratios in patients with Parkinson's disease. *Rapid Commun Mass Spectrom* [Internet]. 2020 Feb 28;34(4). Available from: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rcm.8595>
216. Zheng L, Xie C, Zheng J, Dong Q, Si T, Zhang J, et al. An imbalanced ratio between PC(16:0/16:0) and LPC(16:0) revealed by lipidomics supports the role of the Lands cycle in ischemic brain injury. *J Biol Chem* [Internet]. 2021;296:100151. Available from: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.016565>
217. Khan SA, Ilies MA. The Phospholipase A2 Superfamily: Structure, Isozymes, Catalysis, Physiologic and Pathologic Roles. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 Jan 10;24(2):1353. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/2/1353>

218. Bedoya-Guzmán FA, Pacheco-Herrero M del M, Salomón-Cruz ID. BACE1 and SCD1 are associated in neurodegeneration. *Brain Pathol.* 2022;1–22.
219. Shindou H, Hishikawa D, Harayama T, Yuki K, Shimizu T. Recent progress on acyl CoA: lysophospholipid acyltransferase research. *J Lipid Res* [Internet]. 2009 Apr;50:S46–51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002222752030585X>
220. Valentine WJ, Yanagida K, Kawana H, Kono N, Noda NN, Aoki J, et al. Update and nomenclature proposal for mammalian lysophospholipid acyltransferases, which create membrane phospholipid diversity. *J Biol Chem* [Internet]. 2022;298(1):101470. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101470>
221. Thiam AR, Farese Jr R V., Walther TC. The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2013 Dec 13;14(12):775–86. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrm3699>
222. Thiam AR, Farese Jr R V., Walther TC. The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013 Dec;14(12):775–86.
223. Chapman KD, Aziz M, Dyer JM, Mullen RT. Mechanisms of lipid droplet biogenesis. *Biochem J.* 2019;476(13):1929–42.
224. Barbosa AD, Savage DB, Siniosoglou S. Lipid droplet–organelle interactions: emerging roles in lipid metabolism. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2015 Aug;35:91–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2015.04.017>
225. Ralhan I, Chang CL, Lippincott-Schwartz J, Ioannou MS. Lipid droplets in the nervous system. *J Cell Biol* [Internet]. 2021 Jul 5;220(7). Available from: <https://rupress.org/jcb/article/220/7/e202102136/212402/Lipid-droplets-in-the-nervous-systemLipid-droplets>
226. Farmer BC, Walsh AE, Kluemper JC, Johnson LA. Lipid Droplets in Neurodegenerative Disorders. *Front Neurosci* [Internet]. 2020 Jul 29;14. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2020.00742/full>
227. Li H, Liu P, Deng S, Zhu L, Cao X, Bao X, et al. Pharmacological Upregulation of

Microglial Lipid Droplet Alleviates Neuroinflammation and Acute Ischemic Brain Injury. *Inflammation* [Internet]. 2023;46(5):1832–48. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10753-023-01844-z>

228. Kamińska D, Skrzycki M. Lipid droplets, autophagy, and ER stress as key (survival) pathways during ischemia-reperfusion of transplanted grafts. *Cell Biol Int*. 2024 Mar;48(3):253–79.
229. Wan T, Zhu W, Zhao Y, Zhang X, Ye R, Zuo M, et al. Astrocytic phagocytosis contributes to demyelination after focal cortical ischemia in mice. *Nat Commun* [Internet]. 2022 Mar 3;13(1):1134. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-28777-9>
230. Fumagalli S, Fiordaliso F, Perego C, Corbelli A, Mariani A, De Paola M, et al. The phagocytic state of brain myeloid cells after ischemia revealed by superresolution structured illumination microscopy. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2019 Dec 16;16(1):9. Available from: <https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-019-1401-z>
231. Anan'ina T, Kisel A, Kudabaeva M, Chernysheva G, Smolyakova V, Usov K, et al. Neurodegeneration, myelin loss and glial response in the three-vessel global ischemia model in rat. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17):1–20.
232. Wan T, Zhu W, Zhao Y, Zhang X, Ye R, Zuo M, et al. Astrocytic phagocytosis contributes to demyelination after focal cortical ischemia in mice. *Nat Commun*. 2022 Mar;13(1):1134.
233. Fumagalli S, Fiordaliso F, Perego C, Corbelli A, Mariani A, De Paola M, et al. The phagocytic state of brain myeloid cells after ischemia revealed by superresolution structured illumination microscopy. *J Neuroinflammation*. 2019 Dec;16(1):9.
234. Gouna G, Klose C, Bosch-Queralt M, Liu L, Gokce O, Schifferer M, et al. TREM2-dependent lipid droplet biogenesis in phagocytes is required for remyelination. *J Exp Med* [Internet]. 2021 Oct 4;218(10). Available from: <https://rupress.org/jem/article/218/10/e20210227/212588/TREM2-dependent-lipid-droplet-biogenesis-in>

235. Raffaele S, Fumagalli M. Dynamics of Microglia Activation in the Ischemic Brain: Implications for Myelin Repair and Functional Recovery. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2022 Jul 11;16. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2022.950819/full>
236. Smolič T, Tavčar P, Horvat A, Černe U, Halužan Vasle A, Tratnjek L, et al. Astrocytes in stress accumulate lipid droplets. *Glia*. 2021;69(6):1540–62.
237. Ting SM, Zhao X, Sun G, Obertas L, Ricote M, Aronowski J. Brain Cleanup as a Potential Target for Poststroke Recovery. *Stroke* [Internet]. 2020 Mar;51(3):958–66. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/STROKEAHA.119.027315>
238. Anderova M, Vorisek I, Pivonkova H, Benesova J, Vargova L, Cicanic M, et al. Cell Death/Proliferation and Alterations in Glial Morphology Contribute to Changes in Diffusivity in the Rat Hippocampus after Hypoxia—Ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 2011 Mar 29;31(3):894–907. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1038/jcbfm.2010.168>
239. Lonati E, Corsetto PA, Montorfano G, Zava S, Carrozzini T, Brambilla A, et al. Lipid Reshaping and Lipophagy Are Induced in a Modeled Ischemia-Reperfusion Injury of Blood Brain Barrier. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Jul 31;20(15):3752. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/15/3752>
240. Kamińska D, Skrzycki M. Lipid droplets, autophagy, and ER stress as key (survival) pathways during ischemia-reperfusion of transplanted grafts. *Cell Biol Int* [Internet]. 2024 Mar 4;48(3):253–79. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbin.12114>
241. Lonati E, Corsetto PA, Montorfano G, Zava S, Carrozzini T, Brambilla A, et al. Lipid Reshaping and Lipophagy Are Induced in a Modeled Ischemia-Reperfusion Injury of Blood Brain Barrier. *Int J Mol Sci*. 2019 Jul;20(15):3752.
242. Van Valkenburgh J, Meuret C, Martinez AE, Kodancha V, Solomon V, Chen K, et al. Understanding the Exchange of Systemic HDL Particles Into the Brain and Vascular Cells Has Diagnostic and Therapeutic Implications for Neurodegenerative

