



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral: Sobrecarga de cobre y enfermedad de Alzheimer, búsqueda de posibles blancos terapéuticos

Tesista: Zubillaga, Marlene

Directora: Arnal, Nathalie

Codirectora: Bellini, María José

Año: 2023

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata ha sido realizado en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata "Profesor Doctor Rodolfo R. Brenner", bajo la dirección de la Dra. Arnal Nathalie y co-dirección de la Dra. Bellini María José.

Dedicada a la memoria de mis tíos Coco y Elda

“La memoria guardará lo que valga la pena. La memoria sabe de mí más que yo; y ella no pierde lo que merece ser salvado.”

Eduardo Galeano

RECONOCIMIENTOS

A mi querida Argentina. Gracias a la Educación Pública que hoy ha formado a una profesional desde los cimientos.

Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP) de la Facultad de Ciencias Médicas (FCM), Universidad Nacional de La Plata (UNLP), por haberme brindado el espacio y los medios para la ejecución de esta Tesis.

A las Instituciones que han financiado mi trabajo de investigación:

- Comisión de Investigaciones Científicas (CIC)
- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)
- Universidad Nacional de La Plata (UNLP)
- Ministerio de Ciencia y Técnica (MinCyT)
- Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPyT)
- Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

AGRADECIMIENTOS

Sin lugar a dudas, el desarrollo de la presente Tesis Doctoral constituye un logro compartido con muchas personas que han contribuido con este trabajo a lo largo de estos años. Es a ellas a quienes dirijo este pequeño apartado.

En primer lugar, a mis directora y co-directora, Dra. Nathalie Arnal y Dra. Bellini María José, por su confianza y por abrirme las puertas de su laboratorio para poder realizar la presente tesis. Por enseñarme y alentarme a crecer, apoyando mis debilidades y potenciando mis virtudes.

A mis excelentes compañeras del 4to piso, hoy amigas: Sofi, Romi, Lu, Meli y Keni por ayudarme a crecer, por escucharme, aconsejarme y hacer de los días buenos los mejores y de los malos que no sean tan malos.

Mención especial para la Dra. Graciela Peterson con quien tuve el gusto de compartir charlas y café, quien me enseñó mucho sobre la ciencia y también sobre la vida. Ella, que hace ya dos años no está entre nosotros, estaría feliz de ver a su "chiqui" terminar este viaje. Gracias donde estés.

A todos los integrantes del INIBIOLP y de la Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, FCM-UNLP. Tuve el agrado de conocer a grandes personas y aprender mucho de ellas. Entre ellas, quiero mencionar especialmente al Dr. Horacio Heras y a la Dra. Maria González Baró, a ambos gracias por el apoyo incondicional para mi crecimiento profesional y académico.

A la Dra. Anna Collel por abrirme las puertas de su laboratorio para mi crecimiento profesional. Gracias por sus consejos, su paciencia infinita y por su ayuda incondicional.

Quiero agradecer profundamente a mi familia, pilar fundamental en mi vida personal y profesional.

A mi mamá por su amor incondicional y por enseñarme a renacer con más fuerza y resplandor después de enfrentar los desafíos más intensos.

A mi abuela Claudina, mi nona, quien me brinda su amor puro. Quien muestra siempre orgullo de la mujer en la que me he convertido. Gracias por tu ternura en forma de abuela.

A mi papá por inculcarme la cultura del trabajo y del esfuerzo. Por su aliento en los momentos difíciles y por su escucha cuando lo necesitaba.

A mis hermanas, Romi y Maru y a mi cuñado Joaquín, mis compañeras/os de vida y camino. Por enseñarme pacientemente todos los días a ser una mejor persona, por estar ahí desde siempre y para siempre. Gracias por su amor.

A mi sobrina Paloma y a mi sobrino Alfonso, por enseñarme que se puede sentir un amor tan genuino, infinito y único como el amor que siento por ellos. Son lo más importante de mi vida.

A todos y cada uno de mis amigos, los de Chacabuco y los que conocí en este camino de 10 años en la ciudad de La Plata. Gracias por su apoyo, su felicidad cuando algo me salía bien, su escucha y palabras en momentos de crisis. No me alcanzaría la vida para agradecerles el amor que me brindan

Al Básquet y a las compañeras y amigas que este deporte me dejó. Gracias por calmar mi mente y ayudarme a disfrutar como una niña. Al Quinto y su gente. A Guille. Pachita, Mauro, Santi y Mari que me cuidaron desde el primer día. Merecen todo lo bueno de este mundo.

A mis amigos del 631, Xenia, Tutu, Patri y Carlos. Gracias por abrirme las puertas del laboratorio y de sus corazones. Por hacerme sentir como en casa en otro país y darme esas ganas de volver.

A mi hija gatuna, Cheryl. Quien calma mi estrés y me enseña todos los días que lo más importante está en las cosas simples.

A mi amor, Matias. Gracias por tu dulzura, tu amor, por las risas y por ser un compañero incondicional. No habría sobrevivido estos últimos años de tesis sin tu ayuda y tu paciencia.

A mis tíos Coco y Elda, quienes padecieron esta enfermedad. Su lucha valiente contra las olas del olvido me demostraron que lo más importante y lo único que queda al final es el amor. Gracias por amarme, tengo en mi corazón un lugar enorme que atesora nuestros recuerdos.

¡Gracias por tanto amor!

ÍNDICE

RESUMEN.....	10
ABREVIATURAS.....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	16
1.1. Enfermedad de Alzheimer.....	16
1.1.1 Posibles causas de la EA: Hipótesis amiloidogénica.....	19
1.2 Papel del colesterol en la patogénesis de la EA.....	21
1.2.1 Colesterol en Balsas Lipídicas y procesamiento Amiloidogénico.....	22
1.3 El rol del Cu en la EA.....	24
1.3.1 Señalización redox y su implicancia en la EA.....	27
1.4 Relación entre el Cu y el colesterol en la EA.....	28
1.5 Neuroinflamación y EA.....	29
1.5.1 Hipótesis de neuroinflamación como evento inicial de la EA.....	29
1.5.2 Papel de las células gliales en la neuroinflamación.....	31
1.5.3 IGF-1 como neuroprotector/neuromodulador antiinflamatorio.....	33
1.5.3.1 Terapia génica con IGF-1.....	34
1.5.4 N-Acetilcisteína: un antioxidante con propiedades neuroprotectoras.....	35
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	36
2.1 Hipótesis.....	37
2.2 Objetivos.....	37
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
3.1 Reactivos.....	40
3.1.1. Para cultivos celulares.....	40
3.1.2. Para tratamientos <i>in vitro</i>	40
3.1.3 Para transfección de plásmidos y vectores virales.....	41
3.1.4. Para microscopía confocal.....	41
3.1.5 Para ensayos <i>in vitro</i>	41
3.1.6 Para Western Blot.....	41

3.1.7 Para la extracción de ARN, transcripción inversa (RT) y PCR.....	42
3.2 Modelos experimentales.....	42
3.2.1 Animales para obtención de cultivos.....	42
3.2.2. Cultivos celulares.....	43
3.2.2.1 Cultivos primarios de astrocitos.....	43
3.2.2.2 Cultivos primarios de Neuronas.....	43
3.2.2.1 Cultivo celular establecido.....	44
3.3 Diseños experimentales.....	44
3.4 Tratamientos experimentales.....	46
3.4.1. Tratamiento con Cu.....	46
3.4.2. Tratamientos antioxidantes.....	46
3.4.3 Tratamiento con A β	47
3.4.4 Terapia génica en astrocitos.....	48
3.4.5 Obtención de VE y medios sin VE para el tratamiento de neuronas.....	48
3.4.5.1 Medios condicionados completos y medio condicionado sólo con VE.....	49
3.4 Determinaciones.....	49
3.5.1 Viabilidad celular.....	50
3.5.1.1 Método de la Resazurina.....	50
3.5.1.2 Metodo del MTT.....	50
3.5.1.3 Evaluación de muerte por citometría de flujo	50
3.5.2 Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS).....	51
3.5.3 Actividad de la Superóxido dismutasa (SOD).....	51
3.5.4 Oxidación lipídica midiendo las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico.....	52
3.5.5 Medición de nitritos y nitratos [NO x] por reducción con vanadio.....	52
3.5.6 Carbonilos proteicos.....	52
3.5.7 Determinación de la concentración de Cu intracelular.....	53
3.5.8 Medición del colesterol total.....	53
3.5.9 Síntesis de colesterol <i>de novo</i> en astrocitos.....	54
3.5.10 Ensayo de Fagocitosis.....	54
3.5.11 Aislamiento mitocondrial y determinación de GSH.....	55

3.5.12 Visualización de la oligomerización de ASC en microglia.....	55
3.5.13 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).....	56
3.5.14 Ensayo del inflamasoma Caspase-1 Glo®.....	56
3.5.15 Western Blot.....	57
3.5.16 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	58
3.5.16.1 PCR Real-Time.....	58
3.5.16.2 Selfie qPCR.....	58
3.5.17 Determinación de proteínas.....	59
3.5.17.1 Bradford.....	59
3.5.17.2 Ácido bicinonítico (BCA)	59
3.6 Análisis estadísticos.....	60
4. RESULTADOS.....	61
4.1 ASTROCITOS.....	62
4.1.1 Síntesis de colesterol cerebral: Papel fundamental de los astrocitos.....	62
4.1.2 Reactividad de los astrocitos.....	64
4.1.3 Comunicación astrocito-neurona en la EA.....	66
4.1.4 Objetivos.....	67
4.1.5 Resultados.....	68
4.1.5.1 Astrocitos de Ratas Sprague-Dawley.....	68
4.1.5.1.1 Influencia del medio de cultivo condicionado derivado de astrocitos sobre los niveles de colesterol y APP en las balsas de membrana neuronales.....	74
4.1.5.1.2 Impacto de la terapia génica con IGF-1.....	75
4.1.5.2 Astrocitos de Ratones transgénicos APP/PS1.....	80
4.2 MICROGLIA.....	89
4.2.1 Microglia en la homeostasis cerebral.....	89
4.2.2 Microglia reactiva y EA.....	90
4.2.2.1 El papel de TREM2 y ApoE.....	92
4.2.2.2 Activación del inflamasoma.....	93
4.2.2.3 Microglia y colesterol.....	94
4.2.2.4 Microglía en el contexto de homeostasis aberrante del Cu.....	95

4.2.3 Objetivos.....	96
4.2.4 Resultados.....	96
5. DISCUSIÓN.....	106
6. CONCLUSIONES.....	117
7. BIBLIOGRAFÍA.....	121

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad progresiva que no tiene cura en la actualidad. En la mayoría de los casos su etiología es multifactorial, aunque menos del 6 % tiene una base genética o hereditaria. Una teoría importante sobre la patofisiología de la EA involucra un aumento del procesamiento amiloidogénico de la proteína precursora amiloide (APP), lo que conduce al aumento del péptido beta-amiloide (A β) 1-42. Este péptido forma oligómeros que desencadenan eventos que resultan en la formación de placas beta amiloides. El colesterol también está implicado en la formación de A β 1-42, ya que su aumento en las balsas lipídicas puede promover la formación de este péptido al activar las enzimas β y γ -secretasas (Xiong et al. 2008). Por otro lado, es de amplio conocimiento que los iones de cobre II (Cu) se hallan involucrados en la etiopatogénesis de la EA (Sparks & Schreurs, 2003; Squitti et al. 2005; Arnal et al. 2010a). Nuestro Grupo ha documentado que las personas pueden experimentar una sobrecarga de Cu de diversas formas (Arnal et al. 2011; Arnal et al. 2010b) y que los individuos con EA presentan niveles elevados de Cu libre (no unido a ceruloplasmina) en su sangre (Arnal et al. 2010a; Squitti et al. 2008). En este contexto, recientemente hemos demostrado en experimentos *in vitro* que concentraciones subletales de Cu tienen la capacidad de inducir la síntesis de colesterol *de novo* en neuronas inmaduras (Zubillaga et al. 2022).

En esta tesis doctoral, se demuestra por primera vez que los astrocitos derivados de crías hembra (ADCH) son más susceptibles a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) inducida por el Cu. Además, se ha observado que el tratamiento con Cu aumenta la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), indicando una respuesta reactiva de la glia, especialmente en ADCH. Además, se ha confirmado que niveles subletales de Cu pueden inducir la síntesis de colesterol *de novo* en cultivos de astrocitos de ratas Sprague-Dawley, modificando la expresión de factores clave, como la Proteína 2 de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP-2) y 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMGCR), y que este efecto también presenta dimorfismo sexual. En este sentido, parte de los resultados de esta tesis sugieren que los medios condicionados de astrocitos tratados con Cu afectan tanto los niveles de ROS en las neuronas como la distribución de la proteína APP y del colesterol en las membranas neuronales, lo que podría favorecer a la vía amiloidogénica.

Nuestro estudio también involucró cultivos de astrocitos de ratones transgénicos que sobreexpresan las proteínas APP y presenilina 1 (PS1) (APP/PS1) y reveló que estas células son más susceptibles a la producción de ROS cuando se exponen al Cu que los astrocitos WT. Los datos muestran que el tratamiento con Cu aumenta la expresión de genes relacionados con el metabolismo del colesterol y se asocia con un incremento en los niveles del mismo, especialmente en los astrocitos derivados de ratones APP/PS1. Por otra parte, se planteó la hipótesis de que el estrés oxidativo en las mitocondrias podría estar contribuyendo a los efectos del tratamiento con Cu. Los experimentos llevados a cabo respaldan esta idea, ya que se observó que los cambios inducidos por el Cu disminuían cuando las células eran tratadas con antioxidantes específicos dirigidos a las mitocondrias.

Además de los astrocitos, se estudiaron las células de la microglía y se observó que la exposición de dichas células al Cu, tanto solo como en combinación con A β , aumenta la generación de ROS y provoca una activación microglial con aumento del marcador Iba-1. También se evidenció una regulación de genes relacionados con la inflamación como los involucrados en la vía NLRP3 del inflamasoma, activada por los tratamientos con Cu y Cu en combinación con A β . Finalmente, pudimos observar un aumento en la liberación de IL-1 β , una citoquina proinflamatoria, al medio de cultivo.

En resumen, esta tesis destaca la relevancia de la neuroglia, en particular astrocitos y microglía, y su interacción con las neuronas en un contexto de neuroinflamación. Es importante mencionar que nuestro trabajo destaca cómo el estrés oxidativo mediado por el Cu tiene un papel importante en la alteración de la homeostasis del colesterol y en la promoción de respuestas inflamatorias en la neuroglía, apoyando la hipótesis inicial de que el Cu podría jugar un rol fundamental en la etiopatogénesis de la EA.

Abreviaturas

- AAS:** Espectrofotometría de absorción atómica
- A β :** Péptido beta-amiloide
- ABC:** Cassette de Unión a ATP
- ACAT1/SOAT1:** Acil-coenzima A: colesterol aciltransferasa 1
- ADCH:** Astrocitos derivados de crías hembra
- ADCM:** Astrocitos derivados de crías macho
- ADEV:** Vesículas extracelulares derivadas de astrocitos
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- ADNc:** Ácido desoxirribonucleico complementario
- ADNmt:** Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
- ADNn:** Ácido desoxirribonucleico nuclear
- ADNpol β :** ADN polimerasa β
- ADNpol δ :** ADN polimerasa δ
- ADNpol ϵ :** ADN polimerasa ϵ
- AGE:** Productos finales de la glicación avanzada
- AMP:** Adenosín monofosfato
- AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico
- APP:** Proteína precursora del amiloide
- AICD:** Dominio intracelular de APP
- ApoE:** Apolipoproteína E
- ARN:** Ácido ribonucleico
- ASC:** Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD
- BACE1 y BACE2:** Enzima de Corte de la Proteína Precursora del Amiloide 1 y 2 en el sitio Beta
- BHE:** Barrera hematoencefálica
- CASP1:** Caspasa 1
- CLU:** Clusterina
- COX-2:** Ciclooxygenasa 2
- Cp:** Ceruloplasmina
- CTR1:** Transportador de Cobre 1
- Cu:** iones de cobre II
- CTF α :** Fragmento carboxi-terminal de α de la Proteína Precursora del Amiloide

CTFβ: Fragmento carboxi-terminal de β de la Proteína Precursora del Amiloide

DAMP: Patrones moleculares asociados al daño

DAM: Moléculas asociadas al daño

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DMT1: Transportador de metales divalentes 1

EA: Enfermedad de Alzheimer

EAAD: Enfermedad de Alzheimer autosómica dominante

EAf: Alzheimer familiar o hereditario

EOFAD: Enfermedad de Alzheimer familiar de inicio precoz

Fe: Hierro

GSH: Glutación

HDL: Lipoproteína de alta densidad

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HMGCR: 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa

HIF-1α: Factor inducible por hipoxia 1-alfa

HS: Suero de Caballo

IFN-γ: Interferón-γ

IFU: Unidad de intensidad de Fluorescencia relativa

IGF-1: Factor de crecimiento similar insulina 1

IL-1β: Interleucina-1β

IL-6: Interleucina-6

IL-8: Interleucina-8

iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible

IP: Ioduro de propidio

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LPS: Lipopolisacárido

LRP1: Proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas

LRP2: Receptor de lipoproteínas de baja densidad 2

MDP: Muramil-dipéptido

MGNd: Microglía asociada a la enfermedad

MT: Menopausia

NAC: N -acetilcisteína

NF-κB: Factor nuclear-kappa B

NLRP1: NOD-like receptor family pyrin domain-containing protein 1

NLRP3: NOD-like receptor family pyrin domain-containing protein 3

NO: Óxido nítrico

NOX: NADPH-oxidasas

NTF: Ovillos neurofibrilares

O₂⁻: Anión superóxido

OH[·]: Radical hidroxilo

ONOO⁻: Peroxinitrito

PAMP: Patrones moleculares asociados a patógenos

PMD: Plegamiento incorrecto de proteínas

PMN: Neutrófilos polimorfonucleares

PS: Fosfatidilserina

PS1: Presenilina 1

PS2: Presenilina 2

R-IGF-1: Receptor de factor de crecimiento similar a la insulina 1

RE: Retículo Endoplasmático

RL: Radicales libres

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

sAPP α : Fragmento α soluble de la Proteína Precursora del Amiloide

sAPP β : Fragmento β soluble de la Proteína Precursora del Amiloide

SNC: Sistema nervioso central

SO₄⁻²: Ion sulfato

SOD: Superóxido dismutasa

TGF β : Factor de crecimiento transformador β

TGN: Red trans-Golgi

TLR: Receptor tipo Toll

TNF: Factor de necrosis tumoral

TREM2: Receptor de microglía 2

Trx: Tiorredoxina

Urf: Unidad relativa de fluorescencia

VE: Vesículas extracelulares

Zn: Zinc

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1 Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer esporádico (EA) fue descrita por primera vez por Alois Alzheimer en 1910. Se trata de un trastorno neurodegenerativo de tipo demencia, con una patogenia compleja que se caracteriza, desde una perspectiva anatómica, por la pérdida de neuronas y sinapsis, así como la presencia de placas seniles y degeneración neurofibrilar (Boller et al. 1997). Clínicamente se manifiesta como un deterioro lento y progresivo con pérdida de memoria, problemas para realizar tareas cotidianas, dificultad para comunicarse y cambios de personalidad (Donoso et al. 2001). La incidencia de la EA aumenta con la edad siendo de 15-20 % en personas de 80 años y de 30 a 50 % en mayores de 85 (Fornazzari et al. 1997; Kukull et al. 2000). Cabe mencionar que existe otro tipo de Alzheimer llamado Alzheimer familiar o hereditario (EAF), que comienza a edades más tempranas (55 años) y que está fuertemente ligado a la presencia de ciertas mutaciones como se describe a continuación. La EAF representa hasta el 5 % de los casos de EA evaluados en clínicas de memoria y engloba al menos 230 mutaciones en tres genes que codifican proteínas relacionadas tanto con la síntesis de la proteína precursora amiloide (APP), como con su proteólisis formando el péptido beta-amiloide (A β) (Lleó et al. 2002). Las presenilinas 1 y 2 (PS1 y PS2) son una familia de proteínas transmembrana que constituyen la subunidad catalítica de la enzima gamma-secretasa, encargada de escindir a la APP. Casi el 50 % de los individuos portadores de mutaciones en los genes que codifican para PS1, PS2 y APP han sido identificados en árboles genealógicos familiares que muestran una forma de herencia autosómica dominante de la EAF (Lleó et al. 2002; Janssen et al. 2003; Clarimon et al. 2009). Otro descubrimiento genético importante ha sido la identificación del alelo ϵ 4 de la apolipoproteína E (ApoE), una proteína implicada en el transporte del colesterol y otros lípidos, como el factor de riesgo genético asociado con la EA esporádica. La ApoE es sintetizada primariamente por el hígado y los astrocitos en el cerebro (Jackson et al. 2022). *ApoE4* impulsa, junto con el envejecimiento, la presencia de placas de A β y ovillos neurofibrilares en individuos con otros diagnósticos neuropatológicos primarios como esclerosis lateral amiotrófica, taupatías primarias y enfermedades con cuerpos de Lewy (Robinson et al. 2018). ApoE se

une a A β y efectúa la eliminación de A β en sus formas soluble y agregadas . Se cree que ApoE ϵ 4 es menos eficiente para mediar en la eliminación de A β (Deane et al. 2008).

En relación a la EA no familiar, si bien los síntomas clínicos se manifiestan principalmente en la vejez, es importante destacar que los cambios bioquímicos y estructurales en diversas regiones cerebrales comienzan décadas antes de la aparición de dichos síntomas (Viña & Lloret 2010). En cuanto a la predisposición al desarrollo de la EA, se han identificado más de 20 genes como factores de riesgo (figura 1), asociados principalmente a procesos inflamatorios, metabolismo del colesterol, reciclaje de vesículas endosómicas, etc. (Karch & Goate 2015). Si bien la presencia de estos genes de manera individual sólo aumentan ligeramente el riesgo de desarrollo de EA, cuando se combinan pueden casi duplicar la predicción de casos (Escott-Price et al. 2015).

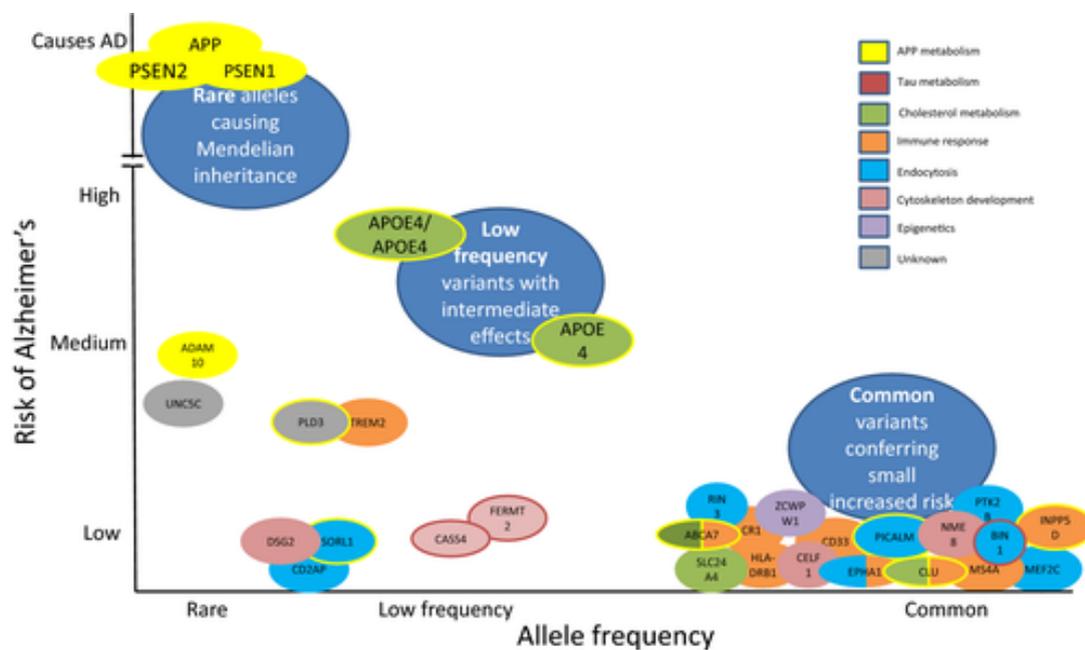


Figura 1: Genes considerados factores de riesgo en la EA hasta la fecha. El color interno corresponde a su función entendida. Cuando hay dos colores internos, el gen se ha implicado en más de una vía. También se cree que los genes encerrados en un círculo amarillo influyen en el metabolismo de la APP, mientras que los genes encerrados en un círculo rojo influyen en el metabolismo de tau. (Karch & Goate 2015).

Además, y dado que la mayoría de los casos de EA tardío no pueden ser explicados genéticamente, deben considerarse varios factores que parecen contribuir a su desarrollo (Henderson 1988) incluyendo:

- Edad
- Traumatismos craneales repetidos y otros daños cerebrales
- Algunas enfermedades como la diabetes y la enfermedad cardiovascular.

- Factores ambientales: el estrés, la falta de estimulación cerebral y la exposición a sustancias tóxicas .

Se han informado claras diferencias en la incidencia y prevalencia de esta neurodegeneración en mujeres cromosómicamente XX y hombres cromosómicamente XY (De Deyn et al. 2011). Algunos estudios epidemiológicos han documentado que las mujeres cis-género constituyen alrededor del 70 % de las personas que viven con EA, (Farrer et al. 1997). Se cree que este hecho podría deberse en parte a que dichas mujeres tienen una expectativa de vida mayor respecto a los varones cis-género, aunque esta mayor longevidad no explica totalmente la mayor incidencia en relación al sexo genético (Viña & Lloret 2010). Además, las mujeres cis-género con EA muestran un deterioro más rápido y pronunciado que los varones, mientras que el estado mental final es comparable (Chene et al. 2015). En diversos estudios realizados en roedores, se ha demostrado que con la edad la concentración de A β en ratones hembra supera a la de sus coetáneos macho (Wang et al. 2003; Carroll et al. 2010). A su vez, Schmid y col demostraron en un modelo de EA de ratón (Tg2576), que las hembras eran más susceptibles a los efectos tóxicos de A β que los machos (Schmid et al. 2018). Existen varias hipótesis biológicas que explicarían las diferencias sexuales en la EA, como las diferencias en la reducción de las hormonas sexuales relacionadas con la edad (estrógenos, progesterona, testosterona) y diferencias sexuales en la anatomía del cerebro de hombres y mujeres (Cui et al. 2013). Múltiples investigaciones coinciden en que la progresión de la menopausia incrementa la incidencia de trastornos neurológicos asociados con enfermedades neurodegenerativas comunes relacionadas con la edad como la EA (Pike, 2017). Además, se observa una disminución en la neuroesteroidogénesis durante la menopausia (Rosario et al., 2011), fenómeno que se agrava en los cerebros afectados por la EA (Schumacher et al. 2003). La relación entre la pérdida de estrógenos en mujeres posmenopáusicas y el riesgo de demencia encuentra respaldo en pruebas clínicas que indican una incidencia de EA de 2 a 3 veces mayor en mujeres que en hombres (Ryan et al., 2014). Por otra parte, Neu y col, observaron que las mujeres cis-género portadoras del alelo ApoE ϵ 4 tienen un mayor riesgo de desarrollar EA en comparación con hombres cis-género portadores del mismo alelo (Neu et al. 2017). Otros estudios epidemiológicos también han respaldado la idea de que la presencia de este alelo aumenta el riesgo de EA en mujeres (Farrer et al. 1997). Existe además un dimorfismo sexual en cuanto a la morfología de los astrocitos que se hace evidente desde el nacimiento (Mong & McCarthy 2002), lo que sugiere que pueden existir también diferencias sexuales tempranas en

las propiedades de las células gliales. Se cree que el dimorfismo sexual se produce a través de un efecto organizativo de los esteroides gonadales en los machos (Mong & McCarthy 2002). Además de los astrocitos neonatales, también se cree que el sexo influye en las propiedades de las células microgliales neonatales, incluida la expresión de genes proinflamatorios (Loram et al. 2012). El desarrollo de métodos confiables para aislar y mantener poblaciones de astrocitos sexados es esencial para analizar probables diferencias moleculares debidas a las diferencias sexuales, y sus posibles consecuencias en el desarrollo y gravedad de patologías como la EA. La influencia sexual en las respuestas de la microglía a los estímulos proinflamatorios ha sido bien documentada, aunque los mecanismos moleculares todavía se discuten (Hanamsagar & Bilbo 2016; Nelson & Lenz 2017; Loram et al. 2012; Rahimian et al. 2018). En relación a los astrocitos, hay poca información respecto a las diferencias sexuales en la sensibilidad de estas células a las sustancias proinflamatorias.

1.1.1 Posibles causas de la EA: hipótesis amiloidogénica

Existen diversas teorías que intentan explicar la etiopatogenia de la EA, una de las más prevalentes es la hipótesis amiloide, la cual sugiere que la acumulación de formas patológicas de $A\beta$ son producidas por la escisión secuencial de la APP, por parte de las enzimas β - y γ - secretasas en las neuronas (Hardy 1997). Se cree que la formación de ovillos neurofibrilares intraneuronales de proteína Tau hiperfosforilada (NFT) y la subsiguiente disfunción neuronal y neurodegeneración son procesos posteriores (Hardy & Selkoe 2002). El ensamblaje de $A\beta$ en estructuras multiméricas, denominadas oligómeros, es la clave de su efecto biológico. Se ha encontrado que los oligómeros de $A\beta$ tienen la capacidad de producir una desregulación de la liberación de neurotransmisores y calcio produciendo fallos en la sinapsis (Stutzmann et al. 2007). Además de oligómeros, $A\beta$ puede formar fibrillas insolubles que se agruparán formando las placas amiloides extracelulares características de la EA (Glenner & Wong 1984). Debido a que las concentraciones de $A\beta$ en fluidos intersticiales del cerebro son bajas es muy probable que la formación de fibrillas (nucleación) se lleve a cabo en la matriz extracelular o en la superficie celular donde el péptido se encuentra en mayor concentración. El crecimiento de las fibrillas (extensión) y la forma de la fibrilla amiloide dependen linealmente de la concentración del monómero de $A\beta$ (Estrada-Rodriguez & Zomosa-Signoret 2017). La hipótesis de que la presencia de las placas amiloides podrían ser la causa de desarrollo de la enfermedad (Masters et al, 1985) ganó terreno al

demostrarse que el A β es tóxico para neuronas en cultivo (Pike et al. 1991; Varadarajan et al. 1999). La formación de agregados amiloides en el organismo puede estar influenciada por diversos factores, como el envejecimiento, mutaciones genéticas, modificaciones postraduccionales y la concentración de los precursores amiloidogénicos (Masters et al. 2011) Estos factores desempeñan un papel crucial en la alteración de la eficacia de la proteostasis, que es el equilibrio y mantenimiento adecuado de las proteínas en el organismo. Como resultado de estas alteraciones, se forman los mencionados depósitos amiloides insolubles (Merlini & Bellotti 2008; Merlini & Westermark 2004).

Otra evidencia que apoya fuertemente el papel central de A β proviene de la genética: la mayoría de las mutaciones de EAF están vinculadas con genes involucrados en el procesamiento de APP dando como resultado una sobreproducción de formas tóxicas de A β . Por el contrario, una mutación sin sentido de APP (A673T) da como resultado una disminución en la escisión de APP por la β -secretasa, lo que confiere un riesgo clínico reducido para el desarrollo de EA (Jonsson et al. 2012). Si bien originalmente se pensó que el amiloide fibrilar dentro de las placas de núcleo denso era fundamental para el desarrollo de la EA, ahora se cree que los oligómeros de A β solubles pueden ser las formas más patológicas (Tolar et al. 2021). En este sentido, Forloni y col demostraron que oligómeros sintéticos de A β aplicados a cultivos de neuronas hipocampales pueden causar muerte neuronal por apoptosis (Forloni et al. 1993). Sumado a esto, Shankar y col demostraron que los oligómeros de A β solubles extraídos de cerebros con EA alteran significativamente la estructura y función de la sinapsis, siendo los dímeros las especies sinaptotóxicas más pequeñas (Shankar et al. 2008). Se ha informado que los agregados solubles de A β se encuentran elevados en lisados cerebrales acuosos de pacientes con EA temprano en comparación con lisados de pacientes con patología de placa de A β pero sin demencia (Esparza et al. 2013). Además, las placas pueden actuar como un reservorio desde el cual se difunden los oligómeros de A β (Selkoe & Hardy 2016). Aunque la acumulación de A β es un requisito fundamental para el diagnóstico de EA, el hecho de que muchas personas de edad avanzada presenten depósitos significativos de A β sin desarrollar síntomas demuestra que su presencia por sí sola no garantiza la manifestación de la demencia (Aizenstein et al. 2008).

1.2 Papel del colesterol en la patogénesis de la EA

Aunque el cerebro representa el 2 % del peso corporal total, contiene el 23 % de la reserva total de colesterol del cuerpo humano (Dietschy 2009). El colesterol es un componente esencial de las membranas celulares, donde regula la fluidez, el grosor y la curvatura intrínseca de las bicapas lipídicas (Yang et al. 2016). Tiene funciones clave en el sistema nervioso central (SNC), fundamentalmente como principal componente de la vaina de mielina que rodea los axones (Snipes & Orfali, 1998) y regulando la formación y liberación de las vesículas sinápticas (Segatto et al. 2014). Varias enfermedades neurodegenerativas, así como síntomas neurológicos y psiquiátricos, se han asociado con alteraciones en la homeostasis del colesterol (Golomb & Evans 2008; Dietschy 2009; Wang 2014; Segatto et al. 2014).