- Diseases. *Front Physiol* [Internet]. 2021 Sep 6;12. Available from:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2021.700847/full>
243. Ting SM, Zhao X, Sun G, Obertas L, Ricote M, Aronowski J. Brain Cleanup as a Potential Target for Poststroke Recovery. *Stroke*. 2020 Mar;51(3):958–66.
244. Soupene E, Borja MS, Borda M, Larkin SK, Kuypers FA. Featured Article: Alterations of lecithin cholesterol acyltransferase activity and apolipoprotein A-I functionality in human sickle blood. *Exp Biol Med* [Internet]. 2016 Nov 24;241(17):1933–42. Available from:
<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1535370216657447>
245. Hirsch-Reinshagen V, Donkin J, Stukas S, Chan J, Wilkinson A, Fan J, et al. LCAT synthesized by primary astrocytes esterifies cholesterol on glia-derived lipoproteins. *J Lipid Res* [Internet]. 2009 May;50(5):885–93. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022227520308415>
246. Puig B, Brenna S, Magnus T. Molecular Communication of a Dying Neuron in Stroke. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 Sep 19;19(9):2834. Available from:
<http://www.mdpi.com/1422-0067/19/9/2834>
247. Grefkes C, Fink GR. Recovery from stroke: current concepts and future perspectives. *Neurol Res Pract* [Internet]. 2020 Dec 16;2(1):17. Available from:
<https://neurolrespract.biomedcentral.com/articles/10.1186/s42466-020-00060-6>
248. Cui-Wang T, Hanus C, Cui T, Helton T, Bourne J, Watson D, et al. Local zones of endoplasmic reticulum complexity confine cargo in neuronal dendrites. *Cell* [Internet]. 2012;148(1–2):309–21. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.056>
249. Heil CS, Wehrheim SS, Paithankar KS, Grininger M. Fatty Acid Biosynthesis: Chain-Length Regulation and Control. *ChemBioChem*. 2019;20(18):2298–321.
250. Takuma K, Yan SS, Stern DM, Yamada K. Mitochondrial Dysfunction, Endoplasmic Reticulum Stress, and Apoptosis in Alzheimer’s Disease. *J Pharmacol Sci* [Internet]. 2005;97(3):312–6. Available from:

http://www.jstage.jst.go.jp/article/jphs/97/3/97_3_312/_article

251. Rutkai I, Merdzo I, Wunnava S V., Curtin GT, Katakam PVG, Busija DW. Cerebrovascular function and mitochondrial bioenergetics after ischemia-reperfusion in male rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2019;39(6):1056–68.
252. Takuma K, Yan SS, Stern DM, Yamada K. Mitochondrial Dysfunction, Endoplasmic Reticulum Stress, and Apoptosis in Alzheimer’s Disease. *J Pharmacol Sci.* 2005;97(3):312–6.
253. Kuschner CE, Kim N, Shoaib M, Choudhary RC, Nishikimi M, Yin T, et al. Understanding physiologic phospholipid maintenance in the context of brain mitochondrial phospholipid alterations after cardiac arrest. *Mitochondrion* [Internet]. 2021 Sep;60:112–20. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567724921001100>
254. Talari NK, Mattam U, Meher NK, Paripati AK, Mahadev K, Krishnamoorthy T, et al. Lipid-droplet associated mitochondria promote fatty-acid oxidation through a distinct bioenergetic pattern in male Wistar rats. *Nat Commun* [Internet]. 2023 Feb 11;14(1):766. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-023-36432-0>
255. Tang TZ, Zhao Y, Agarwal D, Tharzeen A, Patrikeev I, Zhang Y, et al. Serum amyloid A and mitochondrial DNA in extracellular vesicles are novel markers for detecting traumatic brain injury in a mouse model. *iScience* [Internet]. 2024 Feb;27(2):108932. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2589004224001536>
256. Han Y, Yuan M, Guo YS, Shen XY, Gao ZK, Bi X. Mechanism of Endoplasmic Reticulum Stress in Cerebral Ischemia. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2021 Aug 2;15. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2021.704334/full>
257. Ivanova A, Atakpa-Adaji P. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and calcium at ER-PM junctions — Complex interplay of simple messengers. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2023 Aug;1870(6):119475. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167488923000460>