Se ha postulado que las neuronas son capaces de producir colesterol durante la vida prenatal, mientras que en el período postnatal reducen o abandonan esta producción tomando colesterol de los astrocitos (Mauch et al. 2001; Pfrieger, 2003). Cabe destacar que el metabolismo cerebral del colesterol está separado del resto del cuerpo, ya que la barrera hematoencefálica (BHE) impide el paso del colesterol sistémico hacia el cerebro, y viceversa (Pfrieger 2003; Qian et al. 2022). En el SNC, la homeostasis del colesterol está garantizada por el mismo conjunto de proteínas que en el hígado (Segatto et al. 2013; Segatto et al. 2014), y su transporte es llevado a cabo por lipoproteínas especializadas que contienen ApoE, las cuales son secretadas por los astrocitos (Brecht et al. 2004; Mahley et al. 2006; Kiray et al. 2016). Apo-E es el transportador principal de colesterol y posee tres isoformas conocidas como E2, E3 y E4, la presencia del alelo $\epsilon 4$ implica un alto riesgo de desarrollar EA (Strittmatter et al. 1993). Esta apolipoproteína se une a los numerosos receptores en la superficie celular para el suministro de colesterol y también puede unirse al $A\beta$ que inicia los eventos de toxicidad y conduce a la neurodegeneración y la disfunción sináptica en la EA (Oveisgharan et al. 2018). A su vez se ha demostrado que el complejo colesterol-ApoE acelera la extensión axonal cuando se aplica al extremo distal pero no al cuerpo celular de las neuronas (Karten et al. 2005; Hayashi et al. 2004). Se sabe que el metabolismo anormal del colesterol juega un papel crucial en el desarrollo de la EA.

1.2.1 Colesterol en balsas lipídicas y procesamiento amiloidogénico

APP es una proteína transmembrana que presenta un único dominio dentro de la membrana plasmática, y puede ser procesada de dos vías diferentes: 1- la vía amiloidogénica, que conduce a la generación de A β tóxico y 2- la vía no amiloidogénica, que impide la generación de A β tóxico (Haass 2004) (Figura 2).

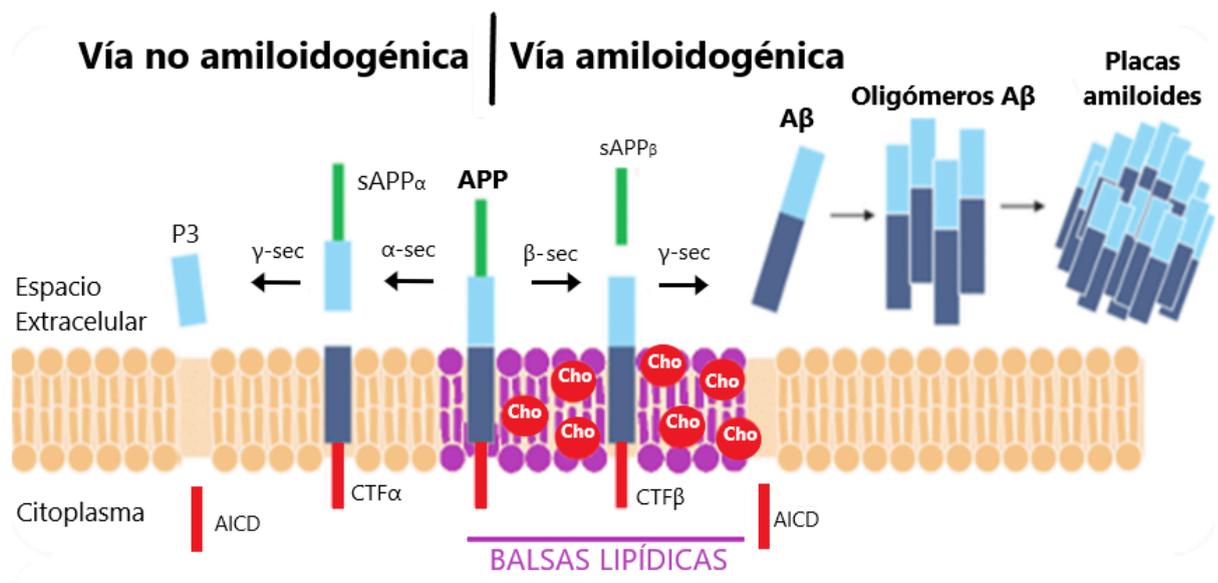


Figura 2: Esquema de las vías pro-amiloidogénica y no amiloidogénica de procesamiento de APP (Adaptada de Murphy et al. 2010)

Las balsas lipídicas son microdominios de la membrana plasmática que se caracterizan por presentar una mayor concentración de colesterol, esfingolípidos y proteínas transmembrana. En la vía no amiloidogénica, APP se encuentra fuera de estas balsas lipídicas y es escindida aproximadamente en el centro de la región A β por la actividad de α -secretasa (Esch et al. 1990; Sisodia 1992), generando los fragmentos APP soluble α (sAPP α) y CTF α . Luego, la enzima γ -secretasa cliva sAPP α liberando un péptido A β truncado llamado P3 (Haass et al. 1993), que aparentemente es patológicamente irrelevante, y el dominio intracelular de APP (AICD) (Gu et al. 2001; Weidemann et al. 2002), que se libera en el citosol y que puede tener una función en la señalización nuclear (Cao & Sudhof 2001; von Rotz et al. 2004). En la vía amiloidogénica, la β -secretasa cliva a APP dentro de dichas balsas lipídicas dando como resultado un fragmento β soluble (sAPP β) y un fragmento carboxi-terminal (CTF β). Este último es luego escindido por γ -secretasa como una "proteólisis intramembrana regulada" (Brown et al. 2000; Lichtenthaler et al. 2011), que es un proceso celular frecuentemente involucrado en importantes vías de señalización como

la escisión de APP, señalización del receptor de tipo Toll (TLR), señalización de Notch, entre otras (Selkoe & Kopan 2003; Thathiah & De Strooper 2011). En la escisión de la γ -secretasa en la vía amiloidogénica se libera $A\beta$ y el AICD. Se ha demostrado que APPs puede ser encontrado en fluidos extracelulares como en plasma o líquido cefalorraquídeo (LCR) (Seubert et al. 1992). Los péptidos que son cortados por la γ -secretasa en la posición 40 ($A\beta_{40}$) son los más abundantes (en una proporción del 80 a 90 % de todos los péptidos generados); a éste le sigue el de la posición 42 ($A\beta_{1-42}$). Las formas ligeramente más largas de $A\beta$, en especial $A\beta_{42}$, tienden a ser más hidrofóbicas y fibrogénicas, y son estas especies las principales en depositarse en el cerebro (Hardy & Higgins 1992).

Como se mencionó previamente, existen estudios que relacionan el metabolismo alterado del colesterol con el aumento de la producción de $A\beta$ en la patogénesis de la EA (Miller & Chacko, 2004 ; Wolozin, 2001; Wolozin 2004; Puglielli et al. 2005). Dado que la α -secretasa se encuentra en dominios abundantes en fosfolípidos y que tanto la β como la γ - secretasa residen en balsas lipídicas ricas en colesterol (Wahrle et al. 2002; Cordy et al. 2003), se sugiere que la modificación de los niveles de colesterol y/o la proporción de colesterol a fosfolípidos en la membrana celular podrían influir en las actividades de estas enzimas y determinar las vías preferenciales de procesamiento de APP (Miller & Chacko 2004; Wolozin, 2004; Kaether & Haass 2004). En este sentido, Wolozin hipotetizó que el colesterol elevado inhibe la α -secretasa y promueve las actividades de la β - y γ -secretasas (Wolozin, 2001). Por otro lado, varias investigaciones demuestran que los aumentos de colesterol favorecen la producción de $A\beta$, mientras que disminuciones del mismo inhiben la producción de este péptido (Simons et al. 1998; Cordy et al. 2003; Wang et al. 2021). Wahrle y col encontraron que la γ -secretasa se ubica en microdominios de membrana ricos en colesterol y que su actividad depende de los niveles de colesterol (Wahrle et al. 2002). Por el contrario, Abad-Rodríguez y col informaron que la reducción de colesterol en las neuronas del hipocampo disminuyó la generación de $A\beta$. Estos estudios proporcionan la evidencia de que el colesterol afecta las actividades de la secretasa β y γ en células cultivadas, aunque con resultados contradictorios (Wahrle et al. 2002; Abad-Rodríguez et al. 2004). Además del efecto del colesterol sobre las secretasas, se ha informado que el contenido de colesterol y la fluidez general (ordenada frente a desordenada) de las membranas son factores importantes en el anclaje de las proteínas amiloidogénicas a las membranas e influyen en sus tasas de fibrilación (Kim et al. 2006a). La creciente evidencia indica que la membrana celular es un objetivo común para las formas oligoméricas de proteínas amiloidogénicas (Kotler et al. 2015; Lin et al. 2001). Por un lado, las superficies de la membrana,

dependiendo de su composición química, pueden servir como sitios catalíticos que promueven el mal plegamiento y la agregación de proteínas amiloidogénicas unidas (Chi et al. 2008). Por otro lado, las proteínas amiloidogénicas alteran la integridad estructural de la membrana al permitir el paso no regulado de pequeñas moléculas e iones a través de la misma (Kayed et al. 2004; Sokolov et al. 2006; Volles et al. 2001).

1.3 El rol del Cu en la EA

Otro aspecto que consideramos en el desarrollo de esta tesis se basa en la creciente evidencia que demuestra que los niveles alterados de Cu pueden estar asociados con la patogénesis de la EA (Sparks & Schreurs 2003; Squitti et al. 2005; Arnal et al. 2010a). En este sentido, se ha reportado que los niveles de Cu libre aumentan en el suero de pacientes con EA en comparación con los controles sanos (Squitti et al. 2014, Squitti et al. 2002, Bucossi et al. 2011). Además, nuestro grupo observó que los niveles de Cu libre aumentan conforme se agrava la enfermedad (Arnal et al. 2010a). Este hecho resulta muy interesante ya que se ha demostrado, tanto *in vivo* como *in vitro*, que concentraciones elevadas de este metal son tóxicas ya que generan estrés oxidativo que trae aparejado el daño de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos en las células (Valko et al. 2005; Gupte & Mumper, 2009; Arnal et al. 2010b, 2014; Jiang et al. 2016; Zafar et al. 2016).

La posible exposición a una sobrecarga con Cu es más habitual de lo imaginado, ya que este metal es ampliamente utilizado en diversas industrias, por lo que puede contaminar el agua superficial y acuíferos, incluyendo las redes de agua potable (Buchanan et al. 1999; Riedel 2008). Las zonas urbanas y rurales son fuentes adicionales de contaminación, debido al uso de combustibles fósiles y pesticidas, respectivamente (Gunay et al. 2006). Otras fuentes de exposición son el uso de ciertos medicamentos como los anticonceptivos orales. En relación con esto último, se ha demostrado que la administración exógena de estrógenos puede aumentar los niveles séricos de Cu (Von Studnitz & D. Berezin, 1958) y también pueden hacerlo los dispositivos intrauterinos a base de Cu (Cobine et al. 2006; Arnal et al. 2010b).

Parecieran ser múltiples los mecanismos mediante los cuáles el Cu podría incidir en la EA. Por un lado se sabe que muchas moléculas implicadas en la patología de la enfermedad pueden unirse a este metal. Un ejemplo es APP, que presenta un dominio de unión al Cu que reduce el Cu (II) a Cu (I) y produce

estrés oxidativo (Multhaup et al. 1996). Es importante destacar que se han medido altos niveles de Cu en placas seniles en pacientes con EA (Noda et al. 2013). Algunos investigadores proponen que el exceso de Cu podría unirse directamente a los péptidos A β con alta afinidad, aumentando aún más la agregación de A β y provocando una mayor neurotoxicidad. (Atwood et al. 2004; Cheignon et al. 2018). La unión de Cu a A β conduciría a la formación de dímeros de A β más estables, lo que evitaría que se degraden a monómeros y, por lo tanto, funcionaría como núcleo en la formación de depósitos amiloides. (Atwood et al. 2004; Al-Hilaly et al. 2013; Streltsov et al. 2008). Se ha demostrado *in vitro* que el secuestro de Cu de los péptidos A β previene su acumulación y conduce a la degradación de A β , a la supresión de la producción de radicales hidroxilo (OH \cdot) y del daño oxidativo, lo que eventualmente reduciría la muerte celular (Cherny et al. 2001; Wu et al. 2008). Según los resultados obtenidos por Jaragh-Alhadad y col, se pudo concluir que nanopartículas de óxido de Cu (II) (CuO) aceleraron significativamente la formación de oligómeros de A β 1-42 de manera dependiente de la concentración, disminuyendo el tiempo necesario para la nucleación y la velocidad de formación de las fibras amiloides (Jaragh-Alhadad et al. 2022). Además, los oligómeros de A β 1-42 tratados con las nanopartículas de CuO fueron más tóxicos en comparación con los oligómeros no tratados. Estos oligómeros tratados provocaron la muerte celular, la permeabilización de la membrana, el estrés oxidativo y la apoptosis en la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Jaragh-Alhadad et al. 2022). Por otro lado se ha demostrado *in vitro* que el Cu (II), en concentraciones inferiores a las que podrían generar neurotoxicidad, es capaz de activar la microglia mediante la vía de señalización del factor nuclear-kappa B (NF- κ B) y aumentar la liberación de factores inflamatorios como el óxido nítrico (NO) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Hu et al. 2014). El NF- κ B es un factor de transcripción implicado en la expresión de una amplia gama de genes, la mayoría de los cuales codifican proteínas que desempeñan un papel en las respuestas inflamatorias celulares (Dalal et al. 2012; Hoffmann & Baltimore, 2006). A su vez, Singh y col encontraron un aumento en los niveles de Cu en capilares cerebrales aislados de ratones envejecidos asociados a una disminución en los niveles de LRP1 (proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas) (Singh et al. 2013). LRP1 es un receptor de superficie de varias células cerebrales, incluyendo el endotelio vascular, que desempeña un papel importante en la eliminación y el transporte a través de la BHE de diferentes moléculas en el cerebro, incluidos los péptidos A β (Storck et al. 2016). Kitazawa y col han informado que la existencia de complejos Cu-A β reduce la expresión de LRP1, reduciendo aún más la eliminación de A β neurotóxico, lo cual provoca un aumento de los depósitos cerebrales de ese péptido.

Finalmente, se le atribuye al Cu una acción proinflamatoria debido al potencial que tiene este metal para generar estrés oxidativo (Wei et al. 2014). Se sabe que el Cu puede generar ROS a través de las reacciones químicas de Fenton y Haber-Weiss o disminuyendo las concentraciones de glutatión (GSH), un potente antioxidante celular (Jomova & Valko, 2011). La primera se produce después de que el ion cúprico (Cu (II)) se reduce al ion cuproso (Cu (I)), el cual es capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) liberando OH⁻ (Romero et al. 2014) (Figura 3). El GSH afecta a la respuesta oxidativa manteniendo no disponible al Cu para las reacciones redox por quelación directa y como sustrato de varias enzimas que eliminan ROS (Valko et al. 2005). Por lo tanto el agotamiento de los niveles de GSH permite aumentar los efectos nocivos de ROS (Jomova & Valko, 2011). Además, durante la inflamación, las células del sistema inmunitario contribuyen a la explosión oxidativa produciendo anión superóxido (O₂⁻) y NO, pudiendo ambos reaccionar entre sí para producir especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Fischer & Maier, 2015). Estas especies son capaces de promover la fragmentación del ADN y la oxidación de lípidos, pero también destruir la ceruloplasmina (Cp), liberando iones Cu y potenciando la oxidación (Jomova & Valko, 2011). (Figura 4).

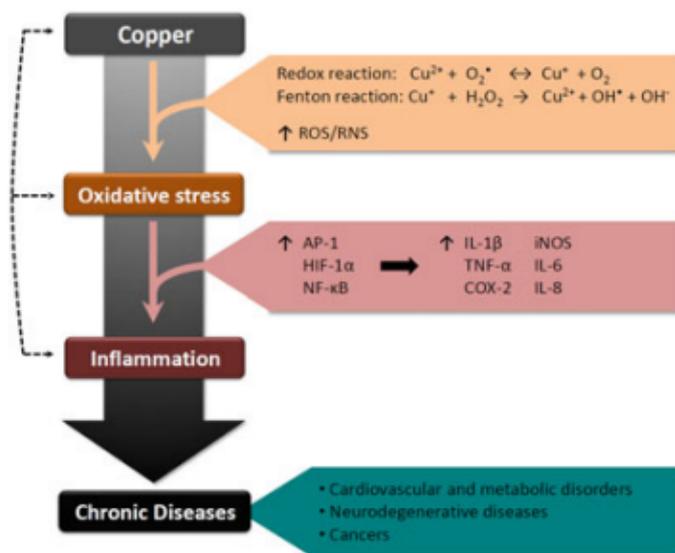


Figura 3: Inflamación inducida por el Cu. El Cu induce estrés oxidativo mediante reacciones redox que aumentan las ROS, que podrían inducir la activación de la proteína activadora-1 (AP-1) el factor inducible por hipoxia 1-alfa (HIF-1α) y Nf-κB, vías de señalización que regulan al alza las citocinas proinflamatorias y las quimiocinas que conducen a la inflamación (Pereira et al. 2016).

A continuación, las ROS/RNS no reguladas pueden provocar la activación de factores de transcripción como la proteína activadora-1 (AP-1), el factor inducible por hipoxia 1-alfa (HIF-1α) y el Nf-κB, los cuales activan vías de señalización para la inducción de respuestas inflamatorias (Fischer & Maier, 2015) (Figura 3). Además, el Cu puede activar, vía ROS mitocondriales, mediadores inflamatorios como la proteína

NOD-like receptor family pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) que induce el inflamasoma, un complejo de señalización que activa caspasa-1 e induce el procesamiento de citoquinas inflamatorias, particularmente la interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-18 (IL-18) (Zhou & Keane 2011a). La quelación del Cu inhibe la inflamación vascular y la aterosclerosis al atenuar la activación endotelial inducida por TNF, lo que refuerza el papel crítico del Cu en las respuestas inflamatorias sensibles a ROS (Wei et al. 2014).

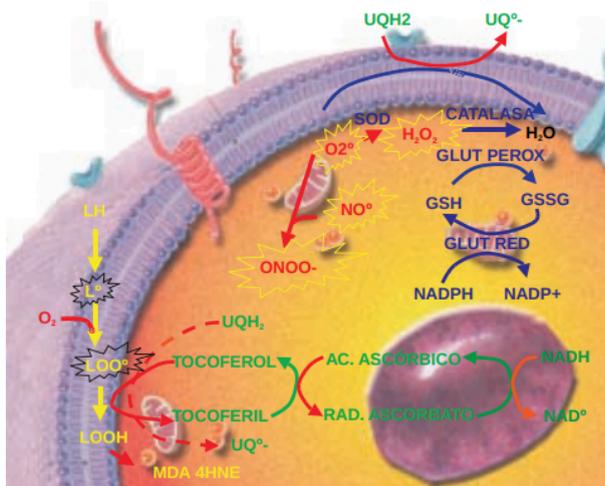


Figura 4: Esquema que resume la interrelación que existe entre las principales ROS y RNS con los sistemas de defensa antioxidante. El esquema muestra en rojo las ROS: superóxido ($O_2^{\bullet-}$), H_2O_2 . En anaranjado las RNS: óxido nítrico (NO^{\bullet}), y peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$). En amarillo productos metabólicos de las anteriores como lípidos oxidados (LH, L^{\bullet} y LOO^{\bullet}), así como los productos finales de su oxidación. En azul se muestran los sistemas de defensa antioxidante enzimáticos tales como: superóxido dismutasa (SOD), catalasa, GSH peroxidasa y los sistemas antioxidantes no enzimáticos; en verde ubiquitina (UQH₂), tocoferol, ácido ascórbico y dinucleótido de nicotín adenina (NADP).

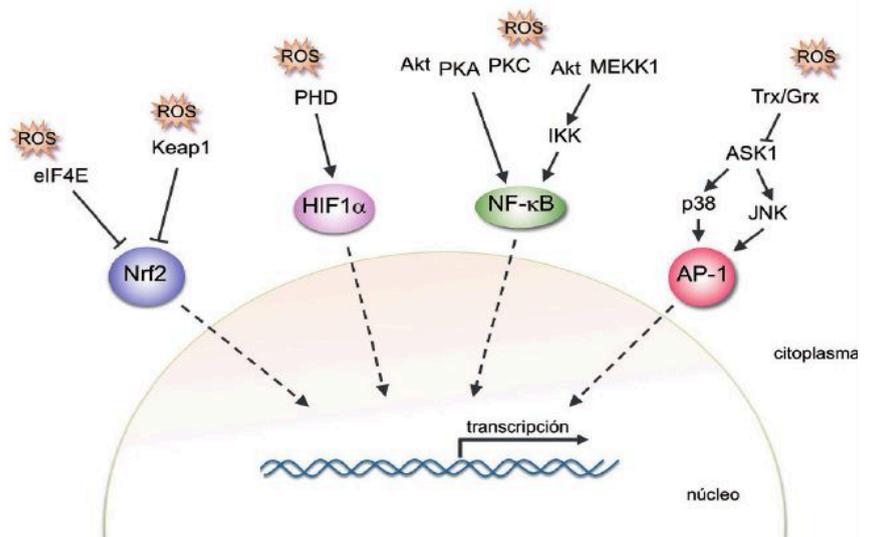
El Cu podría estar causando y/o aumentando la toxicidad oxidativa de los agregados proteicos (Kulkarni et al. 2006), o alternatively, generar estrés oxidativo, que sería el principal agente lesivo (Bush, 2003). La implicancia del Cu en la EA es relevante ya que algunos estudios en modelos animales de EA han demostrado un aumento significativo en la inmunorreactividad del péptido A β al ingerir Cu adicionado en el agua de bebida (Schreurs 2013). Una dieta baja en Cu (combinada con una dieta baja en grasas) es utilizada como estrategia para reducir el riesgo de EA en individuos con una predisposición genética a la enfermedad, lo que a su vez, reduce el riesgo de EA en individuos con una predisposición genética a la desregulación del Cu (Squitti et al. 2014). De hecho, reducir el Cu libre a niveles intermedios (superiores al mínimo e inferiores al normal) es beneficioso en enfermedades como la fibrosis, la inflamación y el cáncer (Brewer 2008).

1.3.1 Señalización redox y su implicancia en la EA

El término señalización redox, se utiliza para describir a las funciones reguladas por señales oxidativas que inducen respuestas celulares. Muchas de estas respuestas mediadas por las ROS protegen

a las células contra el estrés oxidativo y restablecen la homeostasis redox (Finkel 1998). Otros procesos fisiológicos que involucran a los mecanismos de óxido-reducción y los radicales libres (RL) son: la renovación de las membranas y fenómenos plásticos celulares, la supervivencia celular en el sistema nervioso durante etapas embrionarias, mitosis, migración celular, síntesis y liberación de algunas hormonas y factores de crecimiento, aumento de la transcripción de citocinas durante los procesos inflamatorios, hasta señalización celular por mecanismos de segundos mensajeros (Circu & Aw 2010). Se ha demostrado que niveles bajos de ROS estimulan la proliferación celular, mientras que niveles más altos tienen una acción inhibitoria. A pesar que altas concentraciones de ROS pueden promover un daño oxidativo masivo e indiscriminado, es posible que bajas concentraciones de ROS sean suficientes para activar genes específicos (figura 5). La presencia de H₂O₂ radiaciones ultravioletas y otras condiciones durante las cuales hay estrés oxidativo, induce la expresión de la oxidorreductasa tiorredoxina (Trx). La Trx, junto con el sistema de GSH, se ocupa de mantener un estado intracelular reducido.

Figura 5: Regulación de factores de transcripción mediante vías de señalización sensibles al estado redox. (Revista SEBBM, página 23 Edición 2021, Autora: Susana Cadenas)



1.4 Relación entre el Cu y el colesterol en la EA

La interacción entre las vías metabólicas del Cu y el colesterol en el cerebro es un área de investigación limitada. Estudios epidemiológicos y en animales demostraron que una dieta rica en grasas está asociada con el deterioro cognitivo y un mayor riesgo de EA (Morris et al. 2003; Sparks 2008). El alto consumo de Cu con una dieta rica en grasas saturadas y *trans* acelera aún más el deterioro cognitivo (Morris et al. 2006).

La evidencia experimental obtenida a partir de modelos de conejo y ratón sugiere que la asociación de sobrecargas de Cu y sobrecargas de colesterol puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de EA (Sparks & Schreurs 2003; Lu et al. 2006). Schreurs descubrió que el aumento de colesterol se relaciona con una disminución de la memoria a largo plazo. Además, pudo observar que la adición de Cu al agua de bebida de animales alimentados con dietas ricas en colesterol tendía a exacerbar el nivel de inmunorreactividad de A β (Schreurs 2013). Más aún, se han descrito aumentos en la transcripción de genes relacionados con la síntesis de colesterol en macrófagos en cultivo expuestos a elevada concentración de Cu (Svensson et al. 2003; Gutiérrez-Gracia et al. 2013). En relación esto, en nuestro laboratorio hemos demostrado recientemente *in vitro* que la exposición de células de neuroblastoma a sobrecargas subletales de Cu favorece la síntesis de colesterol *de novo* de dos maneras: 1- a través de la generación de ROS, que actuarían como segundos mensajeros posiblemente activando el factor de transcripción de unión a elementos reguladores de esteroides 2 (SREBP-2) (Forman et al. 2010; Fuhrman et al. 2009), y 2- a través del Cu, de manera directa, por medio de un mecanismo que aún no ha sido dilucidado (Zubillaga et al. 2022). En este sentido, hemos hipotetizado que los altos niveles de colesterol que se encuentran en la membrana celular, específicamente en las balsas de membrana, podrían promover la redistribución de APP en las mismas, favoreciendo el procesamiento amiloidogénico de esta proteína y finalmente aumentando los niveles de A β . (Zubillaga et al. 2022).

1.5 Neuroinflamación y EA

1.5.1 Hipótesis de neuroinflamación como evento inicial de la EA

La inflamación es una respuesta fisiológica del sistema inmunitario que sirve de protección frente a las lesiones tisulares, para destruir y/o eliminar los agentes perjudiciales y las células dañadas, favoreciendo así la reparación tisular (Oyinloye et al. 2015). En general, si no se controla la inflamación, los estímulos persistentes provocarán daño tisular, aunque la función principal del proceso inflamatorio sea limitar el daño (Newton & Dixit 2012). Este es exactamente el escenario de la inflamación crónica, que se asocia con varias enfermedades, entre ellas, las enfermedades neurodegenerativas (He et al. 2015a; Choo et al. 2013; Oyinloye et al. 2015).

La neuroinflamación juega un papel crítico en el inicio, la fisiopatología y la progresión de la EA (Kinney et al. 2018; Kwon & Koh 2020; Newcombe et al. 2018). El término "neuroinflamación" indica la

presencia de una respuesta inflamatoria en el SNC con la intervención de células gliales, específicamente los astrocitos y la microglía, en respuesta a un agente agresor (Kwon & Koh 2020; Bachiller et al. 2018). En una etapa temprana de la EA, las células inmunes del cerebro desempeñan un papel neuroprotector (Kinney et al. 2018). Sin embargo, a medida que la enfermedad progresa, las células gliales adquieren un fenotipo que lleva a un aumento de la producción de citoquinas proinflamatorias asociadas con el estrés oxidativo lo que, en última instancia, conduce a la neuroinflamación y la neurotoxicidad (Kwon & Koh 2020).

Existen diversos elementos que promueven el comienzo y avance de la neuroinflamación en la EA, los cuales pueden dividirse en factores intrínsecos y extrínsecos. Los factores intrínsecos que podrían potenciar la neuroinflamación en la EA incluyen el sexo, la edad y genotipo. Como se mencionó previamente, el sexo influye en la neuroinflamación debido principalmente a cambios en las hormonas esteroides y los receptores de estrógeno (Moser & Pike 2016). Con respecto a los factores extrínsecos, la toxicidad por sobrecarga de metales pesados podría aumentar la neuroinflamación al actuar como agentes catalíticos para las reacciones redox, incrementando así el estrés oxidativo (Barnham et al. 2004; Wei et al. 2014). Este último es un factor crítico en la patogénesis y progresión de la EA (Cheignon et al. 2018; Butterfield et al. 2018; Wang et al. 2013). El desequilibrio entre la producción de ROS, RNS y las defensas antioxidantes da como resultado la oxidación de proteínas y la peroxidación lipídica, entre otros efectos (Butterfield et al. 2002; Wang et al. 2013). Estos hechos podrían exacerbar aún más el efecto de la acumulación de A β y tau por diversos mecanismos, por ejemplo disminuyendo el clearance del péptido A β por la microglía reactiva (Argaw et al. 2006).

Cabe destacar que el estrés oxidativo puede ser tanto una causa como una consecuencia de la neuroinflamación (Solleiro-Villavicencio & Rivas-Arancibia 2018). Se sabe que el aumento de ROS y RNS median vías de señalización que resultan en la activación de astrocitos y microglia (Pawate et al. 2004). Por su parte, la microglía responde a los patrones moleculares asociados al daño (DAMP, por sus siglas en inglés) mediante el aumento de la producción de ROS, que se eleva y mantiene durante la enfermedad (Van Muiswinkel et al. 1996; Schilling & Eder 2011). Estas ROS microgliales probablemente contribuyen al estrés oxidativo asociado con la neurodegeneración, indicado por la peroxidación de lípidos (Lovell 1995; Praticò et al. 2004), la oxidación de proteínas (Hensley et al. 1995; Smith et al. 1991) y el daño del ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial (Mecocci et al. 1994).

En cuanto a los astrocitos, Vicente-Gutiérrez y col han investigado la posible función de estas células en la generación de ROS y su impacto en el metabolismo celular. En este trabajo se postula que estas células podrían mantener una respuesta antioxidante continua, afectando así al metabolismo celular (Vicente-Gutiérrez et al. 2019). Estos astrocitos son capaces de controlar la homeostasis redox al modular la actividad de las NADPH-oxidasas (NOX) y la síntesis de GSH, siendo esta última controlada por la actividad transcripcional del factor de transcripción Nrf2 en respuesta a las ROS. Además, en los astrocitos, las ROS mitocondriales desempeñan un papel esencial en la regulación fisiológica del metabolismo de la glucosa. La respuesta mitocondrial en los astrocitos es crucial para mantener la supervivencia neuronal al regular la bioenergética y el metabolismo redox (Vicente-Gutiérrez et al. 2019).

En relación a la respuesta inflamatoria, son las citocinas proinflamatorias, como la interleucina-6 (IL-6), (IL-1 β), el TNF, y el interferón- γ (IFN- γ) quienes median el proceso. Estas citocinas regulan la síntesis y secreción de Cp por parte del hígado (Malavolta et al. 2015). La expresión de Cp depende de los niveles de Cu, lo que establece una conexión entre la inflamación, el Cu y esta proteína (Mocchegiani et al. 2012). La Cp también puede promover respuestas inflamatorias por sí misma, a través de la liberación elevada de NO y la inducción de programas proinflamatorios mediados por TNF, IL-1 β , y ciclooxigenasa 2 (COX-2), NADPH oxidasa, iNOS (NO sintasa inducible), entre otras (Choo et al. 2013). Por otro lado, la inflamación puede desarrollarse como una de las respuestas bioquímicas al efecto nocivo del estrés oxidativo (Oyinloye et al. 2015), que es la consecuencia del desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad de detoxificar y evitar su acumulación (Fischer & Maier, 2015).

1.5.2 Papel de las células gliales en la neuroinflamación

Microglia

Las células de la microglía son consideradas los macrófagos residentes del SNC que representan aproximadamente el 10 % de todas las células en el cerebro (Lawson et al. 1990). Constituyen la primera línea de defensa celular contra patógenos invasores y otros tipos de lesiones cerebrales (Solito & Sastre 2012) y desempeñan un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis del SNC (Cabezas et al. 2014). En condiciones fisiológicas, la microglía desempeña un papel en la vigilancia inmune pero en condiciones patológicas como enfermedades neurodegenerativas, accidentes cerebrovasculares e invasión tumoral, la microglía se activa (Argaw et al. 2012). En las primeras etapas de la EA, la microglía

activada tiene un papel positivo en la eliminación de A β por fagocitosis. Sin embargo, después de una exposición prolongada, su eficiencia para eliminar A β se reduce y comienza a afectar negativamente al cerebro conduciendo a la acumulación de A β y a la posterior formación de placas extracelulares que estimulan continuamente la activación microglial (Argaw et al. 2006).

La sobreactivación de la microglía se caracteriza por cambios fenotípicos y morfológicos significativos acompañados de un aumento en la producción de las citoquinas proinflamatorias TNF α , IL-6, IL-1 β y NO (Argaw et al. 2006). Este fenotipo proinflamatorio de la microglía se vuelve dañino, resultando en una neuroinflamación crónica, exacerbando la pérdida neuronal y sináptica (Sun et al. 1997; Bisht et al. 2018).

Los estudios que utilizan modelos animales de EA han demostrado la presencia de microglía activada en los sitios de deposición de A β , lo que sugiere que estas células gliales podrían interactuar físicamente con A β y regular sus niveles en el cerebro (Cunningham et al. 2005; Holmes et al. 2003). En esta misma línea, se sabe que las placas seniles de la EA están formadas por un centro proteico rodeado de neuronas degeneradas (Katzman R & Saitoh T. 1991), así como de células de astrología y microglia.

Astroцитos

Los astroцитos son células gliales especializadas, que desempeñan un papel regulador de las funciones cerebrales, incluida la neurogénesis, la sinaptogénesis y el mantenimiento de la homeostasis de neurotransmisores y fluidos (Jo et al. 2014; Heneka et al. 2013; Liu et al. 2010), funciones que cumplen mediante la secreción de factores neurotróficos (Allen et al. 2012; Chung et al. 2015; Molofsky et al. 2014; Wheeler & Quintana 2019). Desempeñan un papel fundamental en la formación y mantenimiento de la BHE, que actúa como una barrera protectora entre la circulación sanguínea periférica y el cerebro. (Abbott et al. 2006; Sofroniew et al. 2015). Además, estas células actúan como una vía de eliminación de desechos neurotóxicos, incluidos A β y tau (Furman et al. 2012). La primera evidencia que implica a los astroцитos en los procesos patológicos de la EA proviene de la observación de que estas células gliales están asociadas a las placas seniles en los cerebros de pacientes con EA (Alzheimer 1906; Itagaki, et al. 1988 Heneka et al. 2015). Distintos estudios han reportado astrogliosis en el cerebro de modelos animales de EA (Matsuoka et al. 2001) y pacientes con EA (Nagele et al. 2003), donde los astroцитos reactivos se acumulan alrededor de las placas amiloides, rodeando los depósitos de A β de una manera que recuerda a la cicatrización glial (Wyss-Coray & Rogers 2012; Sajja et al. 2016). Tras la activación por A β o después de

una señal de daño o lesión, los astrocitos también participan en la secreción de citoquinas inflamatorias incluyendo IL-1, IL-6 y TNF- α , promoviendo así los procesos neurodegenerativos en EA (Sajja et al. 2016).

1.5.3 IGF-1 como neuroprotector/neuromodulador antiinflamatorio

En las neurodegeneraciones se alteran las propiedades del SNC y son producidas por el desencadenamiento de la muerte neuronal en distintas áreas cerebrales dependiendo del tipo de neurodegeneración. La pérdida de las sinapsis (DeKosky & Scheff 1990; Masliah 2001; Scheff & Price 2001) y la patología axonal (Raff et al. 2002) son probablemente las características neuropatológicas más importantes. La patología axonal implica la degeneración gradual del axón en una neurona afectada comenzando distalmente y avanzando hacia el cuerpo celular, teniendo un impacto negativo en la función neuronal (Raff et al. 2002). Además de las alteraciones en la plasticidad sináptica y la integridad de los circuitos neuronales maduros, recientemente se ha demostrado que el proceso neurodegenerativo en la EA está acompañado por alteraciones en la neurogénesis (Boekhoorn et al. 2006; Li et al. 2008, Jin et al. 2004; Dong & Greenough 2004; Lee et al. 2004; Haughey et al. 2002). Esto sugiere que la patogenia de la EA puede representar un ataque de dos frentes en el cerebro: 1- la degeneración de las neuronas maduras y 2- la interrupción de los nichos neurogénicos en el cerebro adulto (Crews & Masliah 2010).

El factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1) es una hormona peptídica de 7.5 kDa producida principalmente en el hígado y también en cantidades más pequeñas en otros órganos como el cerebro (Sonntag et al. 2005). Sin embargo, la mayoría del IGF-1 circulante es secretado por el hígado en respuesta a la hormona de crecimiento. De esta forma, el IGF-1 media la actividad anabólica y mitogénica de dicha hormona, ejerciendo acción paracrina en los diferentes tejidos (Laron 2001). La mayoría de las funciones biológicas del IGF-1 se producen a través de la unión a su receptor, R-IGF-1. Se ha observado que el R-IGF-1 se expresa ampliamente en el cerebro, siendo que IGF-1 juega un papel importante en la neurogénesis y el neurodesarrollo (O'Kusky & Ye 2012). Se cree que la mayoría de IGF-1 en el cerebro se transporta desde el suero a través de la BHE con la ayuda de megalina / LRP2 y LRP1 (Receptores de proteínas relacionados con el receptor de lipoproteínas de baja densidad 1 y 2) (Nishijima et al. 2010; Torres Aleman 2012). Es interesante remarcar que se demostró que los niveles de IGF-1 del hipocampo se correlacionan positivamente con los niveles séricos de IGF-1 en ratas Lewis homocigotas (dw/dw) (Yan et al. 2011).

El IGF-1 cerebral es importante para la función cognitiva y puede estimular la neurogénesis (Sun 2006) debido a que posee efectos neurotróficos, (proliferación celular, supervivencia, crecimiento de las neuritas y diferenciación) (Werther et al. 1993; Brooker et al. 2000). También se ha demostrado que el IGF-1 es un modulador específico de la formación de sinapsis, la liberación neurotransmisores y la excitabilidad neuronal (O'Kusky & Ye 2012; Ye et al. 2000; Torres Aleman 1999).

El descenso en los niveles cerebrales de IGF-1 con la edad (Miller & Gore 2001; Calvo et al. 2013) se relaciona con el deterioro de las funciones cognitivas asociadas al envejecimiento y a otras enfermedades neurodegenerativas (Rivera et al. 2005; Steen et al. 2005). Se sabe que, cuando hay daño por citotoxicidad en el hipocampo, la microglía de esta región aumenta sustancialmente la producción del IGF-1 (Breese et al. 1996). Además, se ha demostrado que cuando se produce estrés oxidativo el IGF-1 ejerce una acción protectora sobre los astrocitos colaborando con ellos en la protección neuronal (Genis et al. 2014). En este sentido, también se observó en ratas seniles que la administración del IGF-1 restaura la tasa de neurogénesis en el hipocampo (Lichtenwalner et al. 2001) y, parcialmente, su déficit cognitivo (Markowska et al. 1998).

El IGF-1 circulante ingresa al cerebro de manera dependiente de la actividad cerebral (Nishijima et al. 2010), y considerando que dicha actividad se encuentra desregulada en la EA (Jones et al. 2011), es probable que el flujo de IGF-1 desde la sangre al cerebro se vea afectado en esta patología (Zemva & Schubert 2014; Trueba-Sáiz et al. 2013). Esta observación se corresponde con una reducción en la relación entre IGF-1 en el LCR y en el plasma de pacientes con EA (Johansson et al. 2013; Westwood et al. 2014). Por otro lado, al evaluar el efecto del IGF-1 en cultivos de neuronas del hipocampo de ratas tratadas con derivados del péptido A β , se pudo prevenir y rescatar a los cultivos del daño neurotóxico (Doré et al. 1997). En conjunto la evidencia existente justifica la utilización del IGF-1 como agente neuroprotector.

1.5.3.1 Terapia génica con IGF-1

La Dra. Bellini, co- directora de esta tesis, demostró que el IGF-1 modula la respuesta inflamatoria en astrocitos en cultivo tratados con lipopolisacárido bacteriano (LPS) (Bellini et al. 2011). También se ha demostrado en modelos animales que la terapia génica con IGF-1 es capaz de modificar el número de células de la microglía y su fenotipo en cerebros de ratas seniles (Falomir-lockhart et al. 2019). Además se observó que modifica el comportamiento en forma dependiente del sexo en ratones machos y hembras

de 18 meses (Herrera et al. 2019 y 2020). Por otro lado, se ha observado que la implementación temprana de terapia génica con IGF-1 previene el estrés oxidativo y los déficits cognitivos inducidos por una lesión cerebral traumática en ratas Wistar (Montivero et al. 2021). En base a estos resultados, consideramos al estudio de la terapia génica con IGF-1 como un abordaje sumamente relevante en nuestros modelos.

1.5.4 N-Acetilcisteína: un antioxidante con propiedades pro-neurogénicas y neuroprotectoras.

Para contrarrestar los efectos producidos por ROS propusimos la utilización de un compuesto antioxidante: La *N*-acetilcisteína (NAC), un precursor de la *L*-cisteína. Esta molécula muestra propiedades neuroprotectoras, y es por ello que se utiliza en terapias para contrarrestar los efectos del estrés oxidativo en enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas cuando se la utiliza como fármaco (Bavarsad et al. 2014; Ooi et al. 2018).

Los estudios en modelos animales citados en la literatura científica han descrito que la NAC puede ingresar eficazmente a través de la BHE aumentando los niveles de GSH en el cerebro (Neuwelt et al. 2001; Farr 2003). Esta peculiaridad de NAC puede ser un factor crucial en las terapias de trastornos neurológicos en las que se observaron variaciones en los niveles de GSH y vías redox. Asimismo, varias formas de daño y degeneración neuronal están asociadas al daño excitotóxico que está relacionado con la activación y regulación de receptores de *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA). Entre sus diversas propiedades, la NAC ha mostrado propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Como antioxidante, NAC neutraliza los radicales libres antes de que puedan causar daños en las células (Ramos-Villegas et al. 2017). Esto es posible gracias a que NAC aumenta los niveles de cisteína/GSH en las células y actúa como un eliminador de especies oxidantes. La NAC es un compuesto de cisteína acetilado que puede ser oxidado por una variedad de compuestos radicales (Samuni et al. 2013), encargándose de mantener el GSH celular reducido y manteniendo así un balance redox dentro de las células (Pardini 1995). Las acciones de NAC consisten no sólo en restaurar el potencial antioxidante en las células al reponer el agotamiento de GSH por los radicales libres y en la eliminación de ROS, sino también como sustancia antiinflamatoria. En este rol, la NAC puede limitar la liberación de citoquinas en el estado temprano de proliferación inmune (Samuni et al. 2013). En un estudio *in vivo* con ratones transgénicos APP/PS1, se demostró que la NAC administrada por vía oral en el agua potable antes de la aparición de la enfermedad puede disminuir el

daño oxidativo en las neuronas, reducir la oxidación de proteínas y lípidos, así como la nitración de proteínas en comparación con ratones control (Huang et al. 2010).

En el cerebro con EA y cultivos neuronales expuestos a A β , las células mostraron estar en apoptosis (Estus et al. 1997). Al respecto se sabe que las vías de señalización implicadas en la cascada de señalización de la apoptosis se modifican por una alteración del estado redox debido a la NAC (Hsiao et al. 2008; Xu et al. 2009). Algunas vías de señalización relacionadas con la apoptosis, como la activación de la vía Ras/ERK, están involucradas en la protección de NAC contra A β . (Hsiao et al. 2008; Xu et al. 2009). Se han observado efectos neuroprotectores de la NAC frente al tratamiento con ácido araquidónico en diferentes modelos neuronales y gliales *in vitro* (Pawlas et al. 2009).



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis

Considerando lo resumido en el capítulo introductorio se postulan las siguientes hipótesis de trabajo:

1. La exposición de células en cultivo a sobrecargas subletales de Cu afectan el metabolismo del colesterol celular modulando la transcripción y traducción de proteínas implicadas tanto en su síntesis como en su transporte. Además provocan estrés oxidativo-nitrativo, teniendo las mitocondrias un papel clave en este estrés, y dañando biomoléculas esenciales como lípidos, proteínas y ADN.
2. La activación de las diversas vías de señalización UPR (respuesta a proteínas desplegadas) asociadas al estrés de retículo endoplásmico (RE), en presencia de sobrecargas subletales de Cu, tiene un impacto significativo en la biosíntesis de colesterol.
3. El Cu modifica el metabolismo del colesterol, este efecto junto con la generación de estrés oxidativo-nitrativo favorece la formación de A β .
4. Las células de la microglía expuestas a sobrecargas subletales de Cu, presentan una producción de ROS mitocondrial aumentada y activan el inflammasoma vía NLRP3, lo que influye en su capacidad fagocítica y modifica su respuesta inflamatoria.

2.2 Objetivos

A partir de las hipótesis propuestas, el **objetivo general** de esta tesis es **investigar los mecanismos de acción del Cu que podrían contribuir al desarrollo de la EA**.

Al estudiar el efecto del Cu sobre las rutas bioquímicas que intervienen en la regulación de la homeostasis del colesterol en cultivos primarios de astrocitos, la generación de estrés oxidativo/nitrativo e inflamación en astrocitos y microglía nos proponemos identificar posibles blancos terapéuticos para el tratamiento de esta patología. Para corroborar nuestras hipótesis y alcanzar nuestro objetivo general se plantean los siguientes **objetivos específicos**:

1. Analizar los niveles de Cu (espectrofotometría) y colesterol (total, libre y esterificado) tanto intracelulares como extracelulares en cultivos celulares de astrocitos y microglia.
2. Estudiar el metabolismo del colesterol y los niveles del factor de transcripción SREBP-2. Para la absorción y excreción del colesterol se analizarán transportadores de la familia ABC (ABCA-1) y el receptor de LDL.
3. Evaluar la generación de estrés oxidativo/nitrativo por medio del análisis de enzimas del sistema de defensa antioxidante (SDA), marcadores de daño a biomoléculas y niveles de ROS.
4. Investigar la respuesta inflamatoria de la neuroglia midiendo la expresión interleuquinas proinflamatorias (IL-6 y $TNF\alpha$) y antiinflamatorias (IL4,IL10).
5. Analizar los niveles de APP en las balsas lipídicas y el péptido $A\beta$ en medio de cultivo, como indicadores de posible neurodegeneración de tipo Alzheimer.
6. Evaluar la acción neuro restauradora/antiinflamatoria y el efecto sobre el metabolismo lipídico de la transferencia génica del IGF-1 ante la sobrecarga de Cu.
7. Analizar la activación de las distintas vías de señalización UPR (respuesta a proteínas desplegadas) ligadas a estrés de RE en presencia de sobrecargas subletales de Cu, y su influencia sobre la biosíntesis de colesterol.

**MATERIALES Y
MÉTODOS**

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos

3.1.1. Para cultivos celulares

- “Medio Eagle modificado de Dulbecco: Mezcla de nutrientes F12” (DMEM/F12) (Emeve, laboratorio MicroVet SRL, Argentina)
- Medio Neurobasal (Gibco, ThermoFisher Scientific).
- Buffer fosfato salino (PBS) (Gibco, ThermoFisher Scientific)
- Penicilina-Estreptomicina (1X) (Laboratorio Serendipia, Colombia)
- Suero fetal bovino (SFB) (Natocor, Córdoba, Argentina)
- Suero de caballo (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO).
- poli-D-lisina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)
- GlutaMAX (GibcoThermoFisher Scientific)
- Glucosa (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)
- Mezcla de vitaminas (Microvet, Argentina)
- Plasmocin™ (InvivoGen, San Diego, CA)
- DNasa I (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)
- Tripsina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)

3.1.2. Para tratamientos *in vitro*

- Sulfato cúprico pentahidratado (CuSO₄) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)
- N-Acetilcisteína (NAC) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)
- Tert-butil hidroperóxido (TBH) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)
- Sal de clorhidrato de Aβ (1-42) humana (Bachem, Bubendorf, Suiza,
- Glutación etil éster (GSH) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)
- Mitoquinona (MitoQ) (Hycultec, Alemania)
- MitoTEMPO (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)
- AlamarBlue® (Thermo Fisher Scientific)
- MTT (Thermo Fisher Scientific).

3.1.3 Para transfección de plásmidos y vectores virales

- Medio Opti-MEM
- Lipofectamina P300 (Invitrogen)
- Plásmido pLEX-MSC-ASC-GFP (Addgene plásmido #73957; RRID:Addgene_73957)
- Vector RAd-IGF-1

3.1.4. Para microscopía confocal

- Beads Amarillas-verdes fluorescentes (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)
- CellMask™ Orange (Thermo Fisher Scientific)
- DAPI (Invitrogen™)
- Paraformaldehído (PFA) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)
- Cámara μ -Slide 8 Pocillos Ibidi®
- Filipina III (0,25 mg/ml; Sigma -Aldrich, F4767)
- Fluoromount-G T (EMS, Hatfield, PA, EE.UU.).

3.1.5 Para ensayos *in vitro*

- kit de IL-1 β de ratón (Abcam ab100562).
- Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)
- Kit de ensayo de detección de relación GSH/GSSG (Abcam, España)
- kit de ensayo de colesterol rojo Amplex (Thermo Fisher Sci.; A12216)
- kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Ref. 5000000).
- Kit de ensayo de proteínas Pierce™ BCA (Abcam, Ref. 23225).

3.1.6 Para Western Blot

- Acrilamida (Sigma-Aldrich Saint Louis, MO,)
- TEMED (Fluka, Sigma-Aldrich Saint Louis, MO, EE.UU.).
- APS (Persulfato amónico, Sigma-Aldrich Saint Louis, MO).
- Dodecil Sulfato Sódico (SDS, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)
- Cóctel inhibidor de proteasas y fosfatasas (Thermo Scientific -78442)
- Membranas de difluoruro de polivinilideno PDVF (Immobilon™, Millipore Corporation®)
- Geles prefabricados Mini-PROTEAN TGX™(Bio-Rad, Hercules, CA)

- Membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, CA)
- Buffer de Muestra Laemmli 2x (Bio-Rad, Hercules, CA)
- β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO).
- Buffer salino con Tris y Tween 20 (Merck, Alemania)
- Buffer de corrida (Bio-Rad, Hercules, CA)
- Buffer de transferencia (Biorad, Hercules, CA)
- Buffer de bloqueo Every Blot (Bio-Rad, Hercules, CA)

3.1.7 Para la extracción de ARN, transcripción inversa (RT) y PCR

- TRIzol® (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific)
- Tripure (Roche Diagnostic, EE.UU.).
- Buffer 100ST (DireCtQuant, Lleida, España, DCQ100ST)
- Kit de síntesis de ADNc (1708891, Bio-Rad iScript™).
- Bio-Rad iQ SYBR Green Supermix (1708880, Bio-Rad).
- Inhibidor de ARNasa RiboLock (Thermo Fisher Sci., E00381)
- Maxima H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Sci., EP0751)
- SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, 1725271).

3.2 Modelos experimentales

3.2.1 Animales para obtención de cultivos

- Crías de ratas macho y hembra de la cepa Sprague-Dawley en los días postnatal 0 a 2 (P0 a P2) criados en el bioterio de la Cátedra de Histología del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata “Profesor Doctor Rodolfo R. Brenner” (INIBIOLP, La Plata, Argentina)

- Crías de ratones APP^{swe}/PSEN1^{ΔE9} macho y hembra en estadio P0 a P2 (Laboratorio Jackson) y crías de ratones Wild-type C57BL/6 macho y hembra criados en el bioterio de la Universitat de Barcelona (UB, España).

Las parejas reproductoras se alojaron en una habitación con temperatura controlada (22-24 °C), ciclos de 12 horas de luz / 12 horas de oscuridad (luces de 8 am a 8 pm), con alimento y agua disponibles *ad libitum*. Nuestros protocolos animales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la FCM, UNLP (Protocolo

#P01-01-2022) y por el Comitè Ètic d'Experimentació Animal de la Universitat de Barcelona (CEEA-UB 82-22).

3.2.2. Cultivos celulares

3.2.2.1 Cultivos primarios de astrocitos

Los cultivos primarios de astrocitos se prepararon a partir de crías postnatales P0 a P2 de ratas Sprague-Dawley y ratones transgénicos APP/PS1, como se ha descrito anteriormente (Bellini et al. 2011). Brevemente, las crías macho y hembra P0-P2, que se distinguen por una papila genital más grande y una mayor distancia anogenital en los machos que en las hembras, fueron anestesiadas mediante hipotermia y luego decapitadas con tijeras quirúrgicas. Posteriormente, se extrajo el cerebro, las meninges se disecionaron las cortezas cerebrales y el hipocampo en condiciones asépticas bajo el microscopio de disección. El tejido cerebral se pasó repetidamente por pipetas Pasteur flameadas de diferentes tamaños para obtener una suspensión celular, la cual se centrifugó a 300 x g durante 5 minutos para eliminar detritus solubles. Luego, las células de ambas regiones (hipocampo y corteza) se entremezclaron y resuspendieron en 50 µL de PBS y se contaron en una cámara de Neubauer mediante tinción con azul tripán. Posteriormente se sembraron 6×10^6 células por botella de 75 cm² recubiertas con poli-D-lisina en DMEM/F12 (1:1) (medio Emeve, laboratorio MicroVet SRL, Argentina) suplementado con un 10 % de SFB (Natocor, Córdoba, Argentina) y Penicilina-Estreptomicina (1X) (Laboratorio Serendipia, Colombia). Las células se cultivaron en una incubadora humidificada a 37 °C con un 5 % de CO₂. La mitad del medio se cambió cada 3 días y cuando las células alcanzaron el 90 % de confluencia, las botellas se agitaron de manera constante durante 24 horas a 280 rpm en un agitador de mesada (Thermo Forma, Marietta, Ohio, EE.UU) en estufa a 37 °C con CO₂. Los cultivos de astrocitos enriquecidos se sembraron a razón de 100.000 células/mL en placas P100 nuevas y se incubaron con DMEM/F12 + 10 % SFB durante 2-3 días antes de su uso.

3.2.2.2 Cultivos primarios de Neuronas

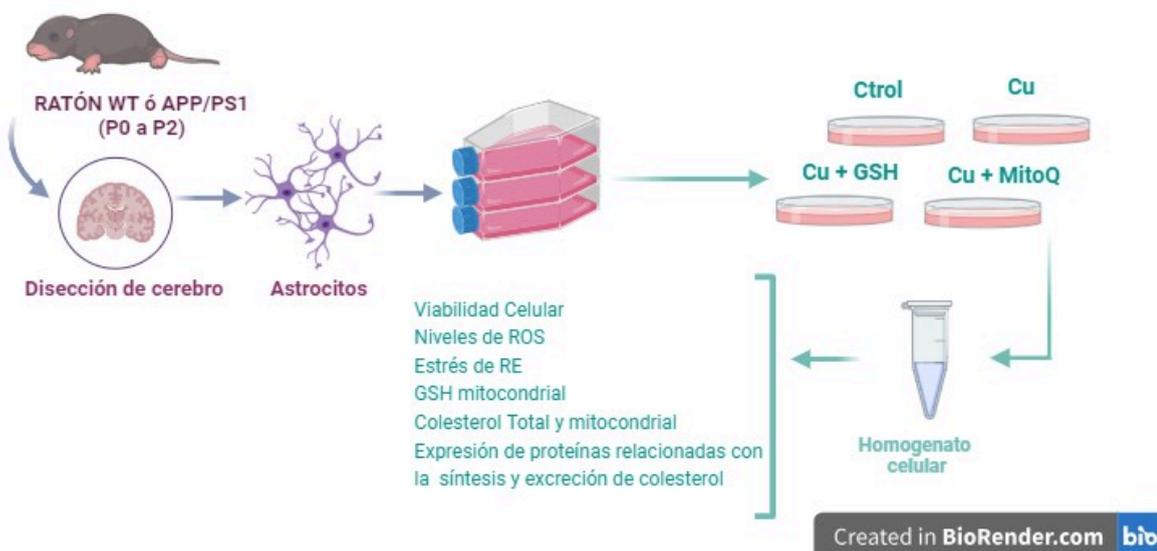
Los cultivos primarios neuronales se obtuvieron a partir de cerebros de crías de rata Sprague-Dawley de 0 a 2 días de edad siguiendo los procedimientos establecidos en Echeverría y col (2005) con pequeñas modificaciones. Brevemente, se obtuvieron las cortezas e hipocampos

como se describió en el apartado anterior. Posteriormente, se disociaron mediante digestión con una solución de tripsina al 0,05 % (Sigma) que contenía DNasa I (0,06 %) (Sigma) durante 10 minutos a 37 °C. La reacción de digestión se detuvo con medio Neurobasal con 10 % de SFB (Natocor, Córdoba, Argentina). Posteriormente las muestras se pasaron 20 veces a través de una pipeta de 1000 µL para obtener una suspensión celular homogénea. Las células se centrifugaron a 200 g durante 5 minutos y se resuspendieron en medio DMEM/F12 suplementado con 10 % SFB, glucosa 0,25 % (Sigma-Aldrich®), mezcla de vitaminas 1 % (Microvet, Argentina), GlutaMAX™ (Gibco Thermo Fisher Scientific) y Penicilina-Estreptomicina (IX). El total de células se contó en una cámara de Neubauer mediante tinción con azul tripán y se sembraron 3000 células/mm² en cubreobjetos de vidrio de 12 mm recubiertos con poli-D-lisina (Sigma). Las neuronas se mantuvieron a 37 °C en estufa con 5 % de CO₂ y se trataron en el día 7 de cultivo en medio DMEM/F12 suplementado con 10 % SFB, glucosa 0,25 % (Sigma-Aldrich®), mezcla de vitaminas 1 % (Microvet, Argentina), GlutaMAX™ (Gibco Thermo Fisher Scientific) y Penicilina-Estreptomicina (IX).

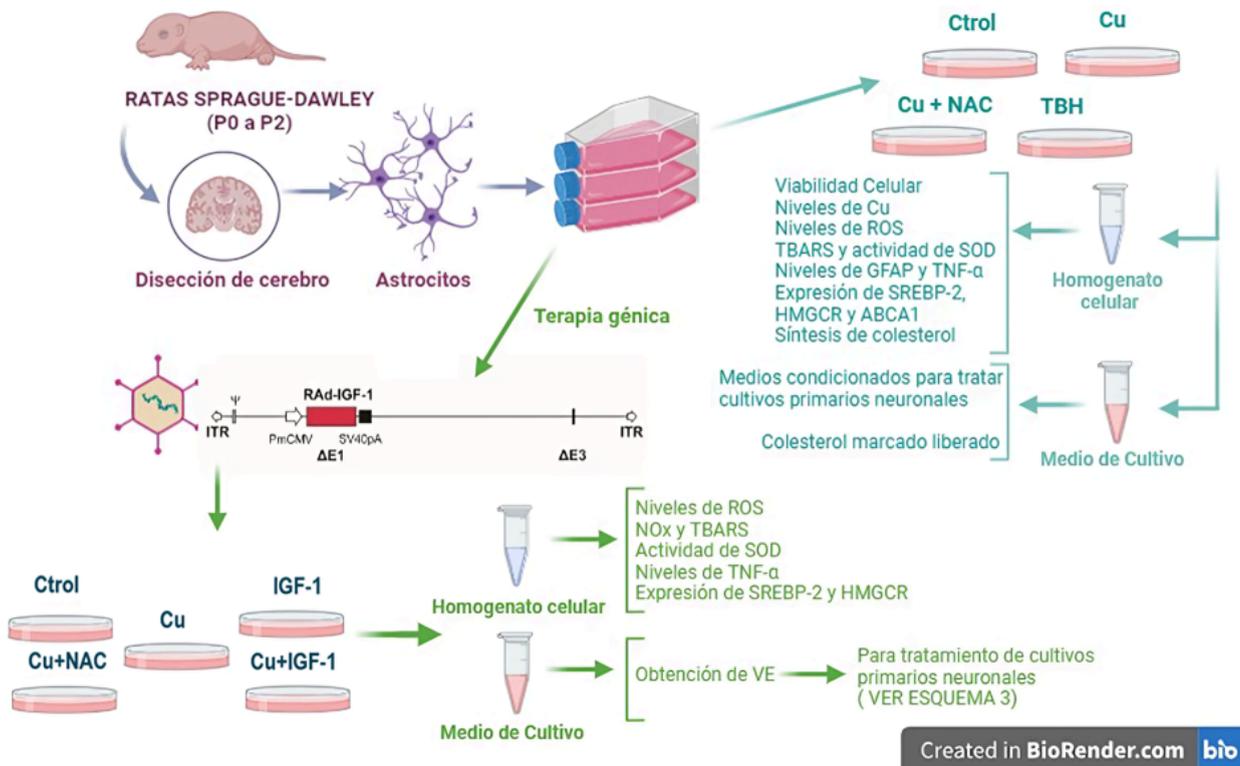
3.2.2.3 Cultivo celular establecido

La línea celular establecida de microglia (SIM-A9) proveniente de ratón (ATCC-CRL-3265) se cultivó en medio DMEM/F-12 (Gibco™) con GlutaMAX™ (ThermoFisher, Waltham, MA, 31331028), suplementado con SFB al 10 % (ThermoFisher, Waltham, MA, 10100139) y 5 µg/ml de plasmocin™ (InvivoGen, San Diego, CA, ant-mpt) y con suero de caballo (HS) al 5 % (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, H 1270).

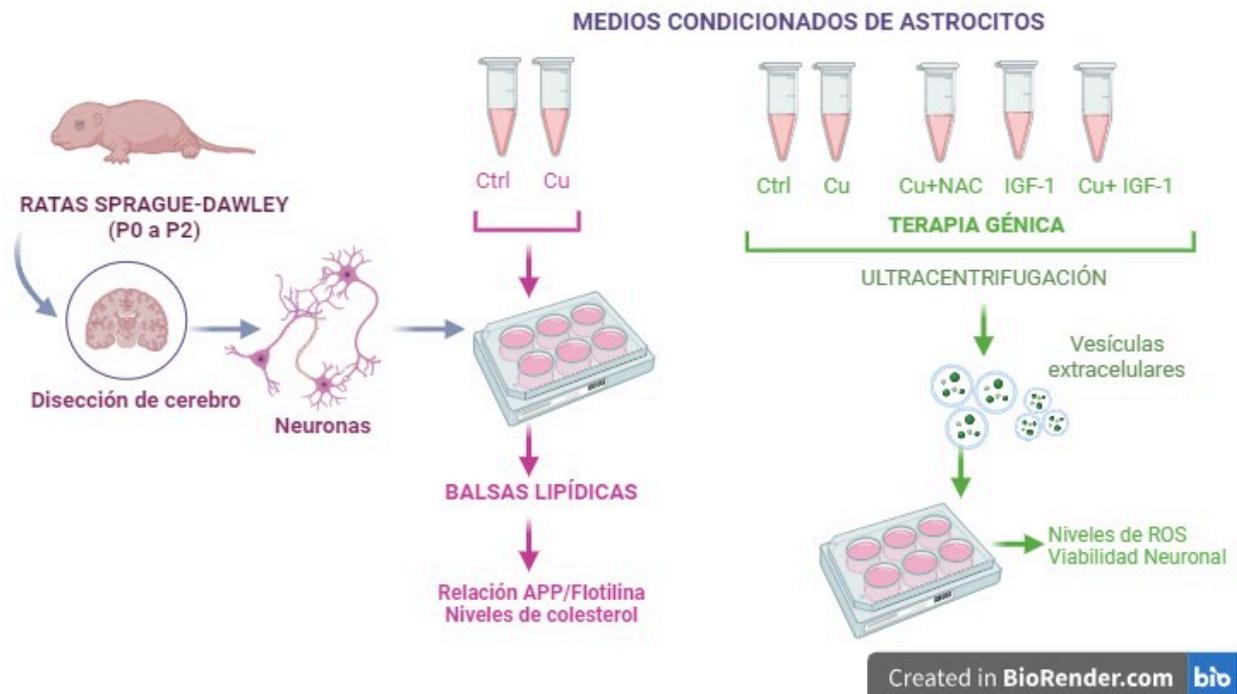
3.3 Diseños experimentales



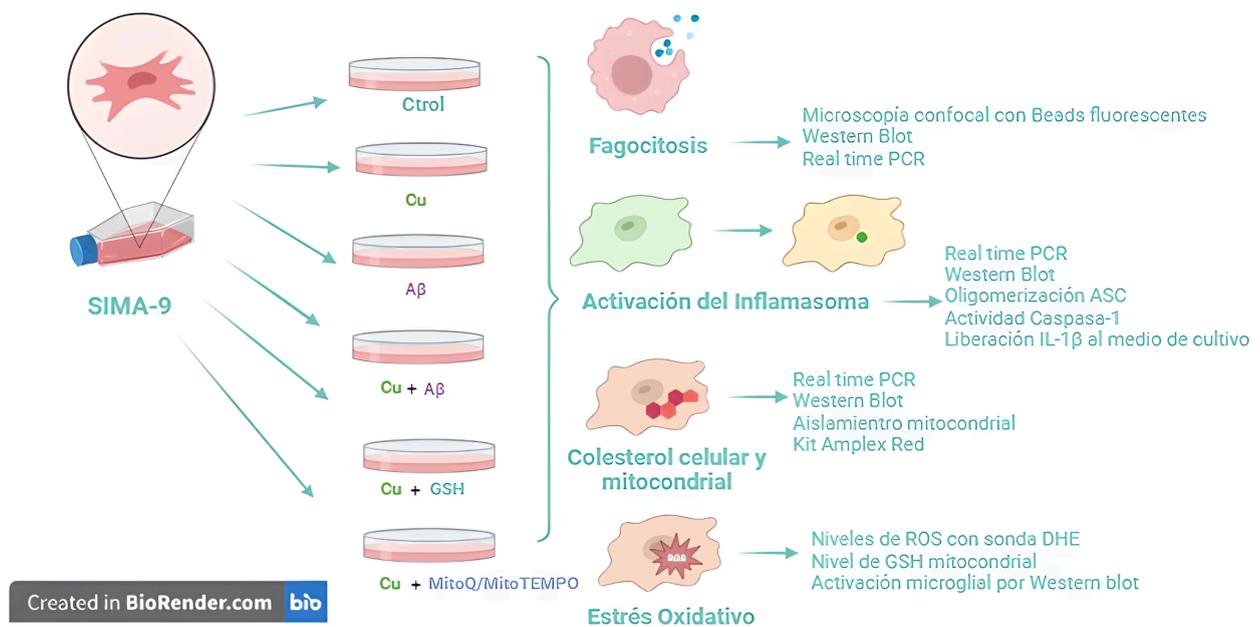
Esquema 1: Diseño experimental para cultivos de astrocitos provenientes de ratones WT ó APP/PS1.



Esquema 2: Diseño experimental para cultivos de astrocitos provenientes de ratas Sprague-Dawley.



Esquema 3: Diseño experimental para cultivos de neuronas provenientes de ratas Sprague-Dawley.



Esquema 4: Diseño experimental para la línea celular SIMA-9.