258. Dickson EJ, Jensen JB, Hille B. Regulation of calcium and phosphoinositides at endoplasmic reticulum–membrane junctions. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2016 Apr 15;44(2):467–73. Available from: <https://portlandpress.com/biochemsoctrans/article/44/2/467/67410/Regulation-of-calcium-and-phosphoinositides-at>
259. Ye J, Liu X. Interactions between endoplasmic reticulum stress and extracellular vesicles in multiple diseases. *Front Immunol* [Internet]. 2022 Aug 11;13. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.955419/full>
260. Koerner CM, Roberts BS, Neher SB. Endoplasmic reticulum quality control in lipoprotein metabolism. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2019 Dec;498:110547. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720719302497>
261. Han PP, Han Y, Shen XY, Gao ZK, Bi X. Enriched environment-induced neuroplasticity in ischemic stroke and its underlying mechanisms. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2023 Jul 7;17. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2023.1210361/full>
262. Frallicciardi J, Melcr J, Siginou P, Marrink SJ, Poolman B. Membrane thickness, lipid phase and sterol type are determining factors in the permeability of membranes to small solutes. *Nat Commun* [Internet]. 2022 Mar 25;13(1):1605. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-29272-x>
263. Lee AG. How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2004;1666(1–2):62–87.
264. Frallicciardi J, Melcr J, Siginou P, Marrink SJ, Poolman B. Membrane thickness, lipid phase and sterol type are determining factors in the permeability of membranes to small solutes. *Nat Commun*. 2022 Mar;13(1):1605.
265. Fung SH, Roccatagliata L, Gonzalez RG, Schaefer PW. MR Diffusion Imaging in Ischemic Stroke. *Neuroimaging Clin N Am* [Internet]. 2011 May;21(2):345–77. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1052514911000232>
266. Whiteley WN, Thomas R, Lowe G, Rumley A, Karaszewski B, Armitage P, et al. Do

acute phase markers explain body temperature and brain temperature after ischemic stroke? *Neurology* [Internet]. 2012 Jul 10;79(2):152–8. Available from: <https://www.neurology.org/doi/10.1212/WNL.0b013e31825f04d8>

267. Campos F, Blanco M, Barral D, Agulla J, Ramos-Cabrer P, Castillo J. Influence of temperature on ischemic brain: Basic and clinical principles. *Neurochem Int* [Internet]. 2012 Apr;60(5):495–505. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S019701861200054X>
268. Zhu K, Choi KH, Schweizer HP, Rock CO, Zhang YM. Two aerobic pathways for the formation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*. 2006;60(2):260–73.
269. Aguilar PS, De Mendoza D. Control of fatty acid desaturation: A mechanism conserved from bacteria to humans. *Mol Microbiol*. 2006;62(6):1507–14.
270. Chen L, Jin Y, Wu J, Ren Z. Lipid Droplets: A Cellular Organelle Vital for Thermogenesis. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2022;18(16):6176–88. Available from: <https://www.ijbs.com/v18p6176.htm>
271. Huang Y, Xie H, Pan P, Qu Q, Xia Q, Gao X, et al. Heat stress promotes lipid accumulation by inhibiting the AMPK-PGC-1 α signaling pathway in 3T3-L1 preadipocytes. *Cell Stress Chaperones* [Internet]. 2021 May;26(3):563–74. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1355814523005151>
272. Gurtovenko AA, Vattulainen I. Membrane Potential and Electrostatics of Phospholipid Bilayers with Asymmetric Transmembrane Distribution of Anionic Lipids. *J Phys Chem B* [Internet]. 2008 Apr 1;112(15):4629–34. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp8001993>
273. Burke KA, Yates EA, Legleiter J. Biophysical Insights into How Surfaces, Including Lipid Membranes, Modulate Protein Aggregation Related to Neurodegeneration. *Front Neurol* [Internet]. 2013;4. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2013.00017/abstract>
274. Gurtovenko AA, Vattulainen I. Membrane Potential and Electrostatics of

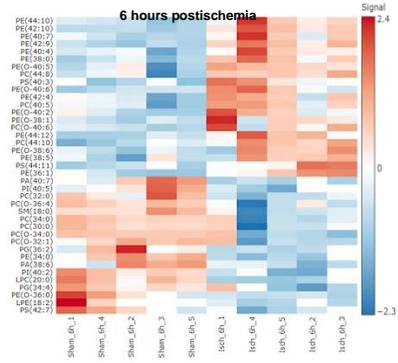
Phospholipid Bilayers with Asymmetric Transmembrane Distribution of Anionic Lipids. *J Phys Chem B*. 2008 Apr;112(15):4629–34.

275. Li J, Xin Y, Li J, Chen H, Li H. Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase: from Functions to Diseases. *Aging Dis* [Internet]. 2023;14(3):879. Available from: <http://www.aginganddisease.org/EN/10.14336/AD.2022.1025>
276. Zhao T, Goedhart CM, Sam PN, Sabouny R, Lingrell S, Cornish AJ, et al. PISD is a mitochondrial disease gene causing skeletal dysplasia, cataracts, and white matter changes. *Life Sci Alliance* [Internet]. 2019 Apr 11;2(2):e201900353. Available from: <https://www.life-science-alliance.org/lookup/doi/10.26508/lsa.201900353>
277. Aufschnaiter A, Kohler V, Diessl J, Peselj C, Carmona-Gutierrez D, Keller W, et al. Mitochondrial lipids in neurodegeneration. *Cell Tissue Res* [Internet]. 2017 Jan 23;367(1):125–40. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00441-016-2463-1>

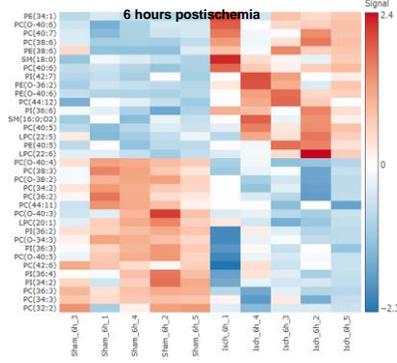
ANEXOS

MATERIAL SUPLEMENTARIO

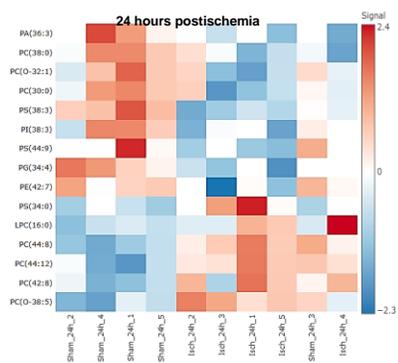
a. Hippocampal differential lipid species