3.4 Tratamientos experimentales

3.4.1. Tratamiento con Cu

Para determinar la concentración no citotóxica más alta de Cu (concentración subletal) se realizó una curva de viabilidad celular en donde se expusieron los cultivos de astrocitos y microglia a diferentes concentraciones de CuSO_4 (0-600 μM) durante 24 horas. En base a los resultados obtenidos, elegimos la concentración de trabajo para cada cultivo, con el objetivo de evaluar el efecto del Cu sobre los mecanismos bioquímico-moleculares propuestos en nuestras hipótesis.

3.4.2. Tratamientos antioxidantes

- Los cultivos primarios de astrocitos y neuronas se pre-incubaron 30 minutos con la solución de NAC 10 mM. Luego, se agregó el tratamiento combinado de Cu+NAC (10mM) 24 horas.
- Los cultivos primarios de astrocitos y de la línea establecida de microglia SIMA-9 se pre-incubaron 30 minutos con el antioxidante GSH (1 mM). Luego, se agregó el tratamiento combinado de Cu+GSH (1 mM) 24 horas.
- Tratamientos dirigidos a la mitocondria: Los cultivos primarios de astrocitos y la línea de ratón SIMA-9 se incubaron con Cu + MitoQ 1 μM o Cu + MitoTEMPO 5 μM durante 24 horas.

Como control de agente oxidante se empleó tert-butil hidroperóxido (TBH) (Sigma-Aldrich) a una concentración de 500 μM durante 60 minutos (37 $^{\circ}\text{C}$).

3.4.3 Tratamiento con A β

Para los tratamientos con el péptido A β (1 mM), se disolvió la sal de clorhidrato de A β (1-42) humana (Bachem, Bubendorf, Suiza, H-6466) en hexafluoroisopropanol (HFIP; Sigma-Aldrich, 10522-8). Para el ensamblaje oligomérico, los péptidos se resuspendieron a 5 mM en DMSO mediante sonicación, luego se diluyeron a 100 μM en DMEM sin rojo de fenol y se incubaron a 4 $^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas (Stine et al. 2003). La presencia de formas oligoméricas solubles de A β fue confirmada por Western blot (Fernández et al. 2009) y microscopía electrónica.

3.4.4 Terapia génica en astrocitos

Se trataron los cultivos de astrocitos a una densidad de 1500 cel /mm² con PBS, con un vector adenoviral recombinante que porta el gen de la proteína roja fluorescente de *Discosoma sp* DsRed (RAd-DsRed) o con un vector adenoviral recombinante que porta el ADNc de IGF-1 de rata (Figura 6) (RAd IGF-1) durante 24 horas (Hereñú et al. 2007; Bellini et al. 2011). Se utilizó una multiplicidad de infección (MOI) de 300 unidades formadoras de placa/ml (ufp)/célula.

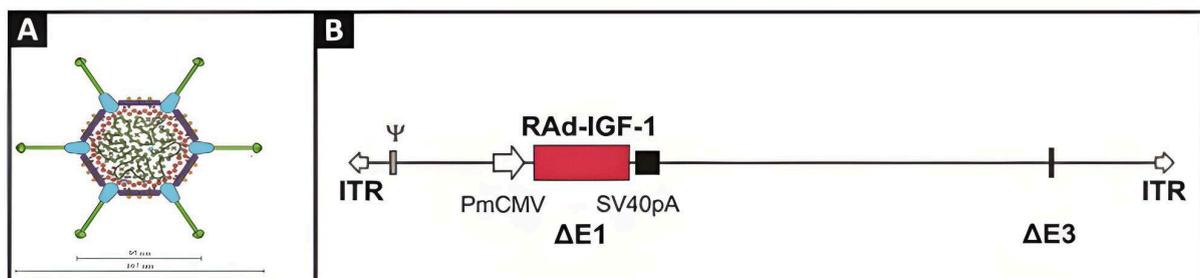


Figura 6: Representación esquemática del vector RAd-IGF-1. (A) Esquema de un adenovirus tipo 5. (B) Esquema del RAd conteniendo al ADNc de IGF-1 de rata. Abreviaturas: IGF-1, ADNc para IGF-1 de rata; ITR, repetición terminal invertida; PminCMV, promotor mínimo de citomegalovirus; SV40, señal de poliadenilación del virus simio 40; $\Delta E1$ and $\Delta E3$, deleciones en el genoma; Ψ , señal de empaquetamiento.

Para evaluar si la transfección había sido efectiva se utilizó el vector RAd-DsRed. Se observó la fluorescencia a 553 nm con microscopio Olympus BX-51 conectado a una cámara de video CCD Olympus DP70 (Tokio, Japón).

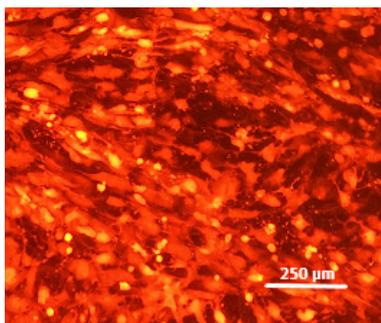


Figura 7: Imagen de astrocitos transfectados con RAd-DsRed. La imagen fue tomada con microscopio Olympus BX-51 conectado a una cámara de video CCD Olympus DP70. Se observan astrocitos positivos para la proteína roja fluorescente de *Discosoma* sp DsRed.

Luego, los cultivos se trataron con CuSO_4 400 μM durante 24 horas, constituyéndose los siguientes grupos experimentales

- I- Control;
- II- RAd-IGF-1 / Veh;
- III- CuSO_4
- IV- RAd-IGF-1 / CuSO_4
- V- Cu+NAC

3.4.5 Obtención de vesículas extracelulares (VE) y medios sin VE para el tratamiento de neuronas

Para obtener los medios desprovistos de VE se preparó medio de cultivo DMEM/F12 con SFB al 20 % sin VE. Para esto, se centrifugó el SFB 14 horas a 45000 rpm 4 °C con el Rotor 70.1 Beckman utilizando la Ultracentrífuga Thermo Scientific Sorvall WX+. Se tomó el sobrenadante y se filtró con filtro 0,22 μm para esterilizar. Luego, se agregó el mismo volumen de medio de cultivo DMEM/F12 estéril con antibióticos y sin SFB, para lograr un medio desprovisto de VE con 10 % de SFB.

Las VE se obtuvieron como se describe en Xu y col (2016) con algunas modificaciones. Brevemente, se colectaron los medios de cultivos de cada well y se colocaron en tubos falcon de 50 mL estériles (paso 1). Luego, se tripsinizaron las células con tripsina 0,25 % y se contaron en cámara de Neubauer (paso 2). Este punto es importante para poder relativizar el contenido de vesículas con el número de células. El siguiente paso fue agregar el mismo volumen de PBS que de medio de cultivo en un tubo Falcon de 50 mL. Se centrifugó a 300 g durante 10 minutos a 4 °C utilizando el rotor Beckman JA 25.50 en una centrifuga Beckman Avanti J-E Refrigerada (paso 3).

A continuación, se recolectó el sobrenadante del paso 3 y se volvió a centrifugar a 2000 g durante 70 minutos a 4 °C utilizando el rotor Beckman JA 25.50 en la centrifuga Beckman Avanti J-E Refrigerada (paso 4). Seguidamente, se tomó el sobrenadante del paso 4 y se centrifugó a 12000 g durante 30 minutos a 4 °C usando el rotor Beckman JA 25.50 en la centrifuga Beckman Avanti J-E Refrigerada (paso 5). Posteriormente, el sobrenadante del punto 5 se recolectó en tubos para ultracentrifugación a 110000 g durante 70 minutos a 4 °C con el rotor 70.1 utilizando la Ultracentrifuga Thermo Scientific Sorvall WX+ (paso 6).

El pellet del paso 5 (12K) se resuspendió en 6 mL de PBS estéril y se volvió a centrifugar a 12000 g 30 minutos 4 °C utilizando el rotor Beckman JA 25.50 en una centrifuga Beckman Avanti J-E Refrigerada. Luego, se resuspendió este pellet en 100 µL de medio de cultivo con 10 % de SFB sin VE (paso 7). También se descartó el sobrenadante del paso 6 y se resuspendió el pellet (110K) en 100 µL de medio de cultivo con 10 % de SFB sin VE (paso 8). Se mezclaron ambos pellet que corresponden a distintos tamaños de VE (12K y 110K). Finalmente, se agregaron 450 µL de medio de cultivo con 10 % SFB sin VE al pool de VE obtenido anteriormente. Dicho volumen se dividió en:

- 500 µL para tratar a los cultivos primarios de neuronas (previamente deberá filtrarse con filtro de 0,22 µm)
- 5 µL para medir proteínas por Bradford (ver [sección 2.18.1](#))
- 100 µL para microscopía electrónica de barrido (Microscopio Olympus DSX 1000)
- 45 µL para Western Blot (Ver [sección 3.16](#))

3.4.5.1 Medios condicionados completos y medio condicionado sólo con VE.

Los cultivos primarios de neuronas se obtuvieron como se describió en la [sección 3.2.2.2](#), luego del día 7 las neuronas fueron tratadas con:

- Medios condicionados de astrocitos: Se tomaron los medios de cultivos de los astrocitos tratados con CuSO_4 400 µM/24 horas y se agregaron 500 µL de dicho medio a placas de 24 wells que contenían los cultivos primarios de neuronas a razón de 6000 células/well.
- VE: Se aislaron las vesículas como se detalla en la [sección 3.4.5](#). Se expusieron las neuronas (6000 células/well) durante 16 horas a 500 µL de medio DMEM/F12 con SFB desprovisto de VE + VE derivadas de los astrocitos luego de estar expuestos a CuSO_4 400 µM/24 horas.

3.5 Determinaciones

Luego de transcurridas las 24 horas de tratamiento, las células se procesaron como se describe:

- A) Se trataron con una solución de tripsina (0,25 % [p/v], Sigma) y se resuspendieron en PBS. A cada muestra se le añadió 500 μ L buffer de lisis 1X (20 mM HEPES pH 7,40, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Triton X-100, con la adición de 380 μ L de cóctel inhibidor de proteasas y fosfatasas) (Thermo Scientific -78442). A continuación, las muestras se centrifugaron a 10.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.
- B) Se lisaron en buffer de lisis RIPA con fluoruro de fenilmetilsulfonilo 2 mM, ortovanadato de sodio 1 mM y cóctel inhibidor de proteasa (Santa Cruz Biotech, Dallas, TX, sc-24948) durante 30 minutos a 4 °C y luego se centrifugaron a 16 000 g durante 15 minutos.

3.5.1 Viabilidad celular

3.5.1.1 Método de la Resazurina

Tras el tratamiento, las células se incubaron con 10 μ L de AlamarBlue® (0,11 mg/mL en 100 μ L de DMEM/F12 sin Rojo de fenol)(Thermo Fisher Scientific) a 37 °C durante 2 horas. El producto resultante se determinó mediante espectrofotometría de fluorescencia a longitudes de onda ex535 / em595 utilizando el lector de placas DTX 880 de Beckman Coulter.

3.5.1.2 Metodo del MTT

Tras el tratamiento, las células se lavaron con PBS y se incubaron con 100 μ L de MTT (bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), 0,25 mg/mL (Thermo Fisher Scientific) en DMEM/F12 sin Rojo de fenol a 37 °C durante 2 horas. Al reducirse, el MTT se convierte en un compuesto de la familia formazanos, de color violeta e insoluble en agua. Para cuantificarlo, se descartó el sobrenadante y se disolvieron los cristales en 100 μ L de DMSO. La viabilidad celular se determinó mediante espectrofotometría a 570 nm utilizando el lector de placas Multiskan Skyhigh de Thermo Scientific (Ref. A51119700C).

3.5.1.3 Evaluación de muerte por citometría de flujo

Anexina-V

Se midió muerte por apoptosis por citometría de flujo utilizando el Kit I de detección de apoptosis con anexina V FITC (BD Pharmingen™). Las células en suspensión se incubaron con 5 µL de Anexina V FITC en 100 µL de buffer de Anexina-V 1X 1 durante 15 minutos (25 °C). Luego se agregaron 400 µL de buffer de unión 1X y se incubó 1 hora a temperatura ambiente. La fluorescencia se midió mediante citometría de flujo (Accuri C6 Plus, BD).

Ioduro de Propidio (IP)

Se midió muerte celular por citometría de flujo utilizando IP como sonda intercalante de ADN (Sigma, Cat # P-4864) para evaluar la exclusión de las células no viables. Se incubaron durante 15 minutos utilizando una dilución 1:10 y se midió la fluorescencia a 610/20 nm con el citómetro Accuri C6 Plus, BD

3.5.2 Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS)

Las ROS fueron determinadas por medio de la utilización de dos metodologías diferentes, a saber:

- Por citometría de flujo incubando las células en suspensión con la sonda 2'-7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCF-DA) (Invitrogen) 10 mM durante 60 minutos (37 °C). Como control positivo de generación de ROS se utilizó TBH (500 µM), el cual también se incubó durante 60 minutos (37 °C). El tratamiento con el antioxidante NAC se realizó como se explica en la [sección 3.4](#) como control negativo. La fluorescencia se midió mediante citometría de flujo (Accuri C6 Plus, BD).
- Por espectrofluorimetría utilizando la sonda fluorescente dihidroetidio (DHE). Como control positivo de generación de ROS se utilizó TBH (500 µM), el cual se incubó durante 60 minutos (37 °C). Los antioxidantes GSH, MitoQ y MitoTEMPO se utilizaron como controles negativos de la producción de ROS. Brevemente, se cambió el medio por 150 µL de DMEM sin rojo fenol y sin SFB que contenía DHE en una concentración de 10 µM (stock: 10 mM). Las células se incubaron por 30 minutos a 37 °C 5 % CO₂ y oscuridad. Luego, se midió la fluorescencia a EX:490 nm/Em:580 nm en el espectrofluorímetro SAFAS Xenius XC 2000.

3.5.3 Actividad de la enzima Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad de la enzima SOD en los homogenatos celulares se determinó por espectrofotometría UV-Visible siguiendo la técnica de Misra y Fridovich (Misra & Fridovich 1977) en donde a pH alcalino se produce la autooxidación de la epinefrina a adrenocromo. La SOD compete con esta reacción, ralentizando así la formación de adrenocromo. Una unidad de SOD se define como la cantidad de homogenato que inhibe la tasa de formación de adrenocromo en un 50 %. La mezcla contiene 970 μL de buffer de reacción (62,5 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ [pH 10,2], 125 μM EDTA) y 20 μL de epinefrina (10,5-11,0 mg de epinefrina en 2 mL de ácido acético 0,1 N), y 30 μL de homogenato celular. Para calcular las unidades de SOD en los homogenatos, los datos se transformaron utilizando $1 \text{ unidad} = V_{\text{Control}}/V_{\text{Homogenato}} - 1$. V es la pendiente del cambio de absorbancia en ausencia y presencia de la muestra. La transformación dio como resultado una correlación lineal entre la actividad de SOD y la cantidad de homogenato utilizado en el ensayo.

3.5.4 Oxidación lipídica midiendo las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

La oxidación lipídica se midió siguiendo el método descrito por Yagi (Yagi 1976). Brevemente, se añadieron 500 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,8 % y 500 μL de ácido acético (10 % pH 3,5) a 67 μL de homogenato celular. La muestra se calentó a 95 $^{\circ}\text{C}$ durante 60 minutos. La absorbancia se midió en un lector de placas DTX 880 de Beckman Coulter a 532 nm. Para realizar la curva de calibración se utilizaron diferentes concentraciones de malondialdehído (MDA) (Aldrich).

3.5.5 Medición de nitritos y nitratos [NOx] por reducción con vanadio

La medición de [NOx] se realizó siguiendo el método de Griess (Miranda et al. 2001). Brevemente a 400 μL de homogenato se le agregaron 300 μL de VCl_3 en HCl 1 M (200 mg de VCl_3 en 25 mL de HCl 0,1 M) y 300 μL del reactivo de Griess premezclado (volúmenes iguales de sulfamida al 2 % en ácido clorhídrico al 5 % y N-[1-naftil]-etilendiamina al 0,1 % en agua bidestilada). Se incubaron las muestras 30 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$ y se leyeron a 405 nm utilizando el lector de placas DTX 880 de Beckman Coulter. Para realizar los cálculos se trazó una curva de calibración en un rango de concentración 1 a 500 μM , utilizando una solución estándar de NaNO_3 (Merk, ultrapuro) 1,42 mM en agua bidestilada.

3.5.6 Carbonilos proteicos

Los carbonilos proteicos se midieron siguiendo el protocolo descrito en Reznick & Packer (1994). Resumidamente, alícuotas de 30 μL de las muestras se llevaron a volumen 750 μL con PBS. Se agregaron 750 μL DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) 10 mM en HCl 2 N y se agitó de inmediato en vortex. Las muestras se incubaron en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. De esta manera se obtuvieron complejos de color caoba que se leyeron a 505 nm en el lector de placas DTX 880 de Beckman Coulter. La curva de calibración se efectuó utilizando una solución estándar de piruvato de sodio 2,30 mM, empleando alícuotas entre 40 y 100 μL .

3.5.7 Determinación de la concentración de Cu intracelular

El Cu se midió por espectrofotometría de absorción atómica (AAS) siguiendo el protocolo descrito en Mattioli et al. (2018) con algunas modificaciones. Brevemente, 500 μL de homogenato se expusieron a digestión ácida (mezcla 3:1 de ácido nítrico y ácido clorhídrico). Luego, se inyectaron en un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer-1100B que contaba con una lámpara catódica Perkin-Elmer (Perkin Elmer Corp., Norwalk, CT, EE. UU.). El ancho espectral utilizado fue de 1 nm. Todas las mediciones se realizaron en tres canales simultáneos y en el modo de máximo espectro (324.1 nm).

3.5.8 Medición del colesterol total

Los lípidos se obtuvieron a partir de los homogenatos celulares utilizando el método de Folch (Folch et al. 1957). Brevemente, el reactivo de Folch se preparó mezclando cloroformo : metanol : agua en la proporción 2 : 1 : 0,8. Este reactivo se añadió a las muestras y se mezcló mediante vórtex. A continuación, las muestras se mantuvieron en tubos de vidrio esmerilado durante toda la noche. Luego, se secaron en atmósfera de nitrógeno hasta peso constante, se resuspendieron en 50 μL de hexano y se separaron mediante cromatografía en capa fina (TLC) sobre gel de sílice en cloroformo al 100 %. A continuación, la placa de TLC se sumergió en una solución que contenía 50 mg de Cl_3Fe + 90 mL de H_2O + 5 mL de ácido acético + 5 mL de SO_4H_2 . Por último, la placa de TLC se colocó en una estufa a 100 °C durante 3 minutos para visualizar las bandas rosadas correspondientes al colesterol libre y a los ésteres de colesterol. La densidad de cada banda se analizó utilizando el programa Image J.

Por otra parte, los niveles de colesterol también se determinaron fluorométricamente utilizando el kit comercial Amplex Red (Thermo Fisher Sci.; A 12216). Las muestras ($0,5 \times 10^5$ células) se extrajeron con cloroformo:isopropanol:IGEPAL CA-630 (7:11:0,1) y se centrifugaron a 13.000 g durante 10 minutos para eliminar el material insoluble. La fase orgánica se secó al vacío, se disolvió en buffer de reacción de colesterol 1X y se analizó siguiendo las pautas proporcionadas por el proveedor. Para evaluar la distribución intracelular de la carga de colesterol, las células se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 20 minutos a temperatura ambiente y, después de lavarlas tres veces, se incubaron con el antibiótico poliénico naturalmente fluorescente filipina III (0,25 mg/mL; Sigma -Aldrich, F 4767) durante 30 minutos. Las imágenes se adquirieron con un microscopio de un microscopio confocal Dragonfly de Andor con un objetivo 60X oil immersion. El software ImageJ (Schindelin et al. 2012) se utilizó para calcular la fluorescencia celular total corregida (CTCF) mediante la aplicación de la siguiente fórmula: $CTCF = \text{Densidad integrada} - (\text{Área de la celda seleccionada} \times \text{Fluorescencia media de las lecturas de fondo})$.

3.5.9 Síntesis de colesterol *de novo* en astrocitos

Durante las últimas 6 horas del tratamiento de un total de 24 horas con CuSO_4 se cambió el medio por DMEM/F12 sin SFB suplementado con acetato de [14C] (3 PCi/ml en medio de cultivo final). Posteriormente, se añadieron 2 mL de hexano: isopropanol (3:2) a cada muestra. La fase orgánica se recogió con una pipeta Pasteur de vidrio y los lípidos se extrajeron por el método de Folch explicado en la [sección 3.5.8](#) (Folch et al. 1957). Luego de saponificar (con hidróxido de potasio al 10 % durante 1 hora a 80 °C), se tomó la fracción que permaneció en suspensión después de la precipitación (fracción insaponificable) y se separó mediante TLC sobre gel de sílice G utilizando cloroformo al 100 % como fase móvil y se identificó mediante autorradiografía con una pantalla Storage Phosphor Screen (GE Healthcare). La placa se reveló utilizando el Amersham's Storm 860 Molecular Imager. Los análisis densitométricos cuantitativos se realizaron utilizando Image J.

3.5.10 Ensayo de Fagocitosis

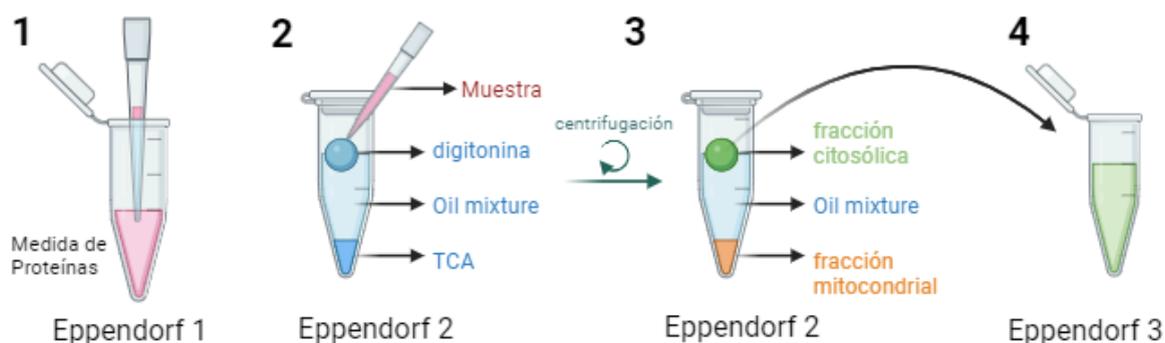
La fagocitosis se evaluó en las células de la microglía, cuantificando el grado de internalización de las beads amarillas-verdes fluorescentes (Sigma-Aldrich, ref. L4655). Las células se sembraron en portaobjetos con cámara μ -Slide 8 Pocillos Ibidi®. Después de los tratamientos, se añadieron las

beads en una concentración de 0,01 % y se incubaron durante 20 minutos a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Luego, las células se lavaron tres veces con PBS y la membrana plasmática/citosol y los núcleos se marcaron con CellMask™ Orange (1:20 000; Thermo Fisher Sci., C10045) y DAPI (1:1000; ref. D1306), respectivamente, durante 5 minutos. Finalmente, las células se fijaron con PFA al 4 % y se observaron con un microscopio confocal Dragonfly de Andor. De cada pozo, se tomaron aleatoriamente tres imágenes no superpuestas de las áreas superior, media e inferior. El software ImageJ se utilizó para calcular el número de beads fagocitadas por célula individual.

3.5.11 Aislamiento mitocondrial y determinación de GSH

Las mitocondrias celulares fueron aisladas, tanto de astrocitos de ratón como de la línea microglial SIMA-9, por fraccionamiento con digitonina como se describió en Fernández-Checa y col (1987) (ver esquema 5). Brevemente, se tripsinizaron las botellas de 75 cm² y se contó el número total de células en cámara de Neubauer. Se utilizaron 2-3 x 10⁶ células las cuales se resuspendieron en 1 mL de medio de cultivo sin SFB disgregando suavemente con una pipeta P1000. Las células resuspendidas en medio de cultivo se centrifugaron durante 5 minutos a 1000 rpm y temperatura ambiente. Luego, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet añadiendo 1 mL de PBS. Se volvió a centrifugar durante 5 minutos a 1000 rpm y temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 200 µL de PBS. Seguidamente, se colocaron en eppendorf distintos alícuotas de 50 µL de cada muestra y se colocaron en un tercer eppendorf (eppendorf 1) para medir proteínas. En un eppendorf (eppendorf 2) se agregó 50 µL del agente precipitante (TCA: ácido tricloroacético al 10 % p/v; REF H3375) y 550 µL de una mezcla de oil mixture (silicone oil (Sigma; REF 175633; d=1.05g/ml temperatura ambiente=RT) y mineral oil (Sigma; REF 330779; d=0.838g/ml, RT) en proporción 6:1. En otro eppendorf (eppendorf 3), añadimos 100 µL de TCA solo. Se tomaron 50 µL de digitonina (5 mg de digitonina (Santa Cruz; REF sc280675; RT) disuelta en 10 mL de buffer HEPES) y se colocó digitonina- formando una pequeña “bolita” por diferencia de densidades- cerca de la superficie del oil mixture del eppendorf 2. Inmediatamente, colocamos en “la bolita” de digitonina los 200 µL de muestra. Se centrifugó 5 minutos a velocidad máxima (16000g) a temperatura ambiente. Luego de esto, se tomaron 100 µL de la fracción citosólica del interior de la “bolita” de digitonina. Estos 100 µL (Vicente-Gutiérrez et al. 2019) se pasaron al eppendorf 3. Para cuantificar GSH citosólico, vortexeamos y centrifugamos 5' a 14000 rpm el

ependorf 2. Se eliminó una gran parte de la fracción del mineral oil, siendo preferible no eliminarla toda (para no correr el riesgo de llevarnos parte de la fracción mitocondrial con ella). Extrajimos la fracción mitocondrial para cuantificar GSH, utilizando el kit comercial de Abcam que mide la relación GSH/GSSH (MAK440-1KT, Abcam, España).



Esquema 5: Representación esquemática del fraccionamiento celular por digitonina.

3.5.12 Visualización de la oligomerización de ASC en microglia

Para evaluar la presencia de oligómeros de la proteína adaptadora asociada a la apoptosis que contiene un dominio de Activación y Reclutamiento de Caspasas CARD (ASC), las células se transfectaron con el plásmido pLEX-MSC-ASC-GFP (Addgene plásmido #73957; RRID:Addgene_73957) siguiendo el protocolo descrito en de Almeida y col (2016). Brevemente, las células se sembraron en portaobjetos de cámara extraíble LabTek de 8 pocillos (Thermo Scientific, 177402) hasta el 60 % a 70 % de confluencia. Las transfecciones se realizaron utilizando Lipofectamina P300 (Invitrogen) en medio opti-MEM durante 30 minutos. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se expusieron al tratamiento correspondiente. Después del tratamiento, las células se incubaron con CellMask™ Orange (1:10 000; Thermo Fisher Sci., C10045) para teñir la membrana plasmática y de PFA 4 % para fijarlas. La formación de motas de ASC se evaluó como la formación de estructuras reticuladas, visualizadas con un microscopio de barrido láser confocal Leica TCS SPE (Leica Microsystems, España) utilizando un objetivo PH3 CS de aceite de 63 × /1,32-0,60 y un agujero de alfiler confocal fijado en 1 Airy unidad. De cada pozo, se tomaron aleatoriamente tres imágenes no superpuestas de las áreas superior, media e inferior. El número de células positivas para motas se determinó mediante el conteo manual utilizando ImageJ.

3.5.13 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

Los medios de cultivos celulares de la microglia se centrifugaron a 3000 *g* durante 10 minutos y se concentraron usando concentradores centrífugos Corning® Spin-X® UF (Corning Life Sciences, Tewksbury, MA, 431,482). Los niveles de IL-1 β en los medios de cultivo de las células SIM-A9 se midieron utilizando kits ELISA de IL-1 β de ratón (Abcam ab100562), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En algunos casos, para evaluar la posible liberación de IL-1 β encapsulada en VE, se añadió Triton X-100 a los sobrenadantes a una concentración final del 1 % y se dejó reposar la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente antes del ensayo de citocinas secretadas.

3.5.14 Ensayo del inflammasoma Caspase-1 Glo®

Las células SIMA-9 se cultivaron en placas de 96 pocillos y se trataron según la [sección 3.4](#). En una mitad de la placa se añadieron 100 μ l de reactivo Caspase-Glo® 1 a cada pocillo (Luminiscencia Total). En la otra mitad, se añadieron 100 μ l de reactivo Caspase-Glo® 1 con los inhibidores de caspasa-1 YVAD-CHO (Luminiscencia de otras Caspasas). Se agitaron las muestras en un agitador de placas a 300-500 rpm durante 30 segundos y se incubaron a temperatura ambiente durante 90 minutos para permitir que la señal luminiscente se estabilice. La luminiscencia se midió con el luminómetro Orion Microplate Luminometer (Berthold Detection Systems). La actividad específica de caspasa-1 se midió restando a la Luminiscencia Total la Luminiscencia de otras Caspasas.

3.5.15 Western Blot

Las muestras (25-50 μ g de proteína/calle) se prepararon en buffer de muestra Laemmli 4X (Bio-Rad) con β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), se resolvieron mediante electroforesis, en algunos casos, en geles prefabricados Mini-PROTEAN TGX™ (Bio-Rad) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad, Hercules, CA, V1704271). Las transferencias se probaron con anti-caspasa 1 monoclonal de conejo (1:1000; Abcam, Cambridge, Reino Unido, ab179515), anti-HMGCR policlonal de conejo (1:1000; Novus Biologicals, NBP1-50713), anti-IL-1beta/IL-1F2 policlonal de conejo (1:1000; Novus Biologicals, Abingdon, Reino Unido, NB600-633), anti-ABCA-1 policlonal de conejo (1:1000; Novus Biologicals, NB400-105SS), anti-Iba1 policlonal de conejo (1:1000, Sigma-Aldrich, A10433), anti-LDLR policlonal de ratón (1:1000; Abcam, ab30532),

anti-NLRP3/NALP3 policlonal de conejo (1:2500; Novus Biologicals, NBP2-12446), y anti- β -actina monoclonal de ratón (1:30.000; Sigma-Aldrich, A3853). Después de una incubación durante la noche a 4 °C, los anticuerpos unidos se visualizaron utilizando anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano picante y el sustrato Clarity™ Western ECL (Bio-Rad)

En algunos otros casos, las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida Laemmli al 15 % (Laemmli, 1970) y se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (membranas de transferencia Immobilon™, Millipore Corporation®) a 60 V durante 1 hora en buffer de transferencia (20 % (v/v) de metanol en 48 mM de Tris pH 8,3, 39 mM de glicina). Anticuerpo monoclonal de ratón anti-LDLR (SC-18823, Santa Cruz, CA, EE.UU.) diluido 1/200, anticuerpo monoclonal de ratón anti- β -actina diluido 1/3000 (Sigma A5316), anticuerpo policlonal de cabra anti-ABCA-1 (1/1000, SC- 5491, Santa Cruz, CA, EE.UU.), anticuerpo monoclonal de ratón anti-GFAP (SC-33673, Santa Cruz, CA, EE.UU.) diluido 1/500 y anticuerpos IgG anti-ratón (Fc-específicos) (Sigma A0168) diluidos 1/10000 se añadieron a la membrana durante 1 hora. Las bandas inmunorreactivas se detectaron utilizando el sustrato quimioluminiscente SuperSignal™ West Pico PLUS (34577, Thermo Scientific) y se utilizó un kit Chemidoc (ChemiDoc™ XRS, BIO RAD®) para detectar la fluorescencia. Se escanearon los inmunoblots de proteínas y se cuantificó la densidad de cada banda utilizando el software ImageJ (Image Processing and Analysis in Java).

3.5.16 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

3.5.16.1 PCR Real-Time

Las muestras se homogeneizaron con el reactivo de aislamiento Tripure (Roche Diagnostic, EE.UU.). El ARN se transcribió a ADNc utilizando un kit comercial (1708891, Bio-Rad iScript™). A continuación, el ADNc se amplificó utilizando Bio-Rad iQ SYBR Green Supermix (1708880, Bio-Rad). El programa de PCR real time utilizado fue 95 °C, 3 minutos, 40 ciclos (95 °C, 15 s; 60 °C, 60 s) y 95 °C durante 1 minuto. Los datos se analizaron por el método $\Delta\Delta CT$. Se utilizaron los siguientes cebadores de oligonucleótidos:

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
Srebp-2	5'-tcactccctgggaaagt-3'	5'-cagtagcaggcaggcaggcaggcaggcagggtctcacaggt-3'

Hmgcr	5'-ggacttcgagcaagagagagagagagagagagagatggg-3'	5'-agcactgtgttcgtacag-3'
Trem2	5'-tggaaccgtcaccatcactc-3'	5'-ctcggagactctgactgg-3'
ApoE	5'-ctctggtggagcaaggctcg-3'	5'-tcggatcgggtcacaaaag-3'
Srebf-2	5'-agcagtgaggaccattctgac-3'	5'-ttcctcagaacgccagactt-3'
Hmgcr	5'-aagccagtggtcccacaat-3'	5'-caccaccacggttcctatc-3'
TNF- α	5'-gaaaagcaagcagccaacca-3'	5'-cggatcatgctttctgtgctc-3'
β -actin	5'-tcttattgggtcgaaggctcgt-3'	5'-atctcactagaggccaccga-3'

3.5.16.2 Selfie qPCR

Selfie RT-qPCR mide el número absoluto de transcritos de ARN por gen. La técnica se levó a cabo según lo descrito por Podlesniy & Trullas (2017). Brevemente, las células se extrajeron y diluyeron en el buffer 100ST (DireCtQuant, Lleida, España, DCQ100ST) siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego, se realizó un paso de pre-recocido por duplicado, mezclando 2 μ L de la muestra con el mismo volumen del cebador inverso correspondiente en una concentración 2,5 μ M (*Trem2* 5'-ctcggagactctgactgg-3'; *Rldl* 5'-gtgagacaacagccctctc-3'; *Nlrp3* 5'-tatcactgccgagaggtga-3'; *il-1 β* 5'-actcaactgtgaaatgccacc-3') a 70 °C durante 5 minutos. A continuación, la mezcla de reacción que contenía, además de la muestra y el cebador, una mezcla de dNTP 1 mM, 10 U del inhibidor de ARNasa RiboLock (Thermo Fisher Sci., E00381) y 200 U de Maxima H Minus Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Sci., EP0751) o 50 % de glicerol se transcribieron durante 30 minutos a 60 °C seguido de 5 minutos a 85 °C. Finalmente, se agregaron 2 μ L del cebador directo correspondiente (2,5 μ M) (*Trem2* 5'-tggaaccgtcaccatcactc-3'; *Rldl* 5'-caggtgaattgggagagtg-3' *Nlrp3* 5'-tcttgcacactgggtgggtt-3'; *il-1 β* 5'-ttgggtccgtcaactcaa-3') y se amplificó por RT-qPCR convencional (5 minutos a 95 °C, seguido de 49 ciclos de 15 seg a 95 °C, 25 seg a 60 °C y 25 seg a 72 °C), utilizando SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, 1725271). El número de

transcriptos por gen codificante se calculó como el cambio de veces después de restar los valores umbrales (Ct) obtenidos de la muestra que contenía glicerol.