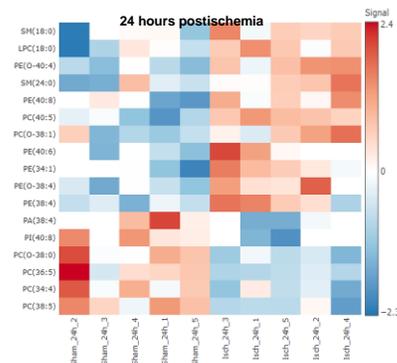
b. Serum differential lipid species



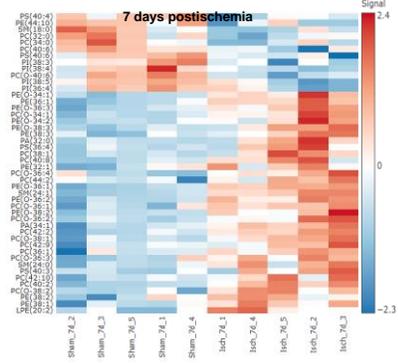
c. Hippocampal differential lipid species



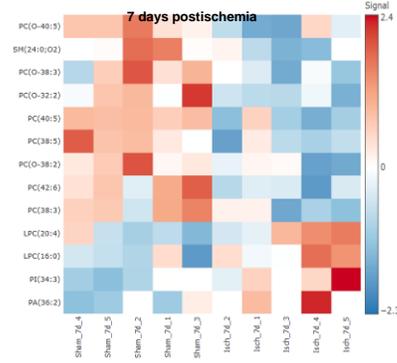
d. Serum differential lipid species



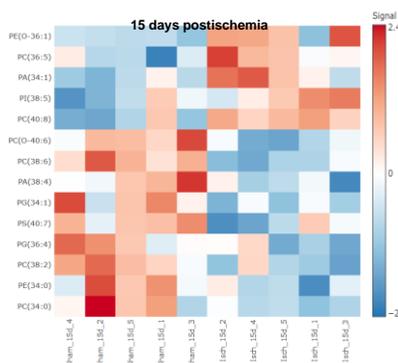
e. Hippocampal differential lipid species



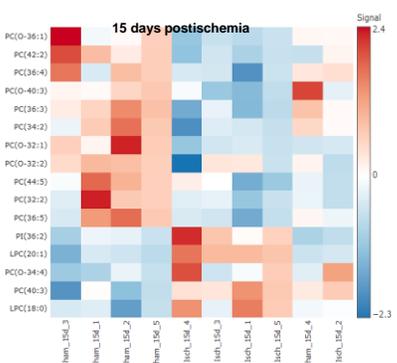
f. Serum differential lipid species

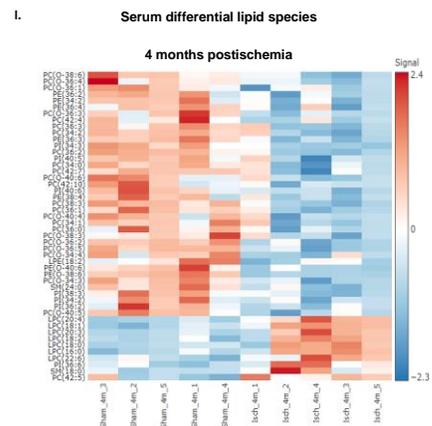
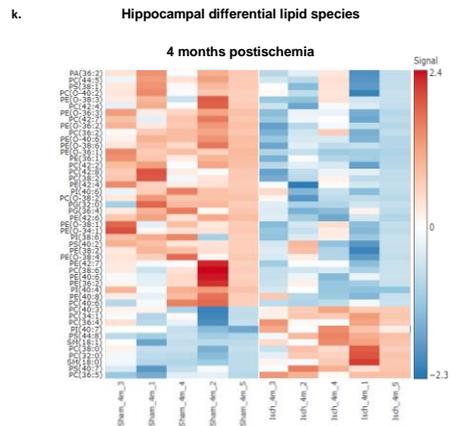
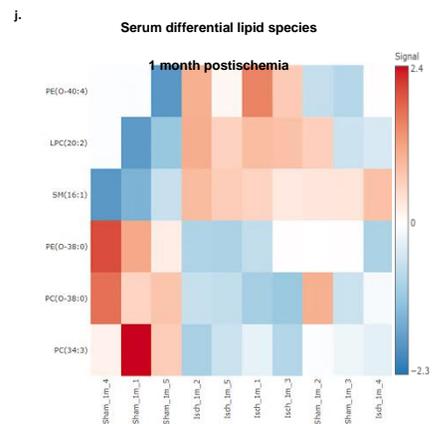
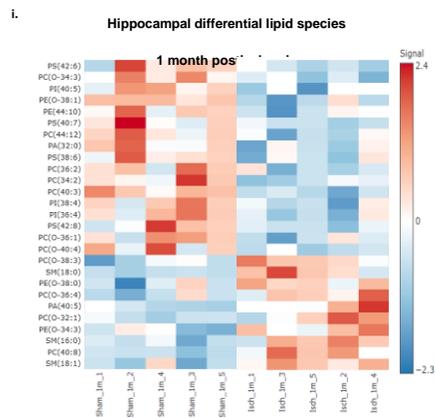


g. Hippocampal differential lipid species



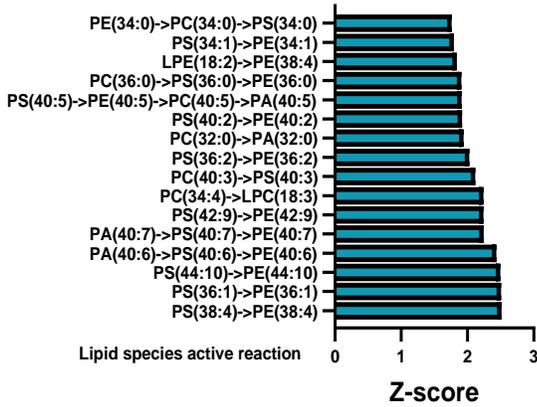
h. Serum differential lipid species



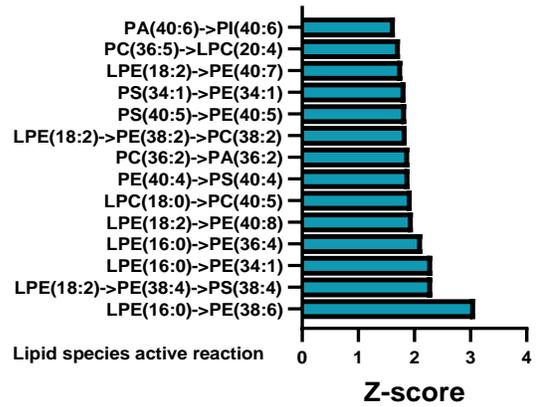


Suplementaria 1. Especies lipídicas significantes postischemia. Las especies significativas se agrupan en un mapa de calor jerárquico. Prueba t-student para datos paramétricos y prueba de Wilcoxon no paramétricas. (* $p > 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) conversión de distancia por medio de Test de Pearson.