3.5.17 Determinación de proteínas

3.5.17.1 Bradford

Se realizó la cuantificación de proteínas mediante el kit Bio-Rad Protein Assay (Ref. 5000001). Brevemente, se preparó la solución de Bradford (Bradford 1976) diluyendo 1 parte del reactivo colorante con 4 partes de agua bidestilada. Inmediatamente después, se preparó la curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina (BSA) en un rango de 0,2 a 0,9 mg/mL donde la curva es lineal. Se tomaron 5 μ L de estándar o muestra, según el caso, y se combinaron con 250 μ L del reactivo de Bradford preparado con anterioridad en una placa de 96 pocillos. La lectura se realizó luego de una incubación de 5 minutos a 37 °C en el lector de placas DTX 880 de Beckman Coulter a una longitud de onda de 595 nm.

3.5.17.2 Ácido bicinónico (BCA)

Se realizó la cuantificación de proteínas mediante el Kit de ensayo de proteínas Pierce™ BCA (Ref. 23225). Brevemente, se preparó la curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina (BSA) en un rango de 0-2000 μ g/mL. Luego, se preparó el reactivo de trabajo mezclando 1:50 siguiendo las instrucciones del fabricante. Se colocó en una placa de 96 pocillos 200 μ L/pocillo de la mezcla de reactivos y 4 μ L de muestra diluída $\frac{1}{4}$ y/o de cada estándar. Se incubó 30 minutos a 37 °C y se leyó a 562 nm en lector de placas Multiskan Skyhigh de Thermo Scientific (Ref. A51119700C).

3.6 Análisis estadísticos

Todos los valores graficados representan la media \pm DE (desviación estándar) de determinaciones independientes. Los datos se analizaron en primer lugar mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y a continuación mediante ANOVA o ANOVA de 2 vías, según corresponda, seguida de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni utilizando el software GraphPad Prism 8.

RESULTADOS

4.1 ASTROCITOS

En este capítulo se describirán los resultados obtenidos en cultivos primarios de astrocitos. Si bien en la introducción general se presentó el tema, a continuación se detallan aspectos claves para la interpretación de los resultados expuestos.

4.1.1 Síntesis de colesterol cerebral: Papel fundamental de los astrocitos

Las lipoproteínas y el colesterol presentes en el SNC no proceden de la sangre periférica, sino que son sintetizados por la glía, fundamentalmente por los astrocitos. La biosíntesis del colesterol es un proceso de varios pasos estimulado por SREBP-2, un factor de transcripción, que cuando está inactivo se encuentra inmovilizado en la membrana del retículo endoplásmico (RE) formando un complejo con la proteína SCAP (Cleavage Activating Protein). Cuando los niveles de colesterol en el RE son bajos, el complejo SCAP-SREBP-2 migra al Golgi en donde el factor de transcripción es liberado (Leoni & Caccia 2015) y se traslada al núcleo donde se une a elementos reguladores de esteroides (SRE) en las regiones promotoras de genes esenciales para la biosíntesis del colesterol (Figura 8), como por ejemplo la enzima HMGCR (Anchisi et al. 2012; Martin et al. 2014).

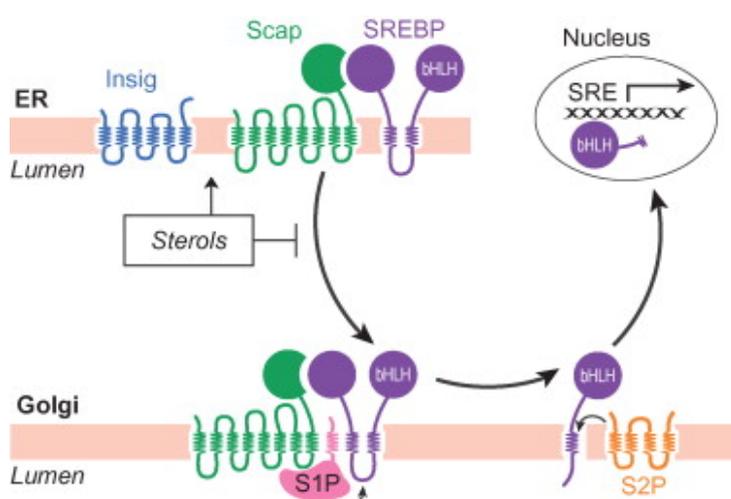


Figura 8: Vía de señalización de SREBP-2. En niveles normales de colesterol intracelular, SREBP-2 se encuentra inactivo en el retículo endoplásmico. Sin embargo, cuando los niveles de colesterol intracelular disminuyen, SREBP-2 se procesa y se libera de la membrana del RE. Luego, se transloca al núcleo celular, donde se une a los SRE en el ADN y promueve la transcripción de genes involucrados en la síntesis de colesterol. (Manual de señalización celular, 2^{da} edición 2010, Páginas 2505-2510)

El RE es el sitio principal para el plegamiento y la maduración de proteínas transmembrana, secretoras y residentes del propio RE (Lee 2001). La interrupción en la función del RE interfiere con el

plegamiento y la maduración adecuados de las proteínas que se encuentran en su interior, causa estrés en el RE e inicia la respuesta celular para proteínas mal plegadas (UPR). Esta vía de señalización intracelular integrada induce una inhibición traduccional temporal seguida de una regulación positiva de la expresión de las chaperonas del RE. La UPR está mediada por tres sensores residentes en el RE: una proteína quinasa transmembrana del RE tipo I (IRE-I), la activación del factor de transcripción 6 (ATF-6) y la quinasa del RE similar a PKR (PERK). La activación de estos tres sensores está mediada por la disociación de GRP78 después del estrés del RE (Kaufman, 2002, Lawrence de Koning et al. 2003; Lee, 2001, Rutkowski & Kaufman, 2004).

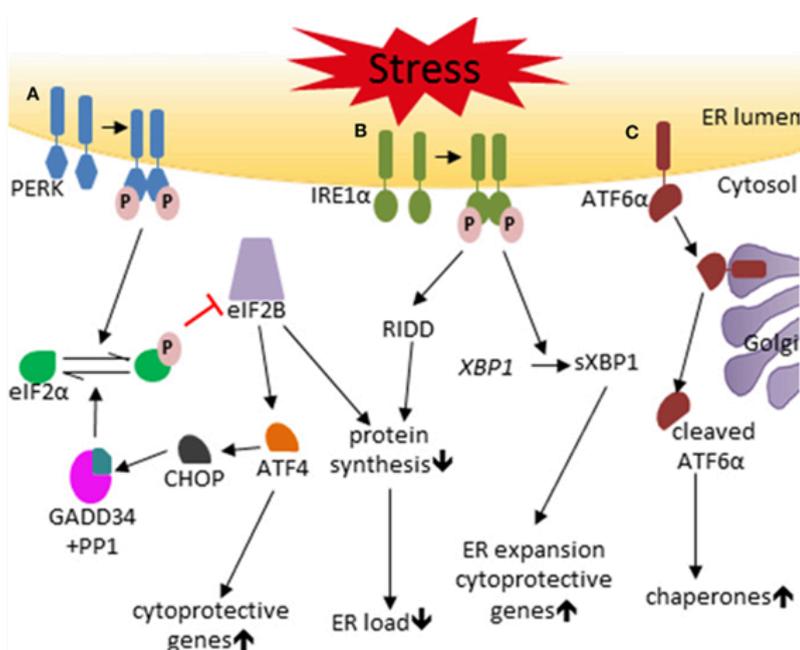


Figura 9: La respuesta a las proteínas mal plegadas o Vía UPR. (A) PERK se activa por homodimerización y autofosforilación. p-PERK fosforila eIF2α,

que reprime eIF2B, lo que resulta en una disminución de la actividad del RE mediante la estimulación preferente de la traducción de ATF4. ATF4 también aumenta la expresión de CHOP, que regula negativamente los niveles de p-eIF2α (B) IRE1 se activa por homodimerización y autofosforilación en condiciones de estrés del RE e induce genes citoprotectores y la expansión del RE. (C) La vía ATF6. El estrés

del RE provoca la translocación de ATF6 al complejo de Golgi, donde se activa mediante la escisión proteolítica por las proteasas SIP y S2P, dando lugar al fragmento ATF6 escindido de 50 kDa, que estimula la expresión de chaperonas. (Stone & Lin 2015)

Aunque la vía UPR puede proporcionar una ventaja protectora para la célula, el estrés prolongado o severo del RE puede resultar en la activación de caspasas y apoptosis (Feng et al. 2003, Hossain et al. 2003, Morishima et al. 2002). Varios grupos han informado que las condiciones que causan estrés o apoptosis en el RE inducen la activación de SREBP-2, independientemente del contenido de colesterol intracelular (Higgins & Ioannou, 2001; Lee & Ye, 2004; Werstuck et al. 2001).

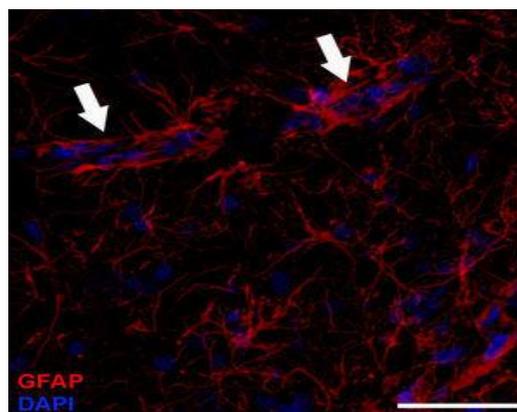
Transporte de colesterol hacia el espacio extracelular

El colesterol producido en el cerebro se combina con la ApoE, para formar lipoproteínas que se secretan al medio extracelular a través de transportadores ABC presentes en las membranas. Existen varias isoformas de transportadores ABC, entre ellos ABCA-1 desempeña un papel importante en la homeostasis del colesterol cerebral participando en la lipídación y la concentración en estado estacionario de ApoE (Kim et al. 2008). ABCA-1 representa el tipo principal de transportadores ABCA detectados en los astrocitos (Kim et al. 2006) y su expresión está regulada principalmente por los factores de transcripción LXR (receptores X hepáticos) y RXR (receptores X retinoides), que se unen a regiones promotoras específicas de genes diana cuando se activan con ligandos específicos (Costet et al. 2000; Luo et al. 2020). ABCA-1 inicia el transporte reverso de colesterol en los astrocitos mediante la transferencia de colesterol a ApoE sin lípidos. Para mantener los niveles estables, el exceso de colesterol es esterificado por la enzima acil-coenzima A: colesterol aciltransferasa 1 (ACAT1/SOAT1) en el RE y almacenado en "lipid droplets" (LD) como ésteres de colesterol (Wüstner & Solanko 2005). ACAT/SOAT1 es más activa en neuronas que en células gliales, en los astrocitos esta activación se da en condiciones tales como la falta de ApoE o la sobrecarga de colesterol exógeno (Sakashita et al. 2000).

4.1.2 Reactividad de los astrocitos

Los astrocitos experimentan una serie de modificaciones en su función frente a diferentes estímulos y se convierten en "astrocitos reactivos" caracterizados por cambios en su morfología y expresión génica, en particular de la proteína GFAP, que juega un papel vital en el soporte y reparación del tejido cerebral ([Figura 10](#)). GFAP pertenece a una familia de proteínas de filamentos intermedios que poseen principalmente funciones citoarquitectónicas (Pekny & Pekna 2004). Varios estudios en ratones transgénicos indican que la expresión de GFAP no es esencial para la apariencia y función normales de la mayoría de los astrocitos en el SNC sano, pero sí lo es para el proceso de astrogliosis reactiva y formación de cicatrices gliales (Herrmann et al. 2008; Pekny & Pekna 2004; Pekny et al. 1995).

Figura 10: Inmunohistoquímica contra GFAP. (rojo: astrocitos; azul: núcleos). Imagen de microscopía confocal. Barra = 70 μm (Imagen extraída de Guillamón-Vivancos et al. 2015)



La astrocitosis está significativamente asociada con la presencia de placas amiloides (Liddelov et al. 2017), existiendo varios estudios que han demostrado que el número de astrocitos que expresan GFAP aumenta significativamente en los cerebros de personas con EA, especialmente alrededor de las placas amiloides (Perez-Nievas et al. 2013; Serrano-Pozo et al. 2013; Galea et al. 2015; Bouvier et al. 2016). A su vez, se ha demostrado que los astrocitos reactivos (GFAP+) promueven el procesamiento amiloidogénico de APP, en ratones transgénicos 5XFAD y Tg2576 (Hartlage-Rubsamen et al. 2003; Liang et al. 2020), así como en el hipocampo y la corteza de humanos con EA (Hartlage-Rubsamen et al. 2003; Chacon-Quintero et al. 2021). Esta activación de la vía pro-amiloidogénica ocurre en respuesta a diferentes estímulos, como estímulos inflamatorios (Hong et al. 2003; Zhao et al. 2011) o lesión cerebral crónica (Liang et al. 2020) o $A\beta$ mismo (Liang et al. 2020; Jin et al. 2012).

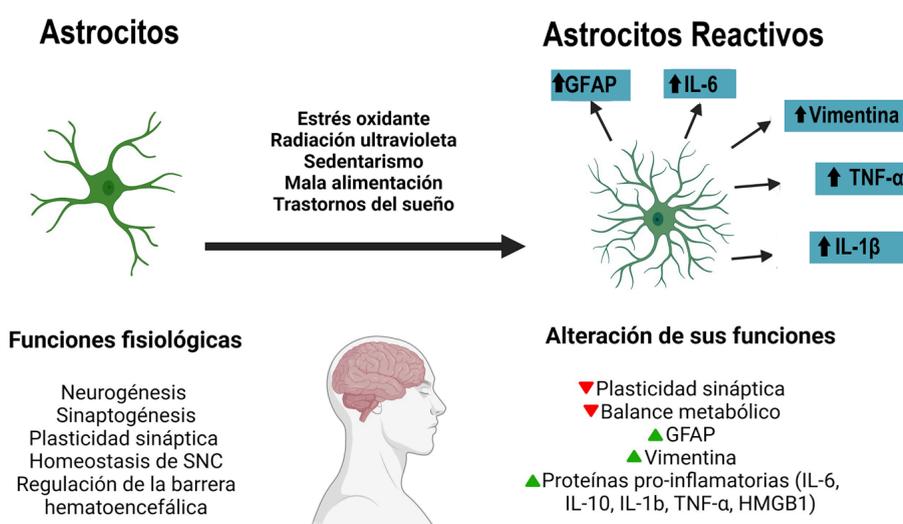


Figura 11: Fases y cambios asociados a la astrogliosis reactiva. La astrogliosis es un proceso continuo y progresivo que implica cambios morfológicos, moleculares y funcionales en los astrocitos (Imagen adaptada de Torres-Ramos & Morales-López 2022).

La reactividad de los astrocitos también potencia los mecanismos secundarios de lesión, como la inflamación y el estrés oxidativo, claves en la progresión de la EA (figura 11) (González-Reyes et al. 2017). Además, la inflamación en sí misma puede afectar el perfil de secreción de astrocitos (Choi et al. 2014) induciendo un fenotipo reactivo que pierde su capacidad para promover la sinaptogénesis y supervivencia neuronal induciendo, en cambio, muerte neuronal (Liddel et al. 2017). El análisis transcripcional de astrocitos de ratones APP/PS1 ha mostrado una regulación al alza de genes inflamatorios y una expresión reducida de genes implicados en el apoyo neuronal (Orre et al. 2014). Además, varios estudios *in vitro* han demostrado que los astrocitos pueden mediar efectos neurotóxicos o sinaptotóxicos mediante la liberación de citoquinas proinflamatorias, microvesículas y otras moléculas en respuesta a A β (Sollvander et al. 2016; Garwood et al. 2011; Lian et al. 2015). Es interesante notar que se ha encontrado que el estrés oxidativo puede desencadenar la reactividad de los astrocitos y que los astrocitos reactivos producen más ROS/RNS (Chen et al. 2020b). Incluso, otros estudios han dejado claro que el estrés oxidativo se correlaciona con una mayor producción de la forma oligomérica de A β , que es altamente tóxica (Fawzi et al. 2006; Walsh et al. 2001; Drake et al. 2003). Se ha detectado una reducción en los niveles de enzimas antioxidantes en la EA y en el cerebro con deterioro cognitivo leve (DCL), lo que hace más vulnerables a los efectos tóxicos inducidos por A β (1-42) (Pocernich et al. 2011). Otro efecto del daño oxidativo se caracteriza por niveles elevados de oxidación de proteínas, lípidos, ADN y ARN, así como disfunciones en las neuronas y muerte (Butterfield et al. 2010; Lovell et al. 2007).

4.1.3 Comunicación astrocito-neurona en la EA

Las VE son una familia heterogénea de vesículas limitadas por membrana que son liberadas por casi todos los tipos celulares. Se ha demostrado que la liberación de VE actúa como mediador importante de la comunicación intercelular tanto en el proceso fisiológico normal, así como en la progresión patológica (Frühbeis et al. 2012; Marcilla et al. 2012; Barteneva et al. 2013). Estudios recientes muestran que una de las formas importantes de comunicación entre los astrocitos y las neuronas se produce a través de VE (Bianco et al. 2009; Datta Chaudhuri et al. 2020; Frühbeis et al. 2013). Se cree que las VE liberadas por los astrocitos (ADEV) en condiciones normales tienen propiedades neurotróficas y neuroprotectoras. Sin embargo, en enfermedades neurodegenerativas

como la EA, las ADEV desempeñan un papel en la propagación de la neuropatología o en la exacerbación del grado de neurodegeneración (Schiera et al. 2015; Silverman et al. 2019).

Existe evidencia considerable que respalda la participación de las ADEV como portadores de proteínas agregadas como los oligómeros beta amiloides y las protofibrillas de A β en la patogenia de la EA (Sollvander et al. 2016). En relación con esto, se sabe que en las primeras etapas de la EA los astrocitos fagocitan cantidades masivas de agregados de A β (Jones et al. 2013; Nielsen et al. 2010), sin embargo un estudio realizado por Sollvander y col mostró que los astrocitos, cuando se cultivan conjuntamente con neuronas y oligodendrocitos, fagocitan una proporción más significativa de protofibrillas A β 42 (Sollvander et al. 2016).

4.1.4 Objetivos

En relación a lo expuesto en la introducción general y, más específicamente en la introducción de este capítulo, los **objetivos específicos** que se abordarán en cultivos primarios de astrocitos, exceptuando el objetivo 5 que se realizará en cultivos primarios neuronales, son:

Objetivo específico 1. Analizar los niveles de Cu (espectrofotometría) y colesterol (total, libre y esterificado) intracelulares y extracelulares.

Objetivo específico 2. Estudiar el metabolismo del colesterol y los niveles del factor de transcripción SREBP-2 así como la expresión de transportadores de la familia ABC (ABCA-1) y el receptor de LDL.

Objetivo específico 3. Evaluar la generación de estrés oxidativo/nitrativo por medio del análisis de enzimas del SDA, marcadores de daño a biomoléculas y niveles de ROS.

Objetivo específico 4. Investigar la respuesta inflamatoria de los astrocitos midiendo la expresión interleuquinas proinflamatorias

Objetivo específico 5. Analizar los niveles de APP en las balsas lipídicas de neuronas incubadas con medio condicionado de astrocitos, como posible marcador de EA.

Objetivo específico 6. Evaluar la acción neuro restauradora/antiinflamatoria y el efecto sobre el metabolismo lipídico de la transferencia génica de IGF-1 ante la sobrecarga de Cu.

Objetivo específico 7. Analizar la activación de las distintas vías de señalización UPR (unfolded protein response) ligadas al estrés de RE en presencia de sobrecargas subletales de Cu, y su influencia sobre la biosíntesis de colesterol.

4.1.5 Resultados

4.1.5.1 Astrocitos de Ratas Sprague-Dawley

Los cultivos de astrocitos se expusieron a diferentes concentraciones de Cu ([Figura 12](#)) durante 24 horas (véase la [sección 3.4.1](#)). Se consideró como concentración subletal de Cu (400 μM) la concentración más alta de este metal que no presentó diferencia significativa en la viabilidad celular, medida con resazurina (véase la [sección 3.5.1.1](#)), respecto del control y por ello se utilizó en los experimentos posteriores. La elección de una concentración subletal se debe a que el objetivo es estudiar los efectos del Cu a la máxima concentración que no produzca muerte celular, pero que pudiera tener efecto sobre los aspectos estudiados.

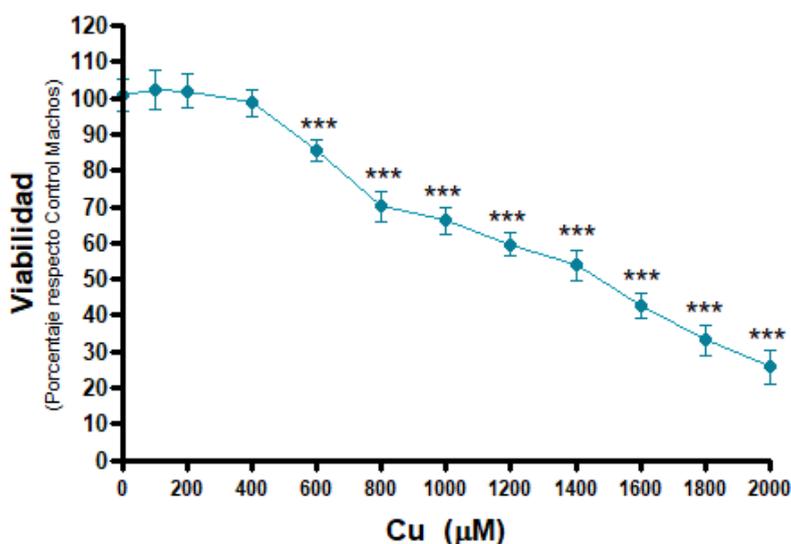


Figura 12: Viabilidad celular. La viabilidad celular se determinó por el método de Resazurina. Los resultados se calcularon mediante ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett y expresaron el porcentaje medio \pm DE del control ($n= 6$ para cada concentración utilizada). Las diferencias estadísticas respecto del control sin Cu se indican como *** $p < 0,01$.

Una vez fijada la concentración subletal para los tratamientos, se midió la concentración intracelular de Cu para determinar si efectivamente ingresaba en las células. Nuestros resultados mostraron que cantidades similares de Cu entran en los astrocitos independientemente de que sean astrocitos derivados de crías hembra (ADCH) ($28,84 \pm 3,9 \mu\text{g/dL}$) o astrocitos derivados de crías macho (ADCM) ($31,11 \pm 4,01 \mu\text{g/dL}$) ([figura 13A](#)). Además, se determinó por citometría de flujo utilizando IP como fluoróforo, si el tratamiento con Cu efectivamente no producía muerte celular. Podemos observar que no hay desplazamiento del pico correspondiente al Cu respecto a la población control, confirmando que nuestro tratamiento es sub-letal para los astrocitos ([figura 13B](#)).

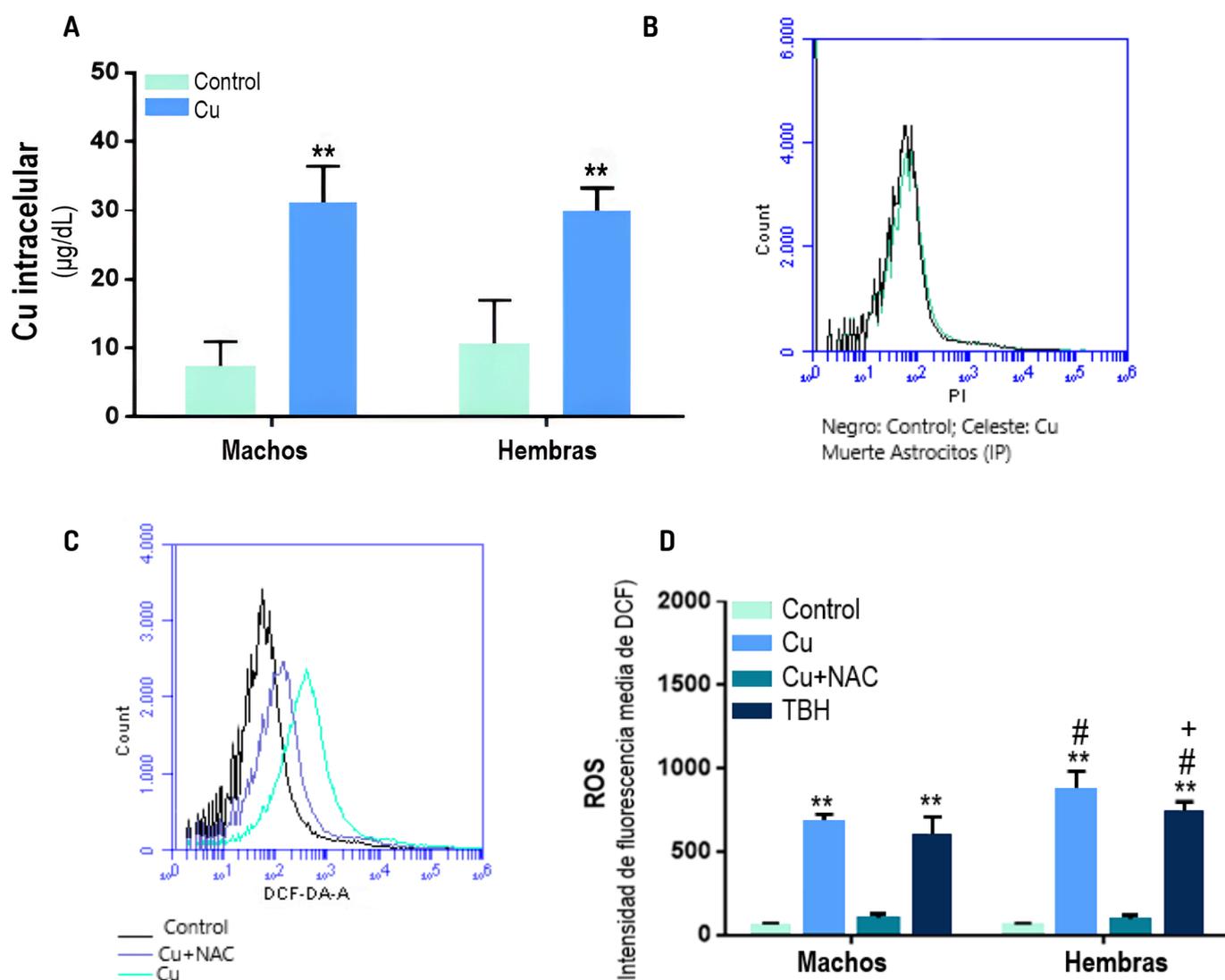


Figura 13: Efecto del tratamiento con Cu sobre el contenido celular de Cu y producción de ROS en ADCH y ADCM de Ratas Sprague-Dawley. (A) Concentración celular de Cu ($\mu\text{g/dL}$) medida por AAS ($n=6$); (B) Viabilidad celular por citometría de flujo con IP ($N=8$); (C) y (D) Niveles de ROS por citometría de flujo utilizando DCF-DA. En el gráfico se representa la intensidad de fluorescencia media medida en urf; ($n=6$) Los datos se analizaron mediante ANOVA de dos vías seguido de post test de Bonferroni y se expresan media de urf \pm DE, ** $p < 0,01$ diferencias significativas respecto del control en el mismo sexo, + diferencias significativas entre Cu y TBH en el mismo sexo ($p < 0,05$) y # diferencias significativas entre hembra y machos con mismo tratamiento ($p < 0,05$ con TBH y $p < 0,01$ con Cu).

A continuación, se midió la producción de ROS mediante citometría de flujo utilizando DCF-DA tras 24 horas de tratamiento con $400 \mu\text{M}$ de Cu. En la gráfica de distribuciones del histograma (figura 13B), se observa un desplazamiento del pico de la muestra perteneciente al Cu hacia la derecha en comparación con el control, lo cual indica un aumento en la intensidad de fluorescencia (medido en unidades relativas de fluorescencia o urf, una medida adimensional utilizada para expresar la

intensidad de fluorescencia de una muestra y normalizada para comparar cuantitativamente diferentes experimentos o condiciones). Podemos confirmar que los tratamientos con Cu (machos Cu $689,8 \pm 37$ urf vs ctrl $56,4 \pm 3,09$ urf y hembras Cu $888,47 \pm 90,18$ urf vs ctrl $53,29 \pm 2,53$ urf) y con TBH (machos TBH $599,32 \pm 111,67$ urf y hembras TBH $732,74 \pm 64,85$ urf) produjeron un aumento significativo de ROS en los astrocitos respecto del control ($p < 0,01$) y, a su vez, que este aumento fue significativamente mayor en hembras respecto a machos tanto con Cu ($p < 0,01$) como con TBH ($p < 0,05$) (figura 13C). Es interesante notar que los ADCH tratados con Cu mostraron un aumento significativo de ROS respecto de las hembras tratadas con TBH ($p < 0,05$). Por otro lado, cuando las células expuestas a Cu se trataron previamente con NAC, se observó una disminución significativa respecto al control ($p < 0,05$) de la producción de ROS tanto en ADCM como en ADCH (machos Cu+NAC $104,27 \pm 25,54$ urf vs ctrl $56,4 \pm 3,09$ urf y hembras Cu+NAC $95,44 \pm 21,21$ urf vs ctrl $53,29 \pm 2,53$ urf).

Posteriormente, se analizó el efecto del Cu sobre el estrés oxidativo celular, y se pudo observar que el Cu produjo un aumento de TBARS significativo respecto del control (Cu hembras $9,96 \mu\text{mol}/\mu\text{g prot} \pm 4,1$ vs. Ctrl $3,77 \mu\text{mol}/\mu\text{g prot} \pm 1,22$ y Cu machos $11,17 \mu\text{mol}/\mu\text{g prot} \pm 3,38$ vs. Ctrl $3,21 \mu\text{mol}/\mu\text{g prot} \pm 1,18$) aunque, sorprendentemente, no se observaron diferencias significativas entre los ADCH y ADCM (figura 14A). La actividad de SOD mostró el mismo comportamiento que las ROS luego del tratamiento con Cu (figura 14B), donde se observa un aumento significativo ($p < 0,05$) en hembras (Cu $0,069 \text{ U}/\mu\text{g prot.} \pm 0,018$) con respecto a los machos ($0,054 \text{ U}/\mu\text{g prot.} \pm 0,014$).

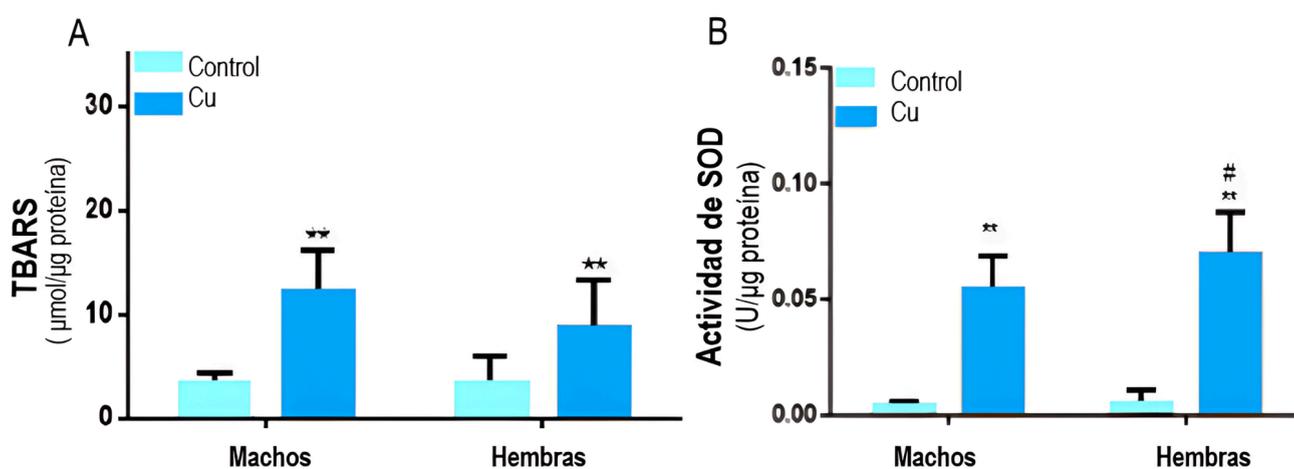


Figura 14: Efecto del tratamiento con Cu sobre el estrés oxidativo en ADCH y ADCM de Ratas Sprague-Dawley. (A) peroxidación lipídica determinada mediante el ensayo TBARS ($n=8$) y (B) actividad de SOD por espectrofotometría UV-Visible ($n=8$). Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías seguido de post test de Bonferroni y se expresan media \pm

DE, ** $p < 0,01$ diferencias significativas respecto del control en el mismo sexo, y # $p < 0,05$ diferencias significativas Cu hembra vs Cu macho.