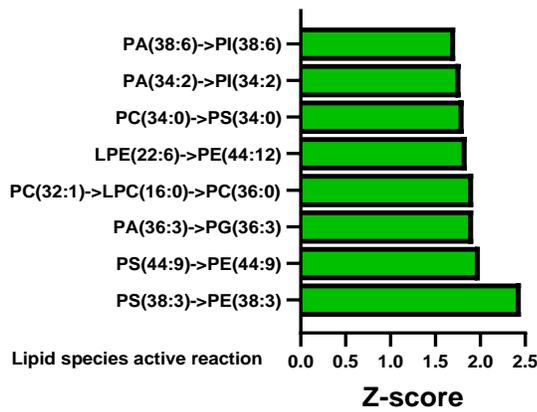
a. Hippocampus 6 hours



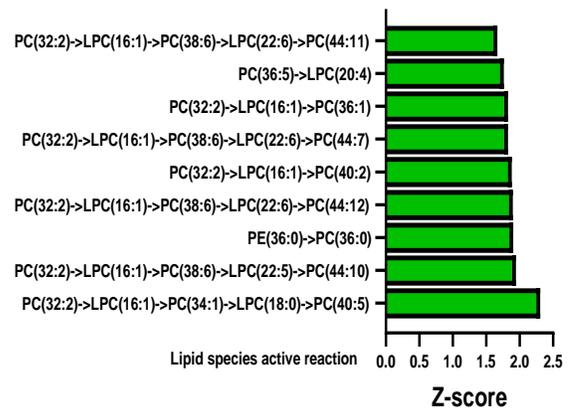
b. Serum 6 hours



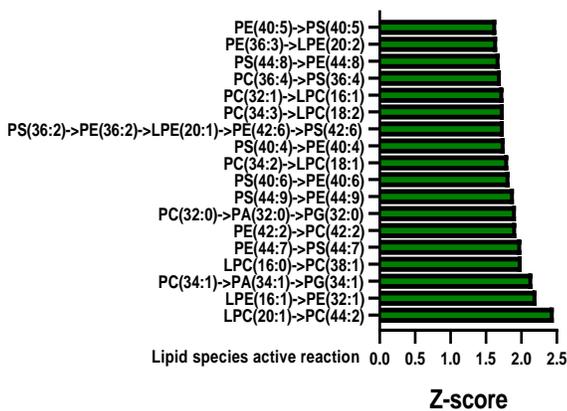
c. Hippocampus 24 hours



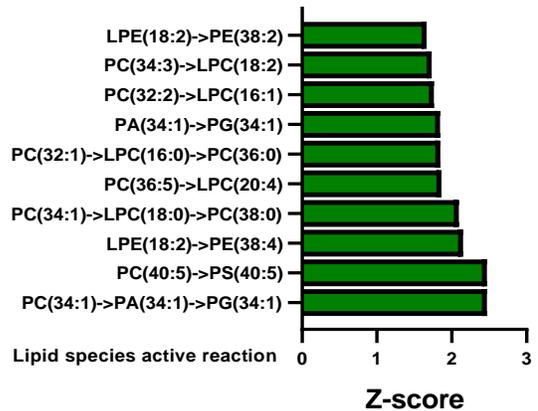
d. Serum 24 hours

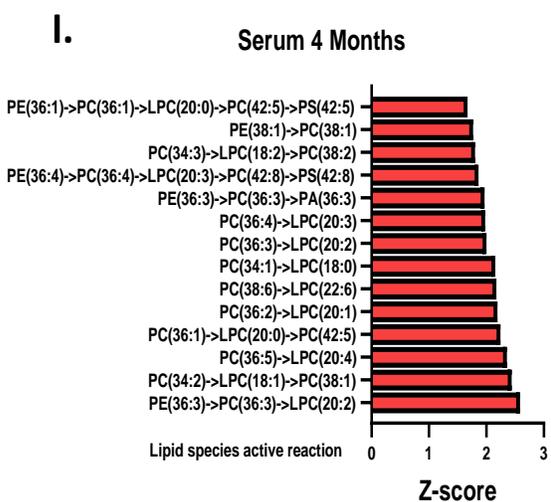
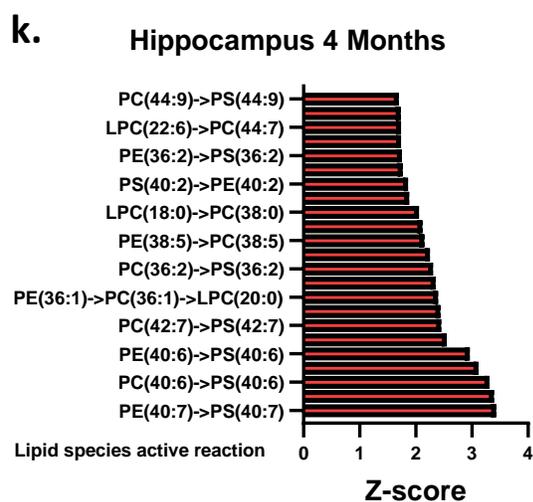
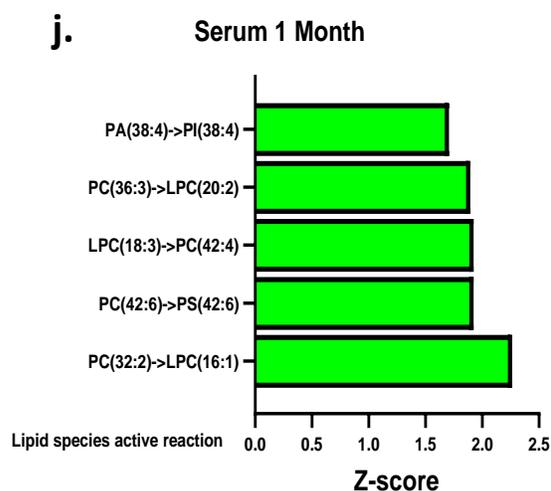
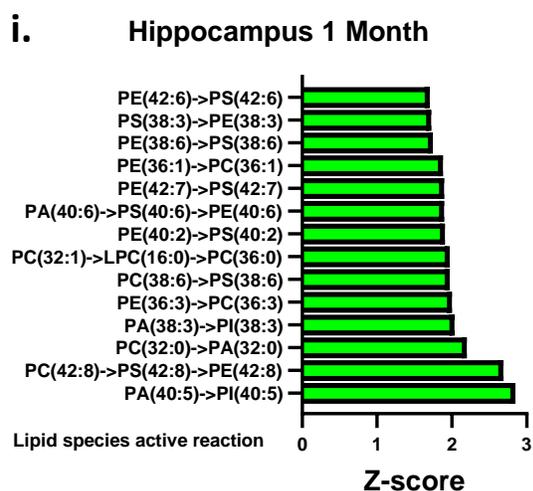
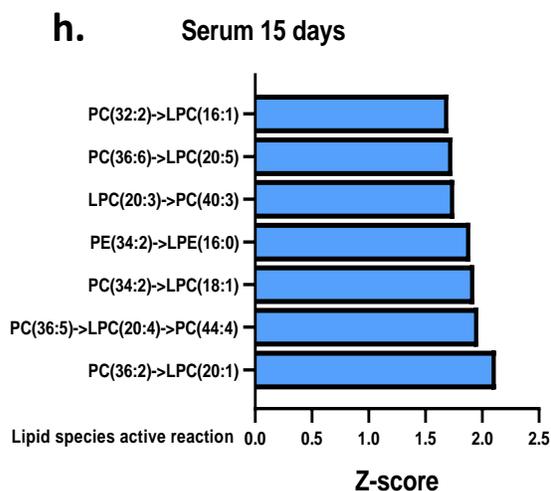
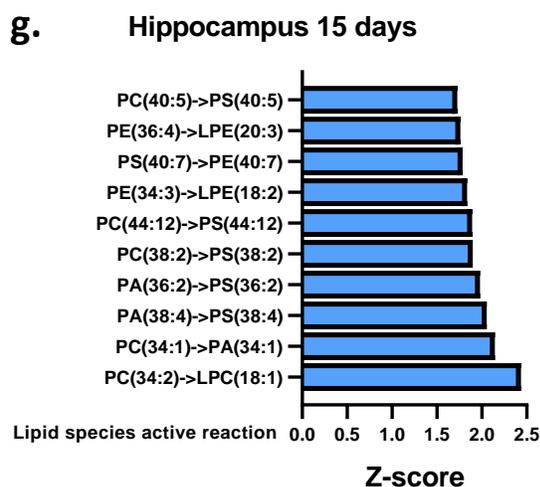


e. Hippocampus 7 days



f. Serum 7 days





Suplementaria 2. Enriquecimiento de reacciones fosfolipídicas. Combinación de análisis diferenciales t-studen y transformación a z-score. De forma predeterminada, BioPan calcula el valor P como el umbral de detección de las vías para que sea igual a 1,645. Para conocer el umbral de detección para el otro valor p se debe hacer el siguiente cálculo: $.05CDF^{-1}(1-Pvalue)$. (p=0.1 z=1.282) (p=0.05 z=1.645) (p=0.02 z=2.054) (p=0.01 z=2.326).