La [figura 15](#) muestra que el tratamiento con Cu aumenta de forma significativa ($p < 0,01$) tanto los niveles de expresión de GFAP ([figura 15A](#)) (Cu hembras $286,25 \% \pm 33,66$ vs. Ctrl hembras $102,49 \% \pm 5,3$ y Cu machos $228,55 \% \pm 13,79$ vs. Ctrl machos $97,5 \% \pm 5,86$) como de TNF- α (Cu hembras $35,74$ UA $\pm 1,27$ vs Ctrl hembras $10,67$ UA $\pm 2,6$ y Cu machos $27,67$ UA $\pm 1,18$ vs Ctrl machos $8,48$ UA $\pm 1,91$) en los cultivos astrocitarios ([figura 15B](#)). En ambos casos, el aumento fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en los ADCH respecto de los ADCM. A su vez, se pudo observar que cuando se incubó con el antioxidante NAC los niveles de GFAP se restablecieron a valores cercanos al control para los ADCM ($123,05 \% \pm 10,65$) pero no así para los ADCH ($133,75 \% \pm 16,62$), las cuales mostraron valores significativamente mayores ($p < 0,05$) respecto al control. En cuanto a los valores de TNF- α , se pudo ver que a pesar del tratamiento con NAC sus niveles fueron significativamente superiores a los controles ($p < 0,01$; Cu+NAC hembras $23,94$ UA $\pm 1,41$ vs. $10,8$ UA $\pm 4,48$ y $p < 0,01$; Cu+NAC machos $21,4$ UA $\pm 0,64$ vs. Ctrl $9,54$ UA $\pm 2,76$). Si bien no se restablecieron los valores de TNF- α a niveles basales, si fueron significativamente menores que tras el tratamiento con Cu solo, tanto en ADCH como ADCM (Cu+NAC hembras $23,94$ UA $\pm 1,41$ vs. Cu hembras $37,85$ UA $\pm 1,54$ y Cu+NAC machos $21,4$ UA $\pm 0,64$ vs Cu Machos $28,96$ UA $\pm 1,33$).

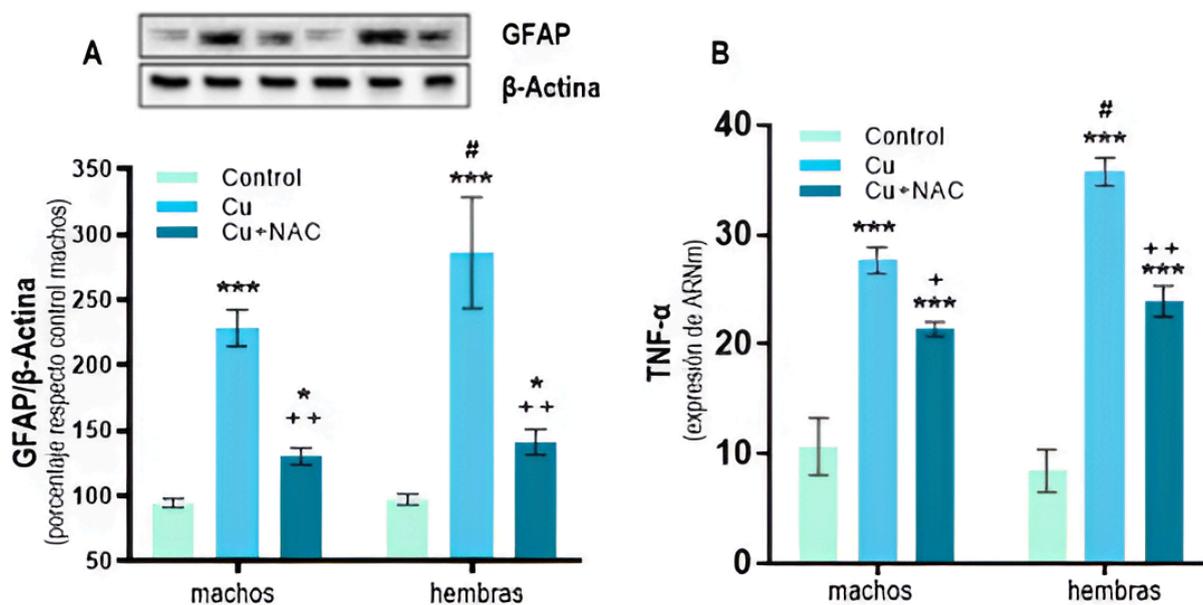


Figura 15: Efecto del tratamiento con Cu sobre la activación astrocitaria en cultivos de ADCH y ADCM de Ratas Sprague-Dawley. Niveles de GFAP analizados por western blot ($n=6$) y de TNF- α por RT-PCR ($n=6$). Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías seguido de post test de Bonferroni y se expresan media \pm DE, *** ($p < 0,01$) y * ($p < 0,05$) diferencias significativas respecto del control en el mismo sexo, ++ ($p < 0,01$) y + ($p < 0,05$) diferencias significativa entre Cu y

Cu+NAC en el mismo sexo y # $p < 0,05$ diferencias significativas entre hembras y machos con el mismo tratamiento. Cada banda en el western blot se correlaciona con la respectiva barra en el gráfico, manteniendo el mismo orden secuencial

En la [figura 16](#) se observan los resultados relacionados con la síntesis *de novo* de colesterol en cultivos de ADCH y ADCM. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con Cu aumentó la expresión de SREBP-2 respecto del control ($p < 0,01$) en los cultivos analizados, siendo mayor en los ADCH en comparación con los ADCM ($p < 0,05$) (hembras Cu $5,07 \text{ UA} \pm 0,46$ vs. Ctrl $0,78 \text{ UA} \pm 0,11$, y machos Cu $3,70 \text{ UA} \pm 0,36$ vs. Ctrl $0,76 \text{ UA} \pm 0,11$) ([figura 16A](#)). A su vez, el tratamiento con Cu + NAC indujo una disminución hasta niveles similares al control de la expresión de SREBP-2 (hembras Cu+NAC $3,70 \text{ UA} \pm 0,36$, $p < 0,05$ y machos Cu+NAC $2,97 \text{ UA} \pm 0,16$, $p < 0,05$). Cuando los cultivos se trataron con TBH (hembras TBH $6,67 \text{ UA} \pm 1,64$ y machos TBH $4,74 \text{ UA} \pm 1,23$), se observó un aumento significativo en ($p < 0,01$) respecto al control, aunque menor que respecto al tratamiento con Cu ($p < 0,05$).

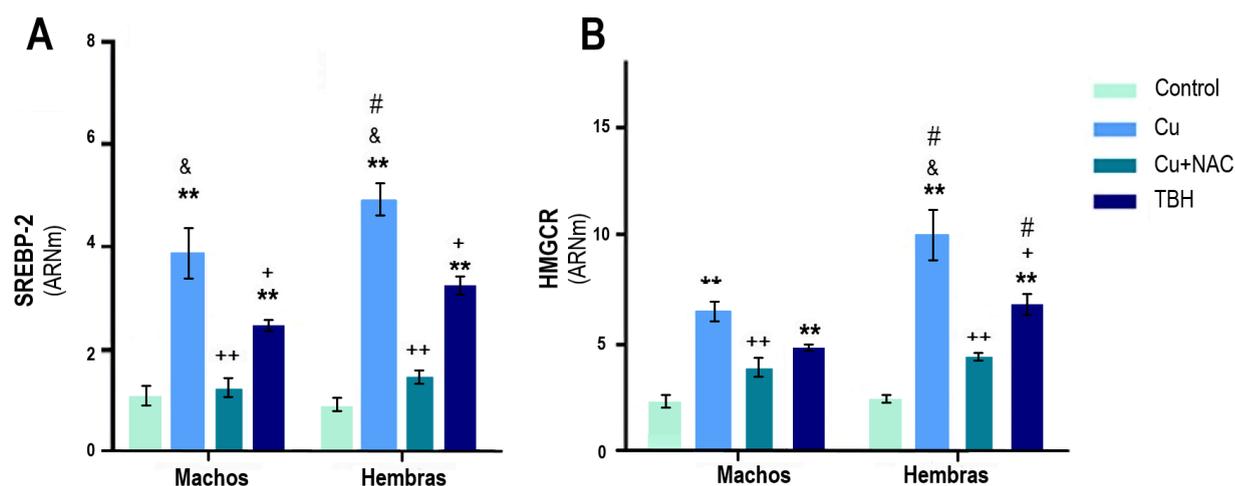
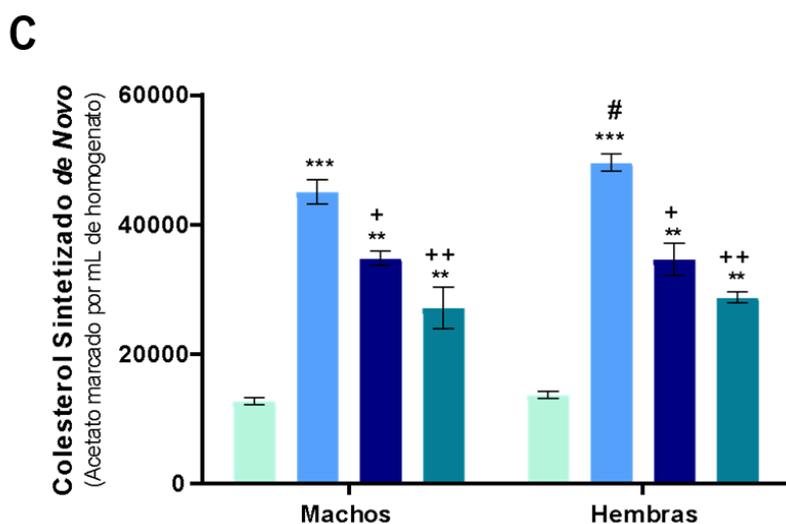


Figura 16: Efecto del Cu en el metabolismo del colesterol en cultivos de ADCH y ADCM de Ratas Sprague-Dawley. (A) Expresión de SREBP-2 (n= 4); (B) Expresión de HMGCRCR (n=4); (C) colesterol sintetizado *de novo* (n=14). Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías seguido de post test de Bonferroni y se expresan la media \pm DE, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$ diferencias significativas respecto del control en el mismo sexo, + ($p < 0,05$) y ++ ($p < 0,01$) diferencias significativas respecto al Cu mismo sexo, & $p < 0,05$ diferencias significativas entre Cu y TBH en el mismo sexo y # diferencias significativas entre hembra y macho con mismo tratamiento ($p < 0,05$ para SREBP-2, $p < 0,01$ para Cu HMGCRCR, $p < 0,1$ TBH HMGCRCR y $p < 0,01$ para síntesis *de novo* de colesterol).



En línea con lo anterior, la expresión de HMGCRC también aumentó respecto del control (hembras 13,32 UA \pm 2,6 vs. Ctrl, 2,78 UA \pm 0,36, $p < 0,01$ y machos 8,94 UA \pm 0,65 vs. Ctrl 2,26 UA \pm 0,69, $p < 0,01$) tras la adición de Cu durante 24 horas, siendo mayor el aumento en los astrocitos provenientes de hembras que en los provenientes de machos. Cuando los cultivos se trataron con TBH (hembras TBH 3,27 UA \pm 1,06 y machos TBH 2,72 UA \pm 1,21), la expresión de HMGCRC aumentó significativamente respecto al control ($p < 0,01$), aunque también fue menor que con el tratamiento con Cu ($p < 0,05$). Es destacable el hecho de que el tratamiento con Cu + NAC sólo aumenta la expresión de HMGCRC de forma significativa respecto del control (4,88 UA \pm 1,85) en los ADCH (Figura 16B).

En concordancia con la expresión de SREBP-2 y HMGCRC, los tratamientos con Cu ($p < 0,01$) y TBH ($p < 0,01$) aumentaron la síntesis *de novo* de colesterol en cultivos primarios de astrocitos, siendo mayor en los ADCH (Cu 48.653 \pm 1900,18 dpm/mL) respecto de los ADCM (Cu 41.675 \pm 2507,18 dpm/mL (figura 16C). A pesar de ello, luego del tratamiento con Cu se observaron niveles significativamente superiores de colesterol que con TBH ($p < 0,05$) (machos 34674 \pm 540,18 dpm/mL y hembras 36123 \pm 750,81 dpm/mL). Sorprendentemente, los niveles de colesterol sintetizado *de novo* tras el tratamiento con Cu + NAC (machos 26965 \pm 1180,22 urf y hembras 31123 \pm 870,18 urf) también fueron significativamente superiores a los de los astrocitos control (machos 10534 \pm 795,55 urf y hembras 11032 \pm 540,18 urf), tanto en los ADCM como en los ADCH. A pesar de ello, fueron significativamente inferiores a los de los tratamientos con Cu ($p < 0,01$) y TBH ($p < 0,05$). En resumen, nuestros hallazgos indican que el tratamiento con Cu afecta la síntesis *de novo* de colesterol en astrocitos. Estos efectos están mediados por la regulación de SREBP-2 y HMGCRC, y muestran una clara influencia del sexo, siendo más pronunciados en los ADCH. Para evaluar si el colesterol sintetizado *de novo* podría ser liberado al medio extracelular luego del tratamiento con Cu, analizamos los niveles de proteína del transportador de colesterol ABCA-1 en los homogenatos celulares (figura 17A) y los niveles de colesterol marcado radiactivamente en el medio de cultivo (figura 17B). Los niveles de ABCA-1 fueron mayores tras el tratamiento con Cu (Cu machos 1,32 UA \pm 0,37 vs. Ctrl hembras 0,63 UA \pm 0,167 y Cu hembras 1,57 UA \pm 0,4 vs. Ctrl machos 0,68 UA \pm 0,14), y además este aumento fue aún más pronunciado en los ADCH respecto de los ADCM (figura 17A). En línea con esto, observamos que el colesterol sintetizado *de novo* también se libera al medio de cultivo siguiendo el mismo comportamiento que ABCA-1, siendo significativamente mayor ($p < 0,01$) tras el tratamiento con Cu (hembras 48545,65 \pm 962,79 dpm/mL y machos 44699,71 dpm/mL \pm 1784,91) respecto a los controles

(hembras $29679,36 \pm 6797,75$ dpm/mL y machos $27670,01$ dpm/mL $\pm 7079,66$). La liberación de colesterol mediada por Cu disminuyó significativamente ($p < 0,01$) cuando los cultivos se incubaron con Cu+NAC (hembras $28738,89$ dpm/mL $\pm 7428,64$ y machos $28309,46$ dpm/mL $\pm 7004,82$). Es importante destacar que también se observó un aumento significativo de colesterol marcado en el medio de cultivo tras el tratamiento con el inductor de ROS (TBH) ($p < 0,05$, hembras $36294,45$ dpm/mL $\pm 4729,21$ y machos $34865,01$ dpm/mL $\pm 4140,70$)

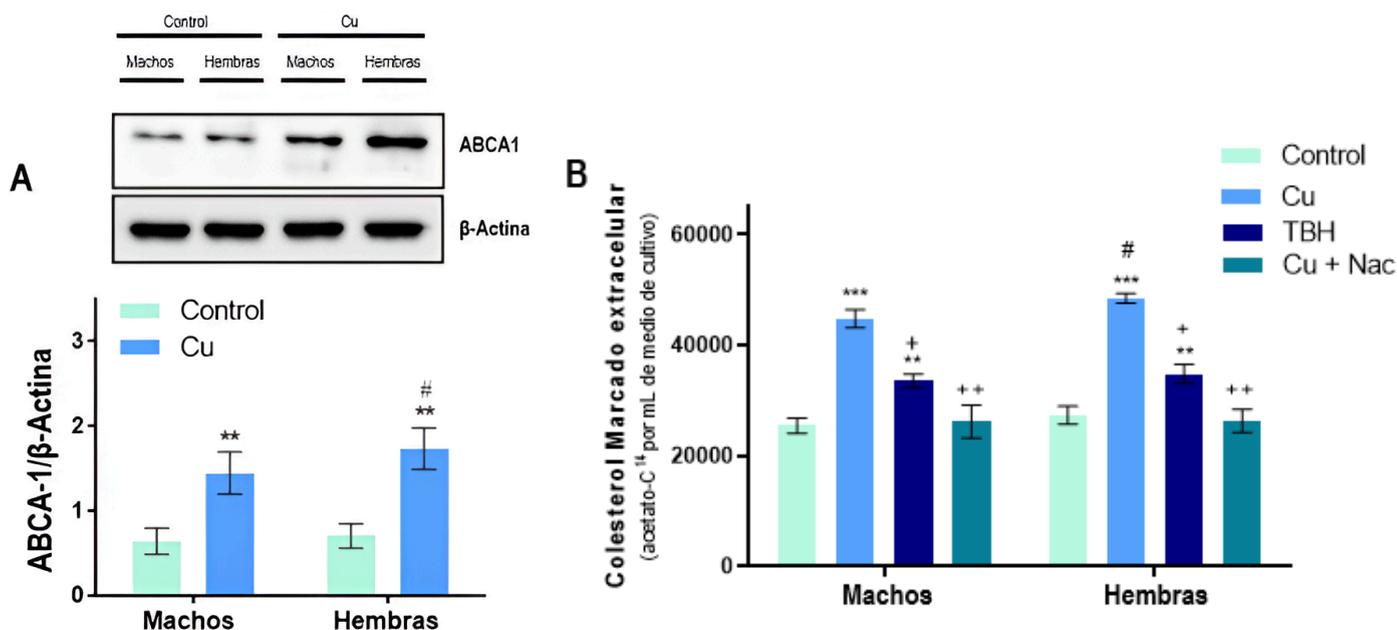


Figura 17: Efectos del Cu en la liberación de colesterol en cultivos de ADCH y ADCM de Ratas Sprague-Dawley. (A) Niveles de ABCA-1 (n=8); (B) Colesterol sintetizado *de novo* en el medio de cultivo (n=8). Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías seguido de post test de Bonferroni y se expresa la media \pm DE, *** $p < 0,001$ y ** $p < 0,01$ diferencias significativas entre respecto del control en el mismo sexo, # diferencias significativas entre Cu hembra vs Cu macho ($p < 0,05$ para ABCA-1 y $p < 0,01$ para colesterol marcado en el medio de cultivo), ++ ($p < 0,01$) y + ($p < 0,05$) respecto al Cu en el mismo sexo. Cada banda presente en el western blot mantiene el mismo orden secuencial que las barras del histograma.

4.1.5.1 Influencia del medio de cultivo condicionado derivado de astrocitos sobre los niveles de colesterol y APP en las balsas de membrana neuronales

Es sabido que las neuronas maduras incorporan colesterol sintetizado por los astrocitos, lo que afecta de forma directa a la concentración de colesterol en sus balsas de membrana (Mattioli et al. 2018). Dado que encontramos un aumento significativo de los niveles de colesterol marcado en el medio de cultivo de los astrocitos que se trataron con Cu respecto de los controles sin Cu (figura 17B), decidimos exponer cultivos primarios de neuronas a estos medios condicionados. Nuestros resultados mostraron que los niveles neuronales de colesterol en las balsas de membrana eran más altos

después de que las neuronas fueran expuestas al medio condicionado de astrocitos tratados con Cu respecto de aquellas expuestas al medio condicionado del control (hembras Cu $85,65 \text{ UA} \pm 8,92$ vs. Ctrl $45,61 \text{ UA} \pm 16,16$, $p < 0,01$ y machos Cu $63,48 \text{ UA} \pm 6,03$ vs. Ctrl $42,16 \text{ UA} \pm 9,31$, $p < 0,01$) (figura 18A).

Además de los cambios de colesterol en las balsas de membrana, evaluamos los niveles de la proteína APP en dichas balsas. Observamos un aumento de APP con los tratamientos con Cu tanto en machos ($p < 0,01$; Cu $189,88 \text{ UA} \pm 13,11$ vs. Ctrl $97,44 \text{ UA} \pm 31,11$) y hembras ($p < 0,01$; Cu $153,32 \text{ UA} \pm 18,43$ vs. Ctrl $94,55 \text{ UA} \pm 28,44$), siendo significativamente mayor ($p < 0,05$) en hembras respecto a machos

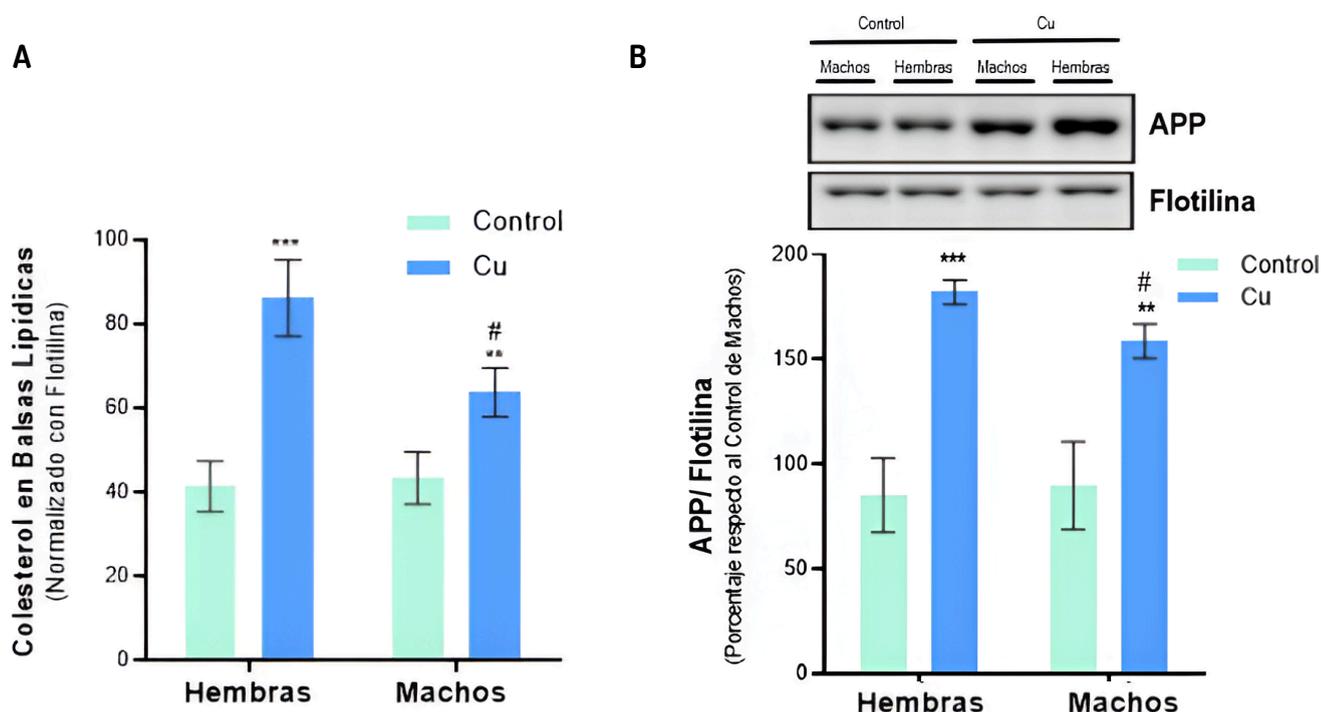


Figura 18: Efecto del medio de cultivo condicionado de astrocitos sobre los niveles de colesterol y APP en las balsas de membrana neuronal. (A) Niveles de colesterol en las balsas de membrana de las neuronas determinados por HP-TLC seguido del análisis de la intensidad de las bandas ($n=12$). (B) Proporción APP/flotilina en las balsas de membrana neuronal determinada por Western blot ($n=12$). Los resultados se calcularon mediante ANOVA de 2 vías más la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni, y los datos expresan media \pm DE, *** $p < 0,001$ y ** $p < 0,01$ diferencias significativas respecto del control en el mismo sexo y # diferencias significativas entre Cu hembra vs Cu macho. Cada banda presente en el western blot mantiene el mismo orden secuencial que las barras del histograma.

4.1.5.1.2 Impacto de la terapia génica con IGF-1

Se evaluó el efecto de la terapia génica con rAd-IGF-1 en astrocitos de rata Sprague-Dawley tratados con Cu. Para ello nuevamente se empleó TBH como control positivo de producción de ROS y el tratamiento combinado de Cu+NAC (antioxidante) con el fin de poder dilucidar si los efectos que se observan se deben a la producción de ROS por parte de Cu, a la presencia de Cu *per se* o a ambos. A

continuación, se midió la producción de ROS mediante citometría de flujo utilizando DCF-DA tras 24 horas de tratamiento con 400 μ M de Cu (Figura 19).

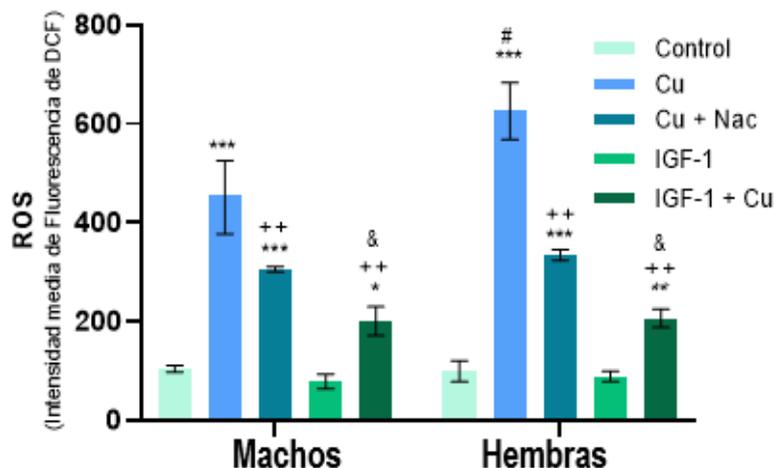
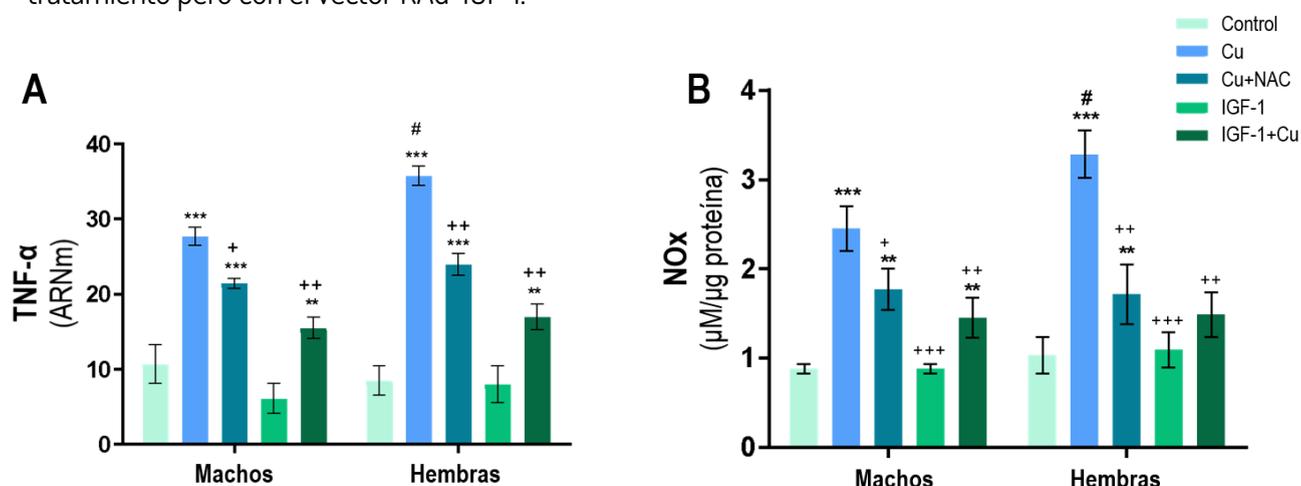


Figura 19: Efecto del tratamiento con Cu sobre la producción de ROS en ADCH y ADCM de Ratas Sprague-Dawley. Niveles de ROS (n=4). Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías seguido de post test de Bonferroni y se expresan media \pm DE, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$ diferencias significativas respecto del control en el mismo sexo, ++ ($p < 0,01$) diferencias significativas respecto al Cu mismo sexo, & ($p < 0,05$) diferencias entre Cu+NAC y Cu+IGF-1 en el mismo sexo y # diferencias significativas Cu hembra vs Cu macho.

La figura 19 muestra que el tratamiento con Cu provocó un aumento significativo ($p < 0,001$) (machos Cu 495,46 urf \pm 118,29 y hembras Cu 625,6675 urf \pm 57,18) en la generación de ROS respecto a los controles (machos Ctrl 103,955 urf \pm 6,92 y hembras Ctrl 99,26 urf \pm 21,27). Además, tanto el tratamiento con Cu+NAC ($p < 0,05$; machos 305,25 urf \pm 5,48 y hembras 334,67 urf \pm 11,18) como Cu+IGF-1 ($P < 0,01$; machos 200,375 urf \pm 29,12 y hembras 206,325 urf \pm 18,74) redujeron significativamente la generación de ROS, siendo más pronunciado este efecto luego del tratamiento con Cu+IGF-1 ($p < 0,05$). Los controles tanto en ADCH como ADCM (machos 78,37 urf \pm 14,59 y hembras 88,82 urf \pm 10,43) no presentan diferencias significativas respecto a sus respectivos controles sin tratamiento pero con el vector RAd-IGF-1.



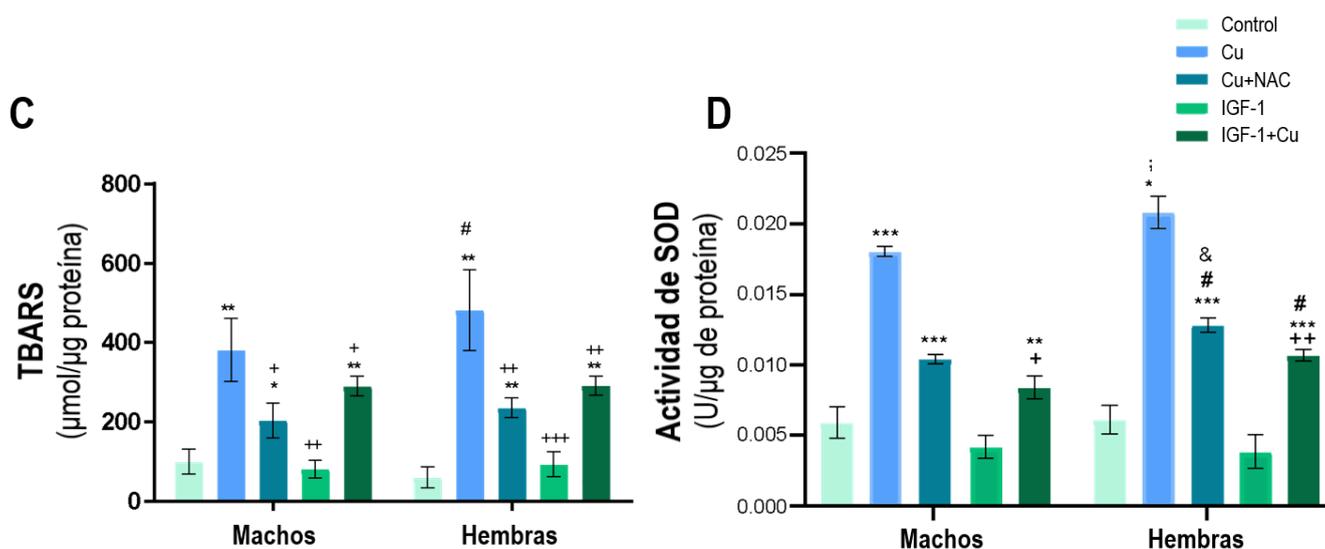


Figura 20: Efecto del tratamiento con Cu sobre el estrés oxidativo en ADCH y ADCM de Ratas Sprague-Dawley. (A) niveles de ARNm de TNF- α , (B) Nitritos y Nitratos [NO $_x$], (C) Peroxidación lipídica (TBARS) (n=5) y (D) Actividad de SOD (n=5). Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías seguido de post test de Bonferroni y se expresan media \pm DE, *** ($p < 0,001$), ** ($p < 0,01$) y * ($p < 0,05$) diferencias significativas respecto del control en el mismo sexo, + ($p < 0,05$), ++ ($p < 0,01$) y +++ ($p < 0,001$) diferencias respecto al Cu en el mismo sexo, & ($p < 0,05$) diferencias entre IGF-1+ Cu y Cu+NAC en el mismo sexo y # ($p < 0,05$) diferencias significativas entre hembras y machos con el mismo tratamiento.