Cluster number	Cluster color	Gene count	Protein name	Protein description
1	Red	18	Lpcat1	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 1; Possesses both acyltransferase and acetyltransferase activities. Activity is calcium-independent (By similarity). Mediates the conversion of 1-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine (LPC) into phosphatidylcholine (PC). Displays a clear preference for saturated fatty acyl-CoAs, and 1-myristoyl or 1-palmitoyl LPC as acyl donors and acceptors, respectively. May synthesize phosphatidylcholine in pulmonary surfactant, thereby playing a pivotal role in respiratory physiology. Involved in the regulation of lipid droplet number and size (By similarity).
1	Red	18	Lpcat2	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 2; Possesses both acyltransferase and acetyltransferase activities. Activity is calcium-dependent. Involved in platelet-activating factor (PAF) biosynthesis by catalyzing the conversion of the PAF precursor, 1-O-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine (lyso-PAF) into 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PAF). Also converts lyso-PAF to 1-O-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PC), a major component of cell membranes and a PAF precursor. Under resting conditions, acyltransferase activity is preferred. Upon acute inflammatory stimulus, ac [...]
1	Red	18	Lpcat3	Lysophospholipid acyltransferase 5; Seems to be the major enzyme contributing to lysophosphatidylcholine acyltransferase activity in the liver. Favors unsaturated fatty acyl-CoAs as acyl donors compared to saturated fatty acyl-CoAs. Displays lysophosphatidylserine acyltransferase (LPSAT) activity (By similarity).
1	Red	18	Lpcat4	Lysophosphatidylcholine acyltransferase 4.
1	Red	18	Mboat1	Membrane-bound O-acyltransferase domain-containing 1; Belongs to the membrane-bound acyltransferase family.
1	Red	18	Mboat2	Membrane-bound O-acyltransferase domain-containing protein 2; Lysophospholipid acyltransferases (LPLATs) catalyze the reacylation step of the phospholipid remodeling pathway also known as the Lands cycle.
1	Red	18	Pemt	Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase; Catalyzes the three sequential steps of the methylation pathway of phosphatidylcholine biosynthesis, the SAM-dependent methylation of phosphatidylethanolamine (PE) to phosphatidylmonomethylethanolamine (PMME), PMME to phosphatidyltrimethylethanolamine (PDME), and PDME to phosphatidylcholine (PC).
1	Red	18	Pisd	Phosphatidylserine decarboxylase proenzyme, mitochondrial; Catalyzes the formation of phosphatidylethanolamine (PtdEtn) from phosphatidylserine (PtdSer). Plays a central role in phospholipid metabolism and in the interorganelle trafficking of phosphatidylserine.
1	Red	18	Pla2g4a	Cytosolic phospholipase A2; Selectively hydrolyzes arachidonyl phospholipids in the sn-2 position releasing arachidonic acid. Together with its lysophospholipid activity, it is implicated in the initiation of the inflammatory response.
1	Red	18	Pla2g4b	Phospholipase A2.
1	Red	18	Pla2g4c	Phospholipase A2 group IVC.
1	Red	18	Pla2g4d	Phospholipase A2.
1	Red	18	Pla2g4e	Phospholipase A2.
1	Red	18	Pla2g4f	Phospholipase A2.
1	Red	18	Plid1	Phospholipase D1; Implicated as a critical step in numerous cellular pathways, including signal transduction, membrane trafficking, and the regulation of mitosis. May be involved in the regulation of perinuclear intravesicular membrane traffic (By similarity).
1	Red	18	Plid2	Phospholipase D2; May have a role in signal-induced cytoskeletal regulation and/or endocytosis; Belongs to the phospholipase D family.
1	Red	18	Ptdss1	Phosphatidylserine synthase 1; Catalyzes a base-exchange reaction in which the polar head group of phosphatidylethanolamine (PE) or phosphatidylcholine (PC) is replaced by L-serine. In membranes, PTDSS1 catalyzes mainly the conversion of phosphatidylcholine. Also converts, in vitro and to a lesser extent, phosphatidylethanolamine (By similarity).
1	Red	18	Ptdss2	Phosphatidylserine synthase 2; Catalyzes a base-exchange reaction in which the polar head group of phosphatidylethanolamine (PE) or phosphatidylcholine (PC) is replaced by L-serine. PTDSS2 is specific for phosphatidylethanolamine and does not act on phosphatidylcholine (By similarity); Belongs to the phosphatidyl serine synthase family.
2	Yellow	4	Pla2g1b	Phospholipase A2; PA2 catalyzes the calcium-dependent hydrolysis of the 2-acyl groups in 3-sn-phosphoglycerides, this releases glycerophospholipids and arachidonic acid that serve as the precursors of signal molecules; Belongs to the phospholipase A2 family.
2	Yellow	4	Pla2g2a	Phospholipase A2, membrane associated; Catalyzes the calcium-dependent hydrolysis of the 2-acyl groups in 3-sn-phosphoglycerides. Thought to participate in the regulation of phospholipid metabolism in biomembranes including eicosanoid biosynthesis. Acts as a ligand for integrins. Binds to and activates integrins ITGA5:ITGB3, ITGA4:ITGB1 and ITGA5:ITGB1. Independent of its catalytic activity, activates integrins by binding to a site (site 2) which is distinct from the classical ligand-binding site (site 1) and inducing integrin conformational changes and enhanced ligand binding to site [...]
2	Yellow	4	Pla2g2d	Phospholipase A(2).
2	Yellow	4	Pla2g2f	Phospholipase A(2).
3	Green	3	Cdipt	CDP-diacylglycerol-inositol 3-phosphatidyltransferase; Catalyzes the biosynthesis of phosphatidylinositol (PtdIns) as well as PtdIns inositol exchange reaction. May thus act to reduce an excessive cellular PtdIns content. The exchange activity is due to the reverse reaction of PtdIns synthase and is dependent on CMP, which is tightly bound to the enzyme; Belongs to the CDP-alcohol phosphatidyltransferase class-I family.
3	Green	3	Cds1	Phosphatidate cytidyltransferase 1; Provides CDP-diacylglycerol, an important precursor for the synthesis of phosphatidylinositol (PtdIns), phosphatidylglycerol, and cardiolipin. Overexpression may amplify cellular signaling responses from cytokines. May also play an important role in the signal transduction mechanism of retina and neural cells (By similarity). May play an important role in phosphoinositide synthesis, prefers 1-stearoyl-2-arachidonoyl phosphatidic acid as substrate; Belongs to the CDS family.
3	Green	3	Cds2	Phosphatidate cytidyltransferase 2; Provides CDP-diacylglycerol, an important precursor for the synthesis of phosphatidylinositol, phosphatidylglycerol, and cardiolipin; Belongs to the CDS family.
4	Cyan	1	Ptpmt1	Phosphatidylglycerophosphatase and protein-tyrosine phosphatase 1; Lipid phosphatase which dephosphorylates phosphatidylglycerophosphate (PGP) to phosphatidylglycerol (PG) (By similarity). PGP is an essential intermediate in the biosynthetic pathway of cardiolipin, a mitochondrial-specific phospholipid regulating the membrane integrity and activities of the organelle (By similarity). Has also been shown to display phosphatase activity toward phosphoprotein substrates, specifically mediates dephosphorylation of mitochondrial proteins, thereby playing an essential role in ATP production. [...]
5	Blue	1	Pla2g2e	Phospholipase A2_group IIE (Predicted), isoform CRA_a.

Tabla Suplementaria 2. Genes asociados a la remodelación membranaral.

ARTÍCULOS ASOCIADOS

- **BACE1 AND SCD1 ARE ASSOCIATED WITH NEURODEGENERATION.**

Bedoya-Guzmán FA, Pacheco-Herrero M, Salomon-Cruz ID, Barrera-Sandoval AM, Gutierrez Vargas JA, Villamil-Ortiz JG, Villegas Lanau CA, Arias-Londoño JD, Area-Gomez E and Cardona Gomez GP (2023) BACE1 and SCD1 are associated with neurodegeneration. *Front. Aging Neurosci.* 15:1194203. doi: 10.3389/fnagi.2023.1194203

Received: 26 April 2023; **Accepted:** 03 August 2023.

Published: 08 September 2023.