A su vez, analizamos el efecto del tratamiento con Cu sobre el estrés oxidativo y el estado proinflamatorio en ADCH y ADCM de ratas Sprague-Dawley pre-tratados con el vector viral RAd-IGF-1. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con Cu solo, aumenta significativamente la expresión de la interleucina proinflamatoria TNF- α (Cu hembras 35,75 UA \pm 1,27 y Cu machos 27,67 UA \pm 1,18) respecto al co-tratamiento RAd-IGF-1 + Cu (Cu+IGF-1 hembras 16,95 UA \pm 1,73 y Cu+IGF-1 machos 15,5 UA \pm 1,4) (figura 20A). Adicionalmente, observamos la terapia génica con IGF-1 tiende a ser más eficaz en prevenir el aumento de TNF- α inducido por la presencia de Cu en comparación con el tratamiento con NAC, aunque no es significativo (hembras Cu+IGF-1 16,95 UA \pm 1,73 vs Cu+NAC 23,94 UA \pm 1,41 y machos Cu+IGF-1 15,5 UA \pm 1,4 vs. Cu+NAC 21,4 UA \pm 0,64). El tratamiento con Cu también indujo estrés oxidativo en los astrocitos, viéndose reflejado en un aumento significativo de [NO $_x$] ($p < 0,01$; hembras Cu 3,28 μ M/ μ g Prot. \pm 0,26 vs. Ctrl 1,03 μ M/ μ g Prot. \pm 0,2 y machos Cu 2,45 μ M/ μ g Prot. \pm 0,25 vs. Ctrl 0,88 μ M/ μ g Prot. \pm 0,06) (figura 20 B), de TBARS ($p < 0,01$; hembras Cu 481,49 μ mol/ μ g Prot. \pm 101,56 vs. Ctrl 60 μ mol/ μ g Prot. \pm 26,79 y machos Cu 380,83 μ mol/ μ g Prot. \pm 79,51 vs. Ctrl 99,99 μ mol/ μ g Prot. \pm 31,96) (figura 20C) y un aumento significativo de la actividad enzimática de SOD ($p < 0,001$; hembras Cu 0,021 U/ μ g Prot. \pm 0,001 vs. Ctrl 0,006 U/ μ g Prot. \pm 0,001 y

machos Cu $0,018 \text{ U}/\mu\text{g Prot} \pm 0,003$ vs. Ctrl $0,005 \text{ U}/\mu\text{g Prot} \pm 0,001$) (figura 20D). Es interesante notar, que todos estos aumentos fueron significativamente mayores en hembras respecto de machos. También pudimos notar que el tratamiento con NAC fue capaz de atenuar estos efectos, aunque no de forma completa (NOx: hembras Cu+NAC $1,71 \mu\text{M}/\mu\text{g Prot} \pm 0,34$ y machos Cu+NAC $1,77 \mu\text{M}/\mu\text{g Prot} \pm 0,23$; TBARS: hembras Cu+NAC $235 \mu\text{mol}/\mu\text{g Prot.} \pm 24,66$ y machos Cu+NAC $203 \mu\text{mol}/\mu\text{g Prot.} \pm 43,33$; SOD: hembras Cu+NAC $0,013 \text{ U}/\mu\text{g Prot} \pm 0,005$ y machos Cu+NAC $0,01 \text{ U}/\mu\text{g Prot} \pm 0,003$). Cabe destacar que los niveles de TBARS (hembras Cu+IGF-1 $291,25 \mu\text{mol}/\mu\text{g Prot} \pm 24,05$ y machos Cu+IGF-1 $290,37 \mu\text{mol}/\mu\text{g Prot} \pm 24,49$); actividad de SOD (hembras Cu+IGF-1 $0,01 \text{ U}/\mu\text{g Prot} \pm 0,0004$ y machos Cu+IGF-1 $0,0083 \text{ U}/\mu\text{g Prot} \pm 0,0007$) y TNF- α (hembras Cu+IGF-1 $116,95 \text{ UA} \pm 1,73$ y machos Cu+IGF-1 $15,5 \text{ UA} \pm 1,40$) fueron significativamente menores ($p < 0,05$) luego del tratamiento con Cu+RAD-IGF-1 respecto del tratamiento Cu+NAC. Esto último nos hace pensar que el tratamiento con IGF-1 podría ser más efectivo para combatir el estrés oxidativo producido por el Cu.

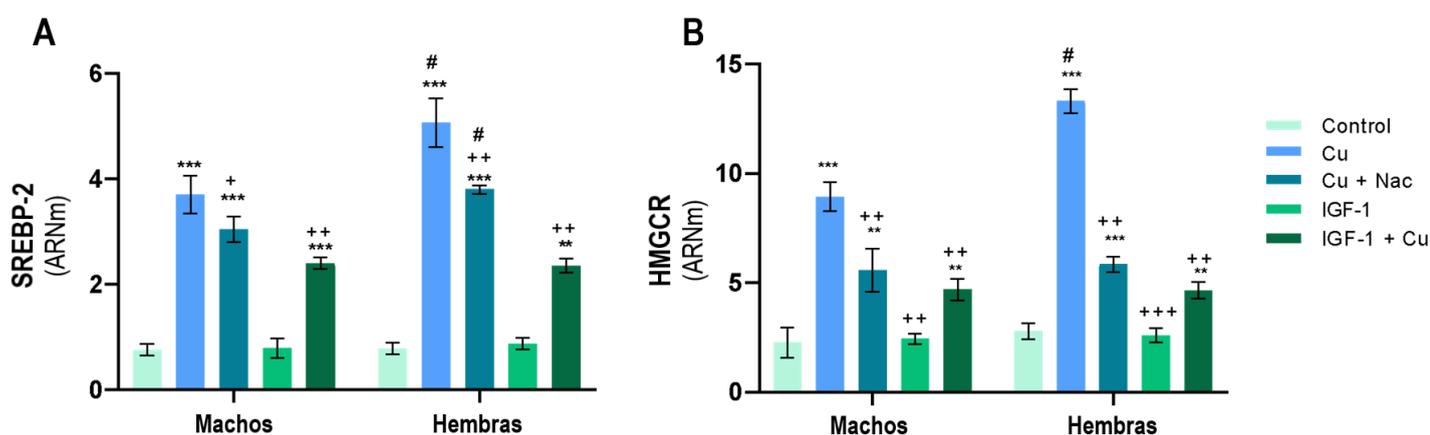


Figura 21: Efecto del tratamiento con Cu sobre las proteínas relacionadas con la síntesis de colesterol en ADCH y ADCM de Ratas Sprague-Dawley. (A) niveles de ARNm de SREBP-2 (B) niveles de ARNm de HMGCR. Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías seguido de post test de Bonferroni y se expresan media \pm DE, *** $p < 0,001$ y ** $p < 0,01$ diferencias significativas respecto del control en el mismo sexo, +++ ($p < 0,001$), ++ ($p < 0,01$) y + ($p < 0,05$) diferencias respecto a Cu en el mismo sexo, & ($p < 0,05$) diferencias entre Cu+NAC e IGF-1+Cu en el mismo sexo y # $p < 0,05$ diferencias significativas entre hembras y machos luego del mismo tratamiento.

Finalmente, analizamos el efecto del Cu sobre las proteínas relacionadas con la síntesis del colesterol (figura 21). En estos experimentos pudimos observar que el tratamiento con Cu favoreció de manera significativa la expresión de SREBP-2 (figura 21A) ($p < 0,01$; hembras Cu $4,99 \text{ UA} \pm 0,65$ vs. Ctrl $3,91 \text{ UA} \pm 0,16$ y machos Cu $3,88 \text{ UA} \pm 0,46$ vs. Ctrl. $0,97 \text{ UA} \pm 0,18$) y de HMGCR (figura 21B) ($p < 0,01$; hembras Cu $14,77 \text{ UA} \pm 0,82$ vs. Ctrl $3,98 \text{ UA} \pm 0,17$ y machos Cu $9,68 \text{ UA} \pm 0,56$ vs. Ctrl. $4,07 \text{ UA} \pm 0,28$) respecto del control. Además observamos que el tratamiento con NAC disminuyó de manera

significativa la expresión de ambos (SREBP-2 $p < 0.01$; hembras Cu+NAC $4,86 \text{ UA} \pm 0,34$ vs. Cu $4,99 \text{ UA} \pm 0,65$ y machos Cu+NAC $2,79 \text{ UA} \pm 0,59$ vs. Cu $3,88 \text{ UA} \pm 0,46$ y HMGCR; $p < 0,01$; hembras Cu+NAC $5,21 \text{ UA} \pm 0,35$ vs. Cu $14,77 \text{ UA} \pm 0,82$ y machos Cu+NAC $5,4 \text{ UA} \pm 1,95$ vs. Cu $9,68 \text{ UA} \pm 0,56$), aunque no de manera completa, observándose aumentos significativos respecto al control (SREBP-2 $p < 0,05$; hembras Cu $4,86 \text{ UA} \pm 0,34$ vs. Ctrl $3,91 \text{ UA} \pm 0,16$ y machos Cu $3,89 \text{ UA} \pm \text{Ctrl. } 0,97 \text{ UA} \pm 0,18$ y HMGCR; $p < 0,05$; hembras Cu vs. Ctrl $3,98 \text{ UA} \pm 0,17$ y machos Cu vs. Ctrl. $4,07 \text{ UA} \pm 0,28$). Por otro lado, nuestros resultados muestran que el tratamiento con RAd-IGF-1+Cu previno de manera más marcada ($p < 0,05$) los niveles de los mensajeros de HMGCR (hembras Cu+IGF-1 $4,89 \text{ UA} \pm 0,32$ y machos Cu+IGF-1 $4,44 \text{ UA} \pm 0,44$) y de SREBP-2 (hembras Cu+IGF-1 $2,05 \text{ UA} \pm 0,12$ y machos Cu+IGF-1 $2,11 \text{ UA} \pm 0,23$) en comparación con el tratamiento Cu + NAC solo en ADCH.

Luego de analizar los efectos del Cu sobre los astrocitos, de observar un aumento del colesterol y APP en las balsas lipídicas de neuronas expuestas a medio condicionado (ver [Figura 18](#)), y sabiendo que las VE son clave en la comunicación entre células (ver [sección 4.1.3](#)), decidimos investigar los efectos de las posibles ADEV luego de los tratamientos sobre los cultivos neuronales (Véase [sección 3.4.5.1](#)). Cabe aclarar que el término “posibles” hace referencia a que aún estamos corroborando, según las recomendaciones internacionales (Téhry et al. 2018), que lo que creemos son VE realmente lo sean, aunque de ahora en más serán nombradas como VE.

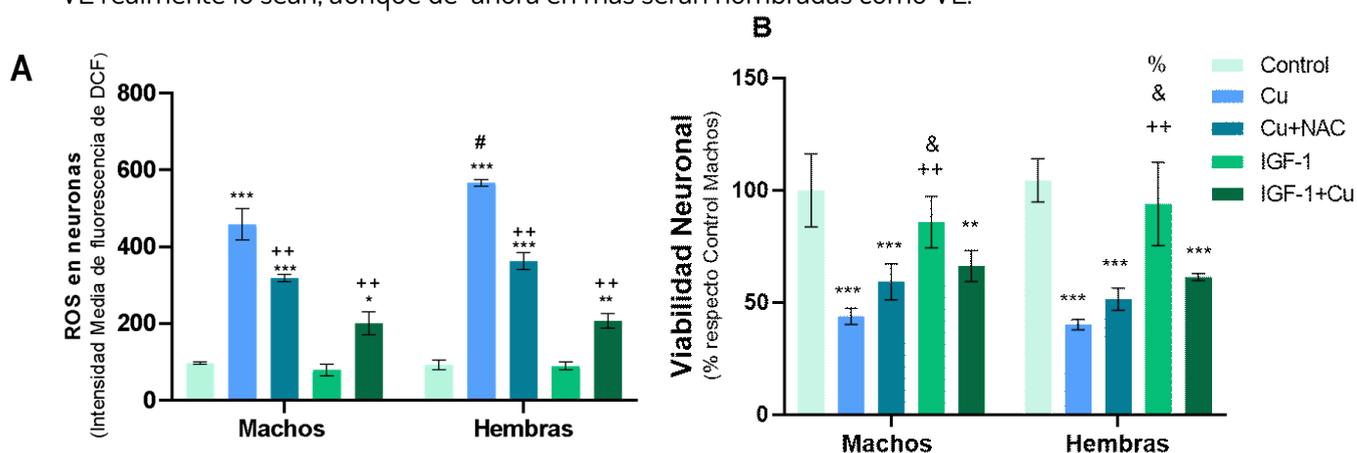


Figura 22: Efecto del tratamiento de VE de medio de cultivo de astrocitos sobre las neuronas. (A) Producción de ROS neuronal y (B) Viabilidad neuronal luego del tratamiento con las VE provenientes de astrocitos. Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías seguido de post test de Bonferroni y se expresan media \pm DE, *** ($p < 0,001$), ** ($p < 0,01$) y * ($p < 0,05$) diferencias significativas respecto del control con el mismo sexo, ++ ($p < 0,01$) y + ($p < 0,05$) diferencias significativas respecto del Cu en el mismo sexo, & ($p < 0,05$) diferencias significativas entre Cu+NAC e IGF-1+Cu en el mismo sexo y # ($p < 0,05$) diferencias significativas entre hembras y machos con el mismo tratamiento.

Nuestros resultados muestran una mayor producción de ROS en las neuronas que fueron tratadas con las VE que provenían del tratamiento con Cu ($p < 0,01$; hembras Cu $556,88 \text{ urf} \pm 34,55$ y machos Cu $435,76 \text{ urf} \pm 122,4$) respecto a sus controles (hembras Ctrl $111,43 \text{ urf} \pm 18,66$ y machos Ctrl $108,66 \text{ urf} \pm 33,56$, $p < 0,05$), siendo significativamente mayor en hembras respecto de machos ([Figura 22A](#)). Además, pudimos notar que la generación de ROS disminuye en comparación al Cu cuando las neuronas eran expuestas a las VE provenientes de los astrocitos tratados con Cu+NAC ($p < 0,01$; hembras $364,22 \text{ urf} \pm 43,21$ y machos $332,21 \text{ urf} \pm 28,65$) o IGF-1 + Cu (hembras $201,11 \text{ urf} \pm 32,55$ y machos $197,76 \text{ urf} \pm 22,12$), siendo significativamente menor ($p < 0,05$) en este último. Esto demostraría que IGF-1 sería más efectivo para contrarrestar la formación de ROS que NAC. En cuanto a la viabilidad celular ([Figura 22B](#)), analizamos la muerte por apoptosis marcando las células con Anexina-V (ver [sección 3.5.1.3](#)). Al respecto, observamos que la viabilidad neuronal se ve significativamente reducida ($p < 0,01$) cuando se trata a estos cultivos con las VE provenientes de los astrocitos tratados con Cu (hembras $0,67 \text{ urf} \pm 0,06$ y machos $0,74 \text{ urf} \pm 0,09$) respecto a las VE provenientes de los controles (hembras $1,68 \text{ urf} \pm 0,38$ y machos $1,54 \text{ urf} \pm 0,77$). Al exponer a las neuronas con las VE provenientes de los tratamientos con Cu+NAC (hembras $0,88 \text{ urf} \pm 0,16$ y machos $0,93 \text{ urf} \pm 0,32$) e IGF-1+Cu (hembras $0,98 \text{ urf} \pm 0,06$ y machos $1,06 \text{ urf} \pm 0,25$) observamos que la muerte celular se redujo significativamente ($p < 0,05$) respecto de los cultivos que se trataron con las VE de astrocitos tratados con Cu. Aún cuando el tratamiento Cu+NAC e IGF-1 + Cu mantuvo una mayor viabilidad que el tratamiento con Cu, se observó una muerte celular por apoptosis significativa ($p < 0,05$) respecto al control. Únicamente se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la viabilidad neuronal entre los cultivos neuronales de machos y hembras cuando se los trató con Cu, el resto de tratamientos no arrojaron variaciones sustanciales.

4.1.5.2 Astrocitos de Ratones transgénicos APP/PS1

Es importante señalar que, debido a limitaciones en la disponibilidad de crías de ratones APP/PS1, no pudimos diferenciar entre cultivos de machos y hembras en nuestros experimentos. No obstante, sería de gran interés considerar esta distinción en investigaciones futuras, ya que la variabilidad de sexo puede ofrecer perspectivas valiosas sobre los efectos del Cu en este modelo de EA. Al igual que con los cultivos de astrocitos de ratas, expusimos los cultivos de estas células provenientes de ratones APP/PS1 o WT a diferentes concentraciones de Cu durante 24 horas (ver

sección 3.4.1). La concentración de Cu subletal fue de 200 μM y se utilizó en los experimentos posteriores (Figura 23)

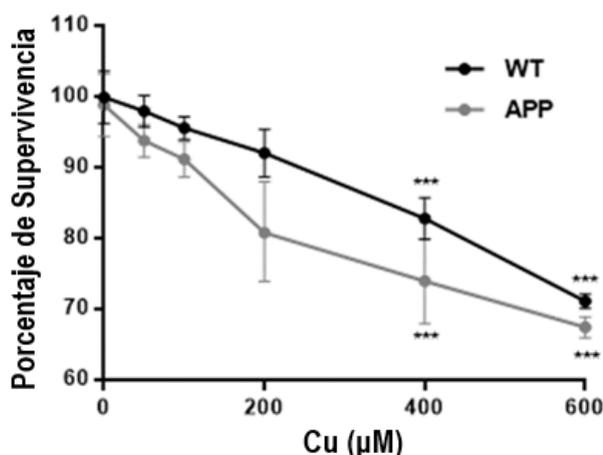


Figura 23: Viabilidad celular. Viabilidad celular determinada mediante el ensayo de MTT. Los resultados se analizaron mediante ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni y expresaron el porcentaje medio \pm DE respecto del control (n= 8 para cada concentración utilizada). Las diferencias estadísticas respecto el control se indican como *** $p < 0,01$.

Inicialmente analizamos los efectos del Cu (200 μM)/24 horas sobre la generación de ROS en el modelo murino de EA y WT. Los datos revelaron que los astrocitos provenientes de los ratones transgénicos APP/PS1 generaron más ROS que los WT después del tratamiento con Cu ($p < 0,01$; APP/PS1 286,33 urf \pm 22,45 vs. WT 201,11 urf \pm 31,21) (figura 24).

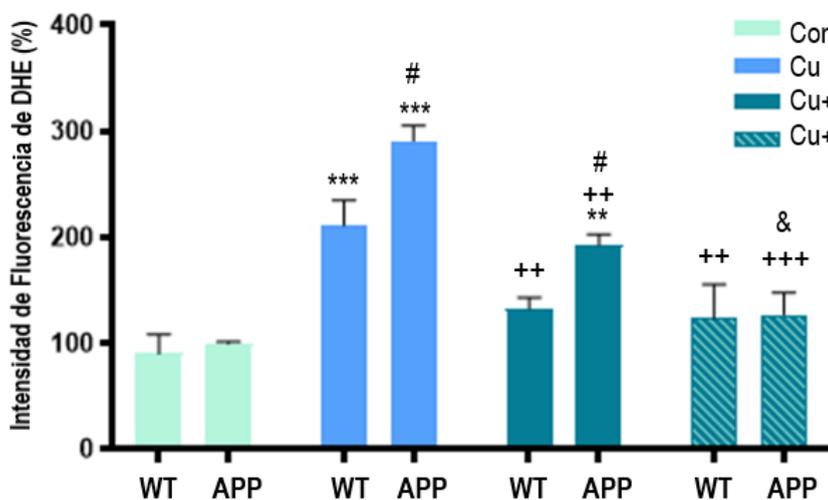


Figura 24: Efecto del tratamiento con Cu sobre la producción de ROS en astrocitos de Ratones WT y APP/PS1. Niveles de ROS (n=8). Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías seguido de post test de Bonferroni y se expresan media \pm DE, *** $p < 0,001$ y ** $p < 0,01$ diferencias significativas respecto de los controles en misma cepa de ratón, +++ ($p < 0,001$) y ++ ($p < 0,01$) diferencias respecto al Cu en la misma cepa de ratón, & ($p < 0,05$) diferencia significativa entre Cu+GSH y Cu+MitoQ en la misma cepa de ratón y # diferencias significativas entre distintas cepas de ratones con el mismo tratamiento (APP/PS1 vs WT).

A su vez, observamos que al tratar los astrocitos con Cu+GSH disminuyó significativamente la formación de ROS con respecto a los tratamientos con Cu solo ($p < 0,01$; APP/PS1 Cu+GSH 198,76 urf \pm 17,76 vs Cu 286,33 urf \pm 22,45 y WT Cu+GSH 128,68 urf \pm 18,13 vs. 201,11 urf \pm 31,21). Nuevamente, observamos una mayor producción de ROS en los APP/PS1 respecto de los WT aún con el agregado

del antioxidante GSH. Para poder analizar la contribución de la formación de ROS mitocondrial se incubaron las células con el antioxidante mitocondrial mitoQ. Es interesante notar que luego de este tratamiento no observamos diferencias significativas en la producción de ROS con respecto al control (APP/PS1 CuMitoQ 107,55 urf ± 33,22 vs. Ctrl 99,76 urf ± 13,23 y WT CuMitoQ 103,67 urf ± 47,76 vs. 97,87 urf ± 36,87) ni entre APP/PS1 y WT. Esto significa que los antioxidantes fueron efectivos ya que disminuyeron significativamente (Cu+GSH $p < 0,01$ y Cu+MitoQ $p < 0,01$) respecto del Cu. Podemos concluir entonces, que la producción de ROS que observamos en estos cultivos es producida principalmente por la mitocondria.

Teniendo en cuenta que existe una producción de ROS aumentada en los astrocitos que fueron tratados con Cu y que dicha producción de especies reactivas puede tener relación con estrés de RE, decidimos evaluar una posible activación de las distintas vías de señalización UPR ligadas a dicho estrés. Para ello, evaluamos por la técnica de Western Blot los niveles de las proteínas eIF2- α , BIP/GRP78 y CHOP, las cuales se sabe activan la vía UPR (Ver vía en la

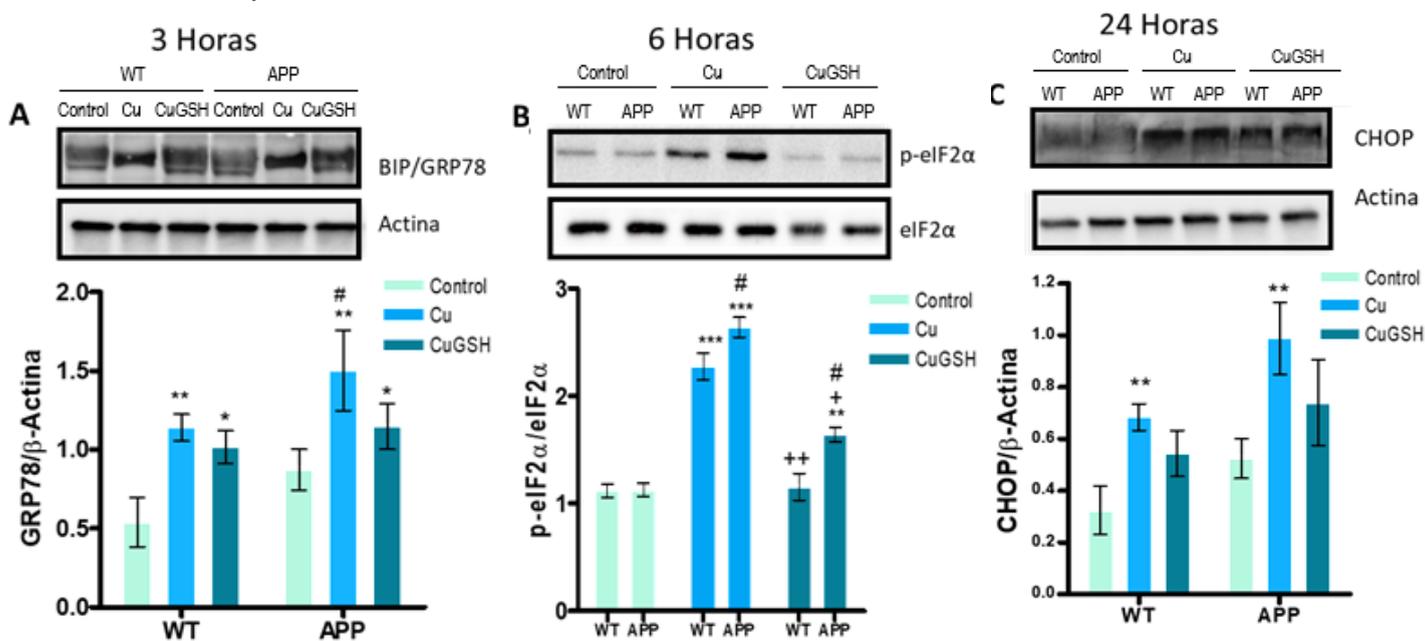


Figura 25: Efecto del tratamiento con Cu sobre el estrés de RE en astrocitos de Ratones WT y APP/PS1. (A) Niveles de la proteína BIP/GRP78 (B) Niveles de la proteína eIF2- α y (C) Niveles de la proteína CHOP. Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías seguido de post test de Bonferroni y expresan media \pm DE, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$ diferencias significativas respecto del control en la misma cepa de ratón, ++ ($p < 0,01$) y + ($p < 0,05$) diferencias respecto al Cu en la misma cepa de ratón y # ($p < 0,05$) diferencias significativas APP/PS1 vs WT con el mismo tratamiento. Cada banda presente en el western blot mantiene el mismo orden secuencial que las barras del histograma.

En relación con esto, observamos un aumento significativo ($p < 0,01$; APP/PS1 $1,47 \text{ UA} \pm 0,29$ y $p < 0,01$; WT $1,15 \text{ UA} \pm 0,07$) de BIP/GRP78, a las 3 horas de tratamiento con Cu respecto al control (APP/PS1 Ctrl. $0,95 \text{ UA} \pm 0,24$ y WT Ctrl. $0,62 \text{ UA} \pm 0,26$). Cabe destacar que hubo una disminución de BIP/GRP78, respecto a los tratamientos con Cu, cuando incubamos a los astrocitos con Cu+GSH ($p < 0,05$; APP/PS1 $1,14 \text{ UA} \pm 0,16$ y WT $0,99 \text{ UA} \pm 0,105$).

Por su parte, también evaluamos la fosforilación de eIF2- α observando un aumento significativo ($p < 0,001$) de la misma en los astrocitos que fueron incubados con Cu (APP/PS1 $2,64 \text{ UA} \pm 0,092$ y WT Cu $2,27 \text{ UA} \pm 0,122$) respecto del control (APP/PS1 Ctrl. $1,12 \text{ UA} \pm 0,06$ y WT $1,11 \text{ UA} \pm 0,06$). Cuando los astrocitos se incubaron con Cu+GSH se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) de esta fosforilación sólo en los cultivos provenientes de APP/PS1 respecto de los WT ($p < 0,05$; APP/PS1 $1,64 \text{ UA} \pm 0,07$ vs. WT $1,15 \text{ UA} \pm 0,124$).

Finalmente, medimos los niveles de la proteína CHOP y observamos un aumento significativo ($p < 0,01$) en los astrocitos tratados con Cu (APP/PS1 $1,64 \text{ UA} \pm 0,23$ y WT Cu $1,14 \text{ UA} \pm 0,08$) respecto al control (APP/PS1 $0,87 \text{ UA} \pm 0,13$ y WT Cu $0,54 \text{ UA} \pm 0,15$), siendo esta diferencia mucho más marcada ($p < 0,05$) en astrocitos APP/PS1 respecto a los astrocitos WT.

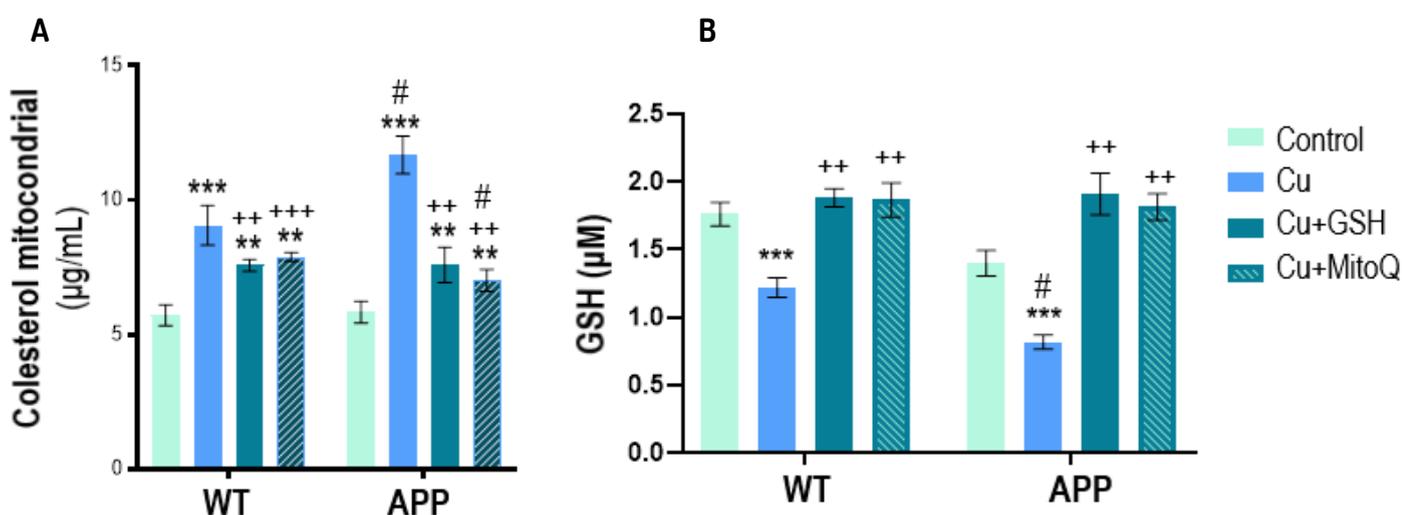


Figura 26: Niveles de colesterol y GSH mitocondrial. Niveles de colesterol (A) y GSH (B) mitocondriales. Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías seguido de post test de Bonferroni y se expresan media \pm DE, *** $p < 0,001$ y ** $p < 0,01$ diferencias significativas respecto del control en la misma cepa de ratón; +++ ($p < 0,001$) y ++ ($p < 0,01$) diferencias respecto al Cu en la misma cepa de ratón, y # ($p < 0,05$) diferencias significativas APP/PS1 vs WT con el mismo tratamiento.

Además, se analizaron los niveles de colesterol mitocondrial observándose un aumento significativo del mismo tras el tratamiento con Cu (APP/PS1 Cu $12,33 \pm 2,28$ vs. Ctrl $6,44 \mu\text{g/mL} \pm 1,34$ y WT $9,85 \mu\text{g/mL} \pm 2,21$ vs. Ctrl $5,22 \mu\text{g/mL} \pm 1,28$) (figura 26A). Este aumento fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en APP/PS1 respecto WT.

Por otro lado, vimos una reducción significativa en los niveles de mGSH luego del tratamiento con Cu (APP/PS1 Cu $0,69 \mu\text{M} \pm 0,12$ vs. Ctrl $1,47 \mu\text{M} \pm 0,33$ y WT Cu $1,18 \mu\text{M} \pm 0,56$ vs. Ctrl $1,72 \mu\text{M} \pm 0,43$) (figura 26B). Es relevante señalar que estos descubrimientos en la reducción de mGSH son considerablemente más marcados en los cultivos de ratones APP/PS1 (Cu $0,69 \mu\text{M} \pm 0,12$) en comparación con los ratones WT (Cu $1,18 \mu\text{M} \pm 0,56$). En tanto los niveles de colesterol mitocondrial disminuyeron significativamente cuando se trató a los cultivos con GSH ($p < 0,0$; Cu+GSH APP/PS1 $7,66 \mu\text{g/mL} \pm 1,33$ vs. Cu $12,77 \mu\text{g/mL} \pm 1,65$ y $p < 0,01$ WT Cu+GSH $7,32 \mu\text{g/mL} \pm 1,85$ vs. Cu $9,03 \mu\text{g/mL} \pm 1,17$) dirigidos a la mitocondria observándose una mayor recuperación de los niveles de colesterol en el tratamiento con MitoQ en astrocitos APP/PS1 ($5,76 \mu\text{g/mL} \pm 1,07$) respecto de los astrocitos WT ($8,73 \mu\text{g/mL} \pm 1,78$).

Para corroborar si nuestro tratamiento aumentaba los niveles de colesterol de manera directa, analizamos la expresión (figura 27) y los niveles proteicos (figura 28) de algunas de las proteínas relacionadas con la regulación de la síntesis y transporte del mismo. Observamos que el Cu favoreció el aumento de la expresión de *Srebf-2* (APP/PS1 $6,11 \text{ UA} \pm 1,22$ y WT $3,56 \text{ UA} \pm 1,26$), *Hmgcr* (APP/PS1 $6,23 \text{ UA} \pm 1,94$ y WT $5,86 \text{ UA} \pm 1,03$) y *Ldlr* (APP/PS1 $5,66 \text{ UA} \pm 0,76$ y WT $4,43 \text{ UA} \pm 0,88$) respecto al control *Srebf-2* (APP/PS1 $0,51 \text{ UA} \pm 0,12$ y WT $0,56 \text{ UA} \pm 0,13$), *Hmgcr* (APP/PS1 $1,14 \text{ UA} \pm 0,24$ y WT $1,10 \text{ UA} \pm 0,23$) y *Ldlr* (APP/PS1 $0,67 \text{ UA} \pm 0,47$ y WT $1,14 \text{ UA} \pm 0,12$). De la misma manera promovió un aumento de esas proteínas, siendo significativamente mayores en los cultivos de APP/PS1 (HMGR: $9,13 \text{ UA} \pm 2,22$; LDLR: $7,75 \text{ UA} \pm 1,02$; ABCA-1: $3,24 \text{ UA} \pm 0,58$) respecto de los WT (HMGR: $7,01 \text{ UA} \pm 1,61$; LDLR: $5,86 \text{ UA} \pm 1,33$; ABCA-1: $2,54 \text{ UA} \pm 0,89$) (figura 28).