 Frontiers in Aging Neuroscience

TYPE Original Research
PUBLISHED 08 September 2023
DOI 10.3389/fnagi.2023.1194203



BACE1 and SCD1 are associated with neurodegeneration

Ferley A. Bedoya-Guzmán¹, Mar Pacheco-Herrero^{1,2}, Ivan Daniel Salomon-Cruz¹, Angela Maria Barrera-Sandoval¹, Johanna Andrea Gutierrez Vargas^{1,3}, Javier Gustavo Villamil-Ortiz¹, Carlos Andres Villegas Lanau¹, Julián David Arias-Londoño⁴, Estela Area-Gomez⁵ and Gloria Patricia Cardona Gomez^{1*}

*CORRESPONDENCE
Gloria Patricia Cardona Gomez
gpcardona@guil.edu.co

RECEIVED 26 April 2023
ACCEPTED 03 August 2023
PUBLISHED 08 September 2023

CITATION
Bedoya-Guzmán FA, Pacheco-Herrero M, Salomon-Cruz ID, Barrera-Sandoval AM, Gutierrez Vargas JA, Villamil-Ortiz JG, Villegas Lanau CA, Arias-Londoño JD, Area-Gomez E and Cardona Gomez GP (2023) BACE1 and SCD1 are associated with neurodegeneration. *Front. Aging Neurosci.* 15:1194203. doi: 10.3389/fnagi.2023.1194203

COPYRIGHT
© 2023 Bedoya-Guzmán, Pacheco-Herrero, Salomon-Cruz, Barrera-Sandoval, Gutierrez Vargas, Villamil-Ortiz, Villegas Lanau, Arias-Londoño, Area-Gomez and Cardona Gomez. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Introduction: Proteolytic processing of amyloid protein precursor by β -site secretase enzyme (BACE1) is dependent on the cellular lipid composition and is affected by endomembrane trafficking in dementia and Alzheimer's disease (AD). Stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) is responsible for the synthesis of fatty acid monounsaturations (MUFAs), whose accumulation is strongly associated with cognitive dysfunction.

Methods: In this study, we analyzed the relationship between BACE1 and SCD1 *in vivo* and *in vitro* neurodegenerative models and their association in familial AD (FAD), sporadic AD (SAD), and cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) using microscopy, biochemical, and mass SPECT approach.

Results: Our findings showed that BACE1 and SCD1 immunoreactivities were increased and colocalized in astrocytes of the hippocampus in a rat model of global cerebral ischemia (2-VO). A synergistic effect of double BACE1/SCD1 silencing on the recovery of motor and cognitive functions was obtained. This neuroprotective regulation involved the segregation of phospholipids (PLs) associated with polyunsaturated fatty acids in the hippocampus, cerebrospinal fluid, and serum. The double silencing in the sham and ischemic groups was stronger in the serum, inducing an inverse ratio between total phosphatidylcholine (PC) and lysophosphatidylcholine (LPC), represented mainly by the reduction of PC 38:4 and PC 36:4 and an increase in LPC 16:0 and LPC 18:0. Furthermore, PC 38:4 and PC 36:4 levels augmented in pathological conditions in *in vitro* AD models. BACE1 and SCD1 increases were confirmed in the hippocampus of FAD, SAD, and CADASIL.

Conclusion: Therefore, the findings suggest a novel convergence of BACE-1 and SCD1 in neurodegeneration, related to pro-inflammatory phospholipids.

KEYWORDS
BACE1, SCD1, neurodegeneration, phospholipids, PUFAs, pro-inflammation

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a multifactorial neurodegenerative disorder that results in the progressive loss of memory and other emotional and cognitive dysfunctions. AD brains present with two main hallmarks, namely, extracellular neuritic plaques mainly composed of amyloid β (A β) fibrils and neurofibrillary tangles formed by hyperphosphorylated tau

Frontiers in Aging Neuroscience 01 frontiersin.org

PARTICIPACIÓN EN EVENTOS ACADÉMICOS

- II SIMPOSIO DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS – Medellín, Colombia - Asistente – 09 al 10 de Septiembre, 2022.
- XIII CONGRESO NACIONAL XIV SEMINARIO INTERNACIONAL DE NEUROCIENCIAS – COLNE IBRO – Cali Valle, Colombia – Asistente y Presentador - 20 al 22 de Abril, 2023.
“Firma fosfolípida prodrómica de disfunción cognitiva y demencia” - Poster.
- 30TH INTERNATIONAL STUDENT CONGRESS OF (BIO)MEDICAL SCIENCES ISCOMS – Groningen, Netherlands - Attendant and Participant - June 6 to 8, 2023.
“Signature of plasma phospholipid in neurodegeneration by ischemia” – Poster
- XIV SEMINARIO INTERNACIONAL EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS – Medellín, Colombia –Presentador - 14, 15 y 16 de Junio, 2023 – Modalidad Presentación Oral.
- MEDICAL SCIENCES SUMMER SCHOOL DATA SCIENCE AND AI IN HEALTH – Participant – UNIVERSITY MEDICAL CENTER OF GRONINGEN, UMCG - Groningen, Netherlands - 17 to 21 July, 2023.
- TALLER CIENCIA DE REDES CON APLICACIONES A LA INTERACCIÓN GÉNICA - Corporación de Ciencias Básicas Biomédicas Virtual - Octubre 2023, 40 horas.
- IX SIMPOSIO DE INVESTIGACIONES UNIVERSIDAD REMINGTON - Medellín, Colombia – Asistente y Presentador – 25 al 30 de Septiembre, 2023.
“Firma de fosfolípidos plasmáticos en neurodegeneración por isquemia” – Presentación Oral.
- XV SEMINARIO INTERNACIONAL EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS – Medellín, Colombia –Asistente y Presentador – 29 y 30 de Noviembre, 2023 – Modalidad Presentación Poster.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo agradezco a mi familia por brindarme apoyo incondicional en este proceso, a todos mis compañeros de laboratorio y de cursos por acompañarme y ayudarme a mejorar académicamente y personalmente.

Agradezco a mi tutora por todo su asesoría y guía, y al comité tutorial por todas las correcciones y enseñanzas.

Financiación: Proyecto Minciencias #82336 (2022- 2025) (GPCG)