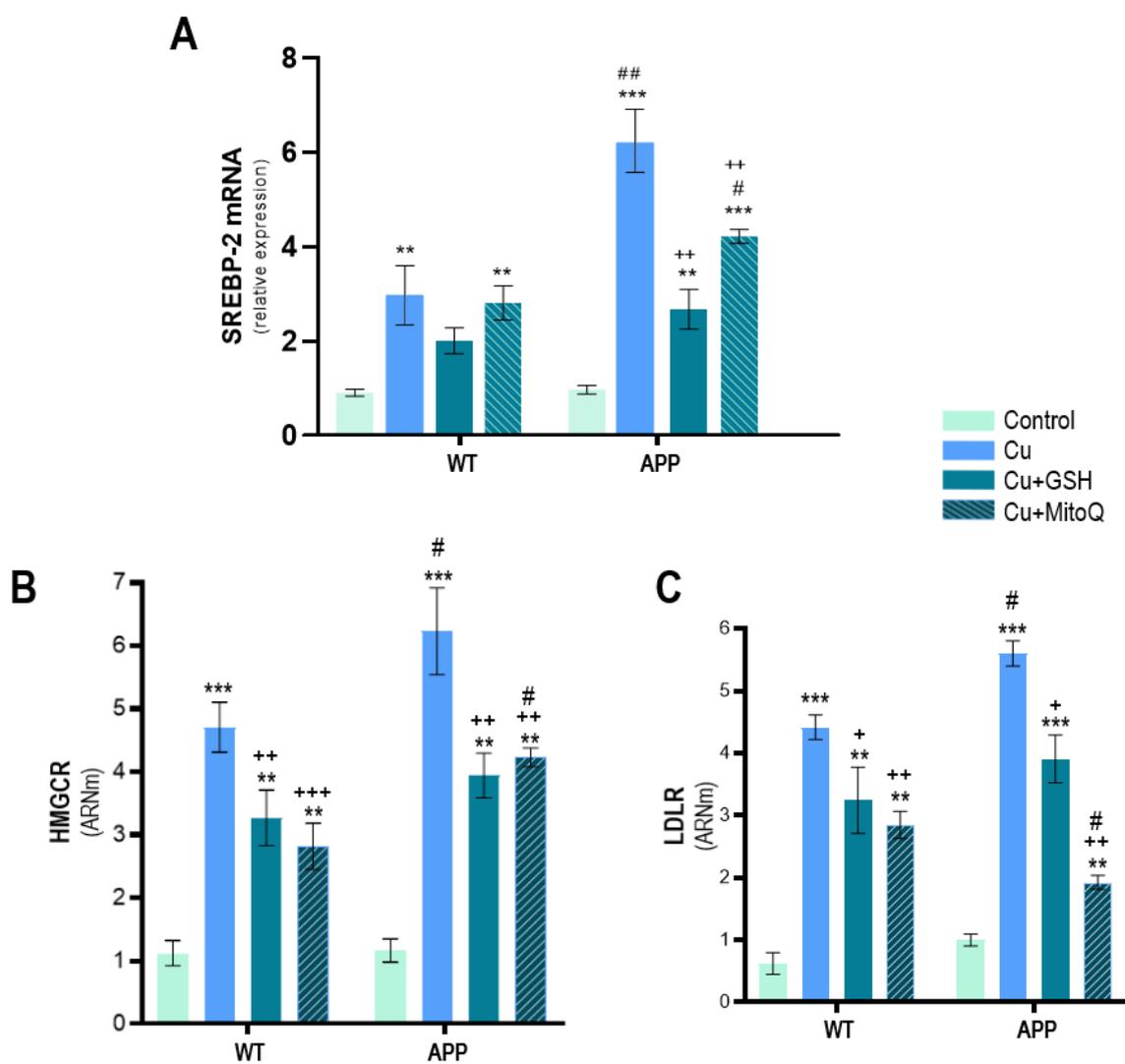


Figura 27: Expresión de *Srebp-2*, *Hmgcr* y *Ldlr*. Se midieron los niveles de ARNm de (A) SREBP-2, (B) HMGCR y (C) LDLR. Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías seguido de post test de Bonferroni y se expresan media \pm DE, *** $p < 0,001$ y ** ($p < 0,01$) diferencias significativas respecto del control en la misma cepa de ratón, ++ ($p < 0,01$) y + ($p < 0,05$) diferencias respecto al Cu en la misma cepa de ratón, y # ($p < 0,05$) $\dot{\text{o}}$ ## $p < 0,01$) diferencias significativas APP/PS1 vs WT con el mismo tratamiento.

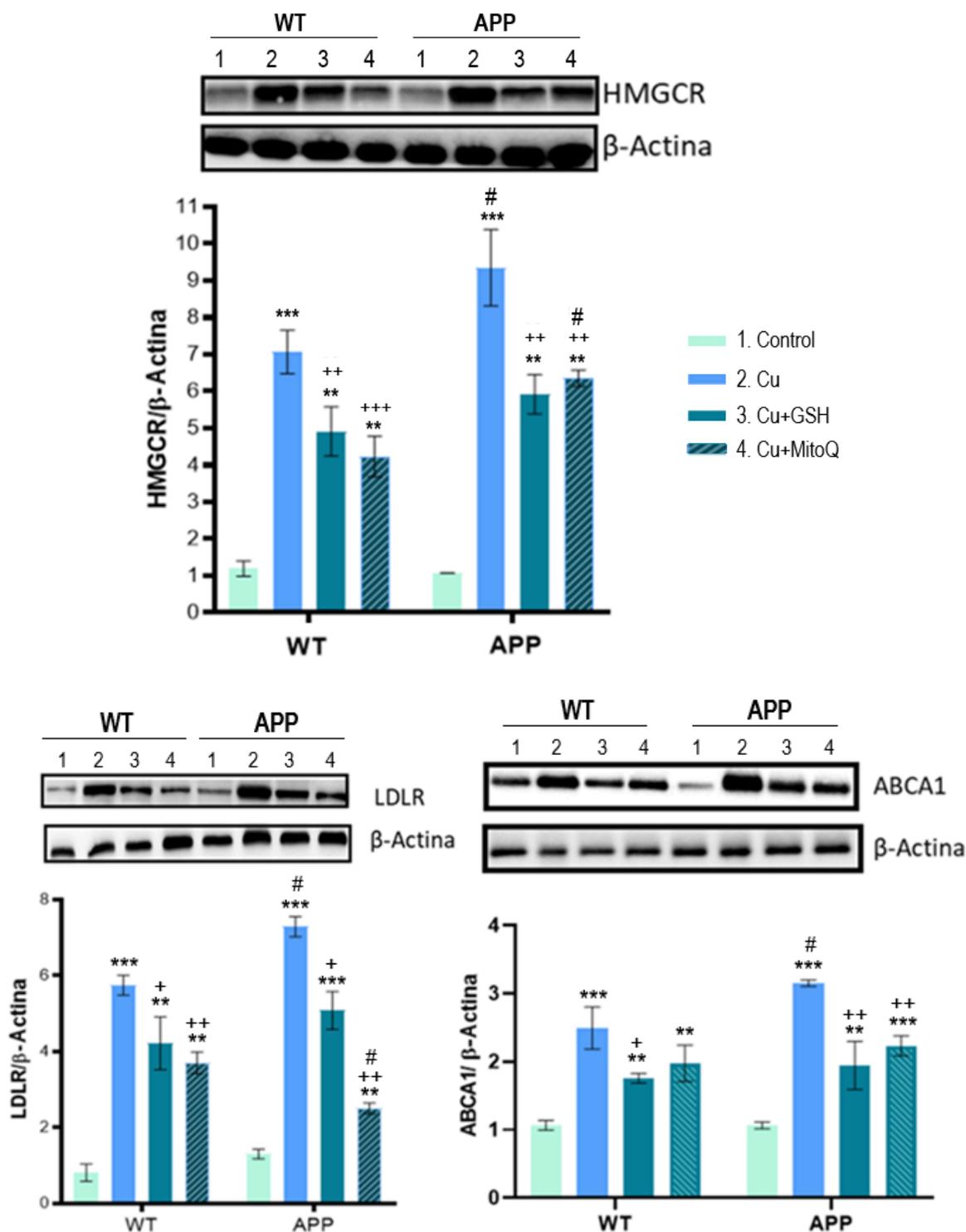


Figura 28: Niveles proteína de HMGCR, LDLR y ABCA-1. (A) HMGCR, (B) LDLR y (C) ABCA-1. Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías seguido de post test de Bonferroni y se expresan media \pm DE, *** $p < 0,001$ y ** $p < 0,01$ diferencias significativas respecto del control, + ($p < 0,05$), ++ ($p < 0,01$) y +++ ($p < 0,001$) diferencias respecto al Cu en misma cepa de ratón y # diferencias significativas APP/PS1 vs WT con el mismo tratamiento. Cada banda presente en el western blot mantiene el mismo orden secuencial que las barras del histograma.

Finalmente, obtuvimos imágenes del colesterol celular por la sonda fluorescente Filipina III y SYTOX Green (figura 29A) para marcar núcleos. En las imágenes confocales se observó un aumento significativo ($p < 0,01$) del colesterol en los tratamientos con Cu tanto en APP/PS1 como en los ratones WT, siendo mayor ($p < 0,05$) en los ratones APP/PS1. Cuando tratamos con Cu+GSH el nivel de colesterol se vió disminuído respecto al Cu ($p < 0,05$) pero no alcanzó a restaurar los niveles de colesterol de sus respectivos controles.

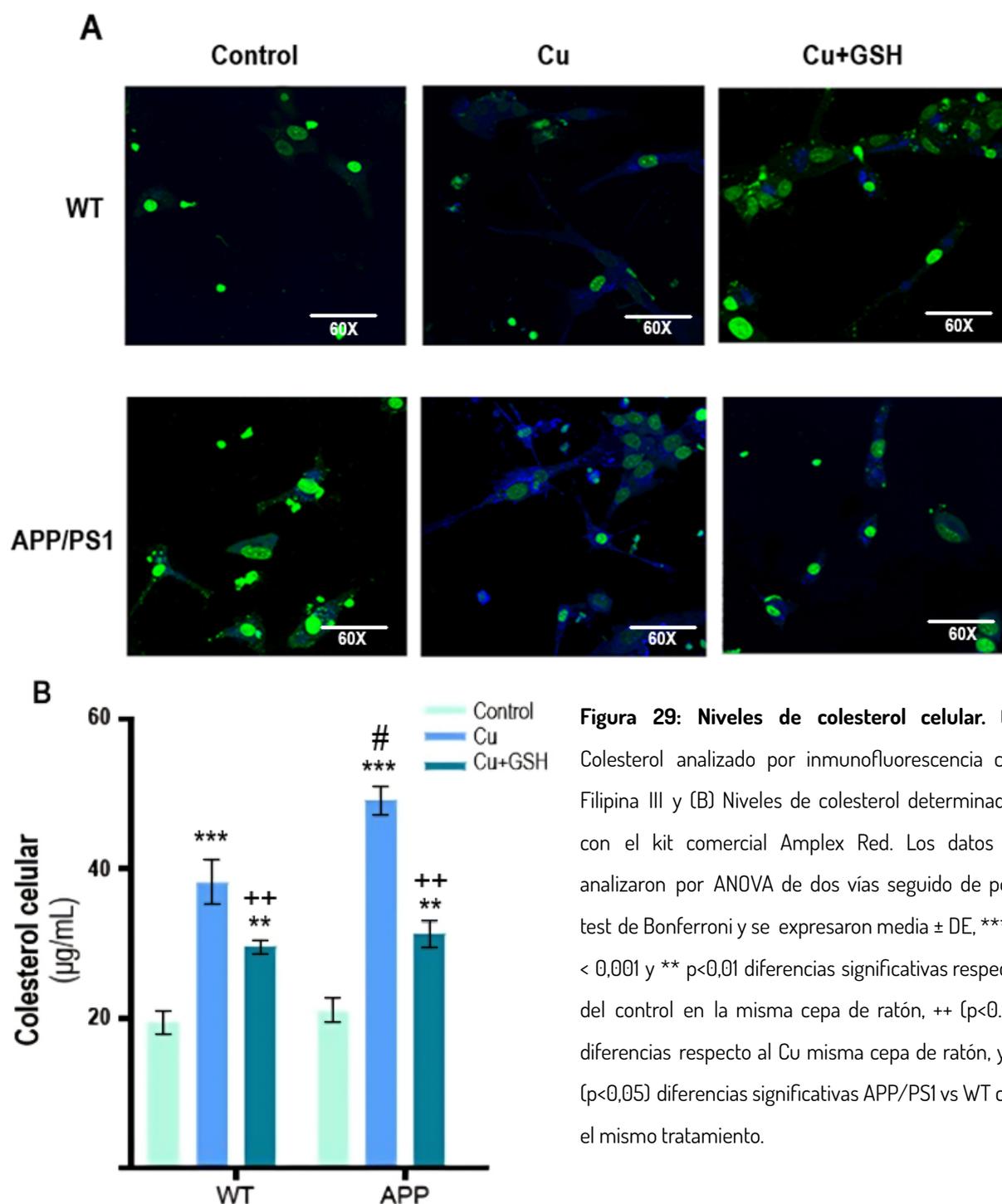


Figura 29: Niveles de colesterol celular. (A) Colesterol analizado por inmunofluorescencia con Filipina III y (B) Niveles de colesterol determinados con el kit comercial Amplex Red. Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías seguido de post test de Bonferroni y se expresaron media \pm DE, *** $p < 0,001$ y ** $p < 0,01$ diferencias significativas respecto del control en la misma cepa de ratón, ++ ($p < 0,01$) diferencias respecto al Cu misma cepa de ratón, y # ($p < 0,05$) diferencias significativas APP/PS1 vs WT con el mismo tratamiento.

Para confirmar esto, analizamos los niveles de colesterol celular total utilizando el kit AMPLEX RED® ([figura 29B](#)). Observamos que el tratamiento con Cu aumentó de manera significativa ($p < 0,01$) los niveles de colesterol celular (APP/PS1 Cu $56,72 \mu\text{g/mL} \pm 8,65$ vs. Ctrl $21,33 \mu\text{g/mL} \pm 11,02$ y WT Cu $38,89 \mu\text{g/mL} \pm 18,31$ vs. Ctrl $19,83 \mu\text{g/mL} \pm 9,97$) y que dicho aumento fue, a su vez, significativamente mayor ($p < 0,05$) en los astrocitos provenientes de ratones APP/PS1 respecto a los astrocitos provenientes de ratones WT. A su vez, observamos que el tratamiento de Cu combinado con GSH disminuyó significativamente ($p < 0,05$) los niveles de colesterol celular pero no alcanzó a restablecer los niveles de colesterol de los controles (APP/PS1 Cu+GSH $31,76 \mu\text{g/mL} \pm 7,66$ y WT Cu+GSH $27,85 \mu\text{g/mL} \pm 5,54$). No se observaron diferencias significativas entre WT y APP en los tratamientos Cu+GSH.

4.2.MICROGLIA

En este capítulo se expondrán los resultados asociados al estudio de microglia en cultivos ya establecidos. A pesar de haberse introducido el tema en la introducción general, a continuación se proporcionan elementos esenciales para comprender en detalle los resultados presentados.

4.2.1 Microglia en la homeostasis cerebral

Las células de la microglía son indispensables para el desarrollo normal del cerebro ya que liberan factores tróficos que apoyan la formación de circuitos neuronales y promueven su supervivencia (Block et al. 2007). La mayor parte de la evidencia sugiere que la absorción y limpieza de los desechos son funciones clave de la microglía para mantener la homeostasis cerebral, así como para disminuir la inflamación y promover la reparación tisular (Stence et al. 2001). El receptor de activación microglial expresado en células mieloides 2 (TREM2) es necesario para la fagocitosis de una variedad de sustratos por parte de la microglía, incluidas las neuronas apoptóticas, sinapsis aberrantes (Paolicelli et al. 2011) y otros componentes como lipoproteínas y A β (Takahashi et al. 2005; N'Diaye et al. 2009; Kleinberger et al. 2014; Atagi et al. 2015; Yeh et al. 2016). La transición de microglía homeostática a microglía reactiva depende, en parte, de la expresión de este receptor y de la respuesta desencadenada por el mismo (Keren-Shaul et al. 2017). Las células dañadas y las sinapsis no deseadas exponen a la fosfatidilserina (PS) en su superficie como una señal de "cómeme". De esta manera la PS se une a los receptores fagocíticos que ayudan a acoplar la carga extracelular en la membrana del fagocito (paso 1: reconocimiento [figura 30](#)) (Sierra et al. 2013). El reconocimiento específico de macromoléculas y receptores inicia el reordenamiento del citoesqueleto asociado con la actina que conduce a la formación de copas fagocíticas y el engullimiento (paso 2: engullimiento [figura 30](#)). El material internalizado llega a un fagosoma que madura y se fusiona con endosomas tempranos, endosomas tardíos y lisosomas, formando un fagolisosoma (Sierra et al. 2013). Los lisosomas contienen baterías de hidrolasas ácidas y catepsinas que aseguran la degradación (paso 3: digestión [figura 30](#)). A esto le sigue la activación de factores de

transcripción que mejoran la eliminación de lípidos, revierten el transporte de colesterol y liberan mediadores antiinflamatorios (paso 4: respuesta [figura 30](#)) (Doran et al. 2020). Los endosomas tempranos están involucrados en la progresión de la endocitosis mediada por clatrina que emplea receptores de superficie que se unen a la carga extracelular concentrada en las membranas plasmáticas por fosas recubiertas de clatrina (Solé-Domènech et al. ;2016; Mettlen et al. 2018). El material del endosoma temprano se recicla de nuevo en la membrana plasmática o se fusiona con endosomas/lisosomas tardíos. Desde estos últimos compartimentos, el material puede transportarse a la red *trans*-Golgi (TGN) para su posterior clasificación.

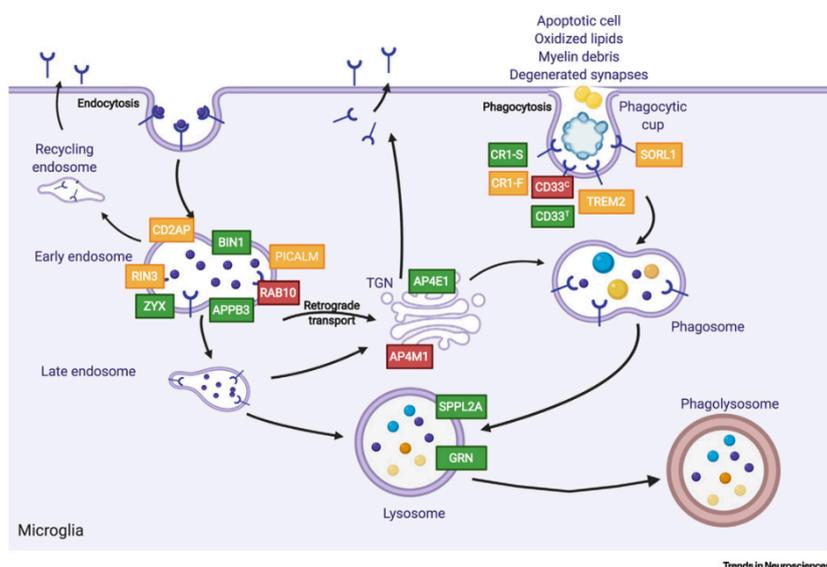


Figura 30: Proceso complejo de reconocimiento, absorción, digestión y respuesta microglial. En la figura se muestran los pasos de reconocimiento de señales de “comeme” seguido de engullimiento y formación de fagolisosoma. (Adaptada de Podleśny-Drabiniok et al. 2020)

4.2.2 Microglia reactiva y EA

En la EA algunos procesos y ramificaciones microgliales se vuelven estáticos y muestran una asociación estable con las placas β -amiloides durante días o semanas, estando TREM2 y la fosfotirosina concentrados en los procesos adyacentes a las mismas (Condello et al. 2015; Yuan et al. 2016).

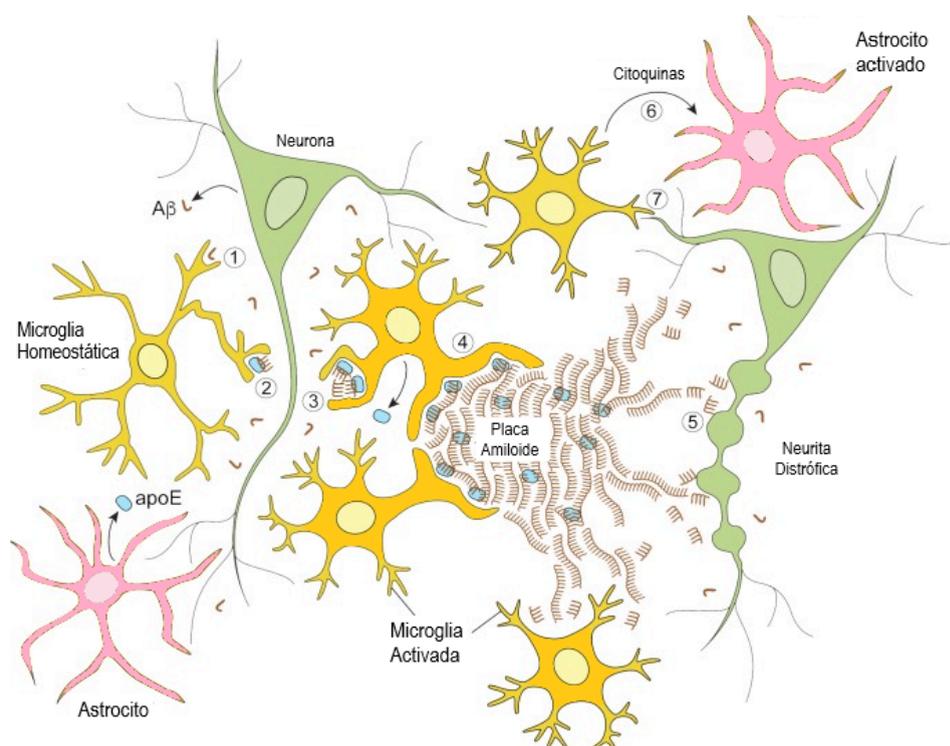


Figura 31: Representación de las actividades celulares microgliales relacionadas con la patología β -amiloide. El lado izquierdo ilustra las actividades microgliales protectoras que limitan la progresión de la enfermedad. La microglía puede eliminar los péptidos $A\beta$ a través de macropinocitosis de $A\beta$ soluble, captación de $A\beta$ asociado a lipoproteínas o fagocitosis de agregados de $A\beta$ fibrilares. La microglía también ayuda a acorralar depósitos más grandes de $A\beta$ en las placas, lo que minimiza el daño al neuropilo adyacente. El lado derecho ilustra estados de enfermedad cuando los mecanismos de contención microgliales son defectuosos o superados. Las fibrillas de $A\beta$ en las afueras de la placa actúan como sustrato para la fibrilación adicional de $A\beta$ y como reservorio de especies de $A\beta$ tóxicas que inducen distrofia neurítica. La microglía puede secretar factores que activan los astrocitos y participan en la pérdida de sinapsis dependiente de amiloide. (Adaptada de Hansen et al. 2018).

Cierta evidencia sugiere que la microglía forma una barrera protectora alrededor de los depósitos $A\beta$ [Figura 31], compactando las fibrillas amiloides en una forma potencialmente menos tóxica, previniendo la acumulación de $A\beta$ nuevo en las placas existentes y reduciendo la distrofia axonal en el neuropilo cercano (Condello et al. 2015). Estas funciones protectoras de "acorralamiento" ocurren más fácilmente con las placas pequeñas en etapa temprana y parecen comprometidas en ratones que carecen de una o ambas copias del gen *Trem2*, así como en tejidos de pacientes con EA portadores de la variante TREM2 R47H (Condello et al. 2015 ; Wang et al. 2016 Yuan et al. 2016). A su vez, se sabe que es probable que exista un halo de $A\beta$ oligomérico soluble (la forma que actualmente se piensa que ejerce los efectos más tóxicos sobre las neuronas) alrededor de las placas

A β (Querol-Vilaseca et al. 2019). Por lo tanto, la compactación de A β protofibrilar en una placa de núcleo denso, que requiere ApoE y es promovida por TREM2 (Bales et al. 1997, 1999; Bien-Ly et al. 2012; Wang et al. 2016; Yuan et al. 2016), podría ser un mecanismo de protección que limita la neurotoxicidad de los depósitos de A β en el cerebro que envejece.

4.2.2.1 El papel de TREM2 y ApoE

La microglía se acumula en las placas seniles de pacientes con EA y en modelos animales de EA (McGeer et al. 1987; Perlmutter et al. 1990; Frautschy et al. 1998). Las lesiones o estímulos inflamatorios inducen a la microglía a transformarse de una forma ramificada a una ameboidea, la cual refleja un estado altamente activado asociado con la fagocitosis y la función proinflamatoria. Recientemente, se ha reconocido el papel de TREM2 en la activación de la respuesta inmunitaria y la neuroinflamación (Haure-Mirande et al. 2022; Yang et al. 2021). TREM2 interactúa preferentemente con los oligómeros formados por las variantes de A β fosforiladas, las cuales de esta manera son captadas y fagocitadas por la microglía (Joshi et al. 2021). Los ligandos extracelulares de TREM2 también incluyen una variedad de fosfolípidos, glicolípidos, lipoproteínas (p. ej. LDL) y células apoptóticas (Atagi et al. 2015; Bailey et al. 2015; Poliani et al. 2015; Wang et al. 2015; Yeh et al. 2016). En particular, TREM2 se une a las apolipoproteínas apoE y a clusterina (CLU), que a su vez están codificadas por genes que poseen variantes cuya presencia aumentaría el riesgo de desarrollar EA (Atagi et al. 2015; Bailey et al. 2015; Yeh et al. 2016). TREM2 se expresa de forma constitutiva en la microglía, pero su expresión aumenta después del inicio de la formación de las placas de amiloide (Jay et al. 2015).

Las Moléculas Asociadas al Daño (DAM) producen altos niveles de ApoE en personas con EA y en modelos murinos de EA (Figura 31), siendo esta producción, en parte, dependiente de TREM2 (Keren-Shaul et al. 2017; Krasemann et al. 2017). En el cerebro ApoE es producida principalmente por los astrocitos y, en ciertas circunstancias como neurodegeneración y/o inflamación, por la microglía; y es lipídada por la proteína transportadora ABCA-1 (Chen et al. 2020a). La apolipoproteína ApoE secretada por las células de la microglía es un componente importante de las placas A β , y también promueve su compactación. En varios estudios se vio que ApoE aumenta la cantidad de oligómeros de A β en distintos grados, que dependen de la isoforma de la siguiente manera: ApoE4 >

ApoE3> ApoE2. A su vez, esto se relaciona con los niveles de eliminación de A β , los cuales en consecuencia también dependen de la isoforma de la siguiente manera: ApoE2> ApoE3> ApoE4 (Najm et al. 2019). En esta misma línea, evidencia previa demuestra que la presencia de ApoE en asociación a las placas A β se redujo notablemente en ratones *Trem2* $-/-$ y en un modelo genético de ablación microglial (Parhizkar et al. 2019).

4.2.2.2 Activación del inflammasoma

El inflammasoma es un complejo multiproteico clave en la respuesta inmune innata y funciona como plataforma de señalización para detectar patrones moleculares asociados con patógenos y asociados con daños tisulares (PAMP y DAMP, respectivamente) (Martinon et al. 2002; Zheng et al. 2020). Clásicamente comprenden un receptor tipo NOD (NLR) que actúa como sensor, como por ejemplo NLRP3 y NLRP1, la proteína adaptadora asociada a la apoptosis que contiene un CARD (ASC, también conocida como PYCARD) y la proteína catalítica caspasa-1 (CASP1) (Zheng et al. 2020).

En particular, se ha informado que la activación del inflammasoma vía el receptor de NLRP3 tiene lugar en dos pasos: primero, el cebado que estimula la expresión de los componentes del inflammasoma y las proformas de citoquinas, y luego, la señal activadora requerida para inducir el ensamblaje del inflammasoma (Zheng et al. 2020). Una vez ensamblado, el complejo funcional activa a CASP1, que regula la maduración de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β e IL-18 (He et al. 2015b; Shi et al. 2015). Además, la caspasa-1 activada también escinde la gasdermina D (GSDMD) y libera su dominio N-terminal, que se transfiere a la membrana celular y forma poros, mediando la liberación de contenidos celulares, incluidas las citoquinas inflamatorias, e induciendo la muerte celular inflamatoria conocida como piroptosis (Krasemann et al. 2017; Deczkowska et al. 2018; Martinon et al. 2002). Estudios anteriores de Zhou y col informaron que el bloqueo de mitofagia/autofagia conduce a la acumulación de mitocondrias dañadas, generadoras de ROS, y esto a su vez activa el inflammasoma NLRP3 (Zhou et al. 2011b).

En la EA, se ha demostrado que la activación del inflammasoma NLRP3 contribuye a la progresión de la patología al disminuir la capacidad fagocítica de la microglía (Heneka et al. 2013; Halle et al. 2008). El inflammasoma NLRP3 es activado no sólo por agregados fibrilares de A β , sino también por oligómeros, por protofibrillas de A β de bajo peso molecular (Friker et al. 2020; Nakanishi

et al. 2018) y por tau monomérico/oligomérico (Ising et al. 2019). Además, el estrés oxidativo generado por A β también puede activar el inflamasoma (Nakanishi et al. 2018).

Se ha encontrado que la alta expresión de los genes de NLRP3 y caspasa-1 conduce a la formación de lesiones de envejecimiento en los cerebros de ratones transgénicos APP/PS1 (Furman et al. 2017). En ratones knockout para NLRP3, se redujo la formación de los depósitos A β y se mejoró la memoria espacial (Wu et al. 2017).

Por otro lado, la activación del inflamasoma NLRP3 puede reducir la fagocitosis de la microglía sobre A β , aumentando así la formación de depósitos A β y promoviendo la aparición y el desarrollo de EA (Lučiūnaitė et al. 2020). La microglía puede engullir los agregados A β y secretar moléculas químicamente proinflamatorias o responder al péptido A β activando el inflamasoma, (Tschopp & Schroder 2010). El depósito de A β y la activación del inflamasoma NLRP3 pueden retroalimentarse ya que A β activa el inflamasoma vía NLRP3 y este último, activado, puede inducir la activación de un fenotipo proinflamatorio de la microglía y dar como resultado el depósito de A β y un mayor deterioro cognitivo en modelos de ratones con EA (Cherry et al. 2014).

4.2.2.3 Microglia y colesterol

Como ya se mencionó previamente, una de las funciones principales de la microglía es eliminar los desechos y otras moléculas citotóxicas en un esfuerzo constante por mantener un entorno homeostático (Nimmerjahn et al. 2005; Colonna & Butovsky 2017). Cuando la microglía no cumple con esta función esencial, pueden ocurrir una serie de efectos posteriores que llevarían al desarrollo de enfermedades. Por ejemplo, si las células de la microglía tienen un fenotipo fagocítico defectuoso debido a una sobrecarga de lípidos se puede promover la activación microglial crónica y autosostenida (Marschallinger et al. 2020; Colombo et al. 2021; Duong et al. 2021). La inflamación sostenida empuja aún más a la microglía a un estado de hiperactividad, lo que crea una retroalimentación que exacerba la neuroinflamación y daña la integridad de la barrera hematoencefálica (Hanisch & Kettenmann 2007).

Además, el aumento de colesterol puede derivar en un aumento de oxisteroles (metabolitos derivados de la oxidación de esta molécula), cuya acumulación puede generar un entorno proinflamatorio para la microglía (Gamba et al. 2015). En este sentido, se demostró que el

tratamiento de líneas celulares de microglía con 27-hidroxicolesterol induce la acumulación de ROS y la posterior activación de IL-6 (proinflamatoria) (Liu et al. 2017). A su vez, un aumento de ROS incrementa la proporción de esteroides de origen no enzimático y promueve un estado crónico de microglia reactiva (Simpson & Oliver 2020).

Otra forma en que el colesterol puede afectar negativamente la función de la microglía es a través de mecanismos que involucran proteínas de membrana (Račková et al. 2013). El enriquecimiento con colesterol en las membranas plasmáticas potencia la formación de balsas lipídicas, como ya he descrito anteriormente, lo que aumenta la proximidad física de las proteínas asociadas a las balsas. En relación con esto, existe evidencia que demuestra que en un entorno de membrana con alto contenido de colesterol, los monómeros de los receptores tipo Toll están muy cerca unos de otros, lo que permite la formación de dímeros de receptores tipo Toll. Esta dimerización promueve una señalización proinflamatoria en respuesta a ciertos agentes, como por ejemplo LPS (Ciesielska et al. 2021). Además, se ha demostrado que una dieta rica en colesterol (3 % de colesterol) induce un perfil proinflamatorio en modelos de microglía de roedores mediante la activación del inflammasoma, donde las citocinas antiinflamatorias también se secretan como parte de la respuesta, pero el resultado final es una BHE dañada (Chen et al. 2018).

4.2.2.4 Microglía en el contexto de homeostasis aberrante del Cu

Hu y col informaron que dosis sub-neurotóxicas de Cu(II) desencadenan la señalización mitocondrial de ROS—NF- κ B en modelos de roedores, lo que conduce a los efectos nocivos previamente mencionados mediados por las células de la microglía (Hu et al. 2014). De acuerdo con esto, otro grupo de investigación sugirió que concentraciones sub letales del complejo Cu(II)-A β provocan cambios en el fenotipo de la microglia con una liberación simultánea de TNF- α y NO (Hu et al. 2014; Venneti et al. 2009). Además, Kitazawa y col han informado que la exposición al Cu puede reducir fuertemente la eliminación fagocítica de A β y agravar la liberación de citoquinas proinflamatorias inducida por A β (IL-1 β , TNF- α e IL-6) (Kitazawa et al. 2016). A su vez, observaron un fuerte impacto en la reducción de la expresión del receptor de lipoproteínas LRP1 debido a la presencia de Cu, así como un deterioro en la activación fagocítica microglial provocando la acumulación patológica de A β en el cerebro (Kitazawa et al. 2016).

4.2.3 Objetivos

1. Analizar los niveles de colesterol (total, libre y esterificado) en cultivos celulares de microglia. Estudiar los niveles del factor de transcripción SREBP-2, transportadores de la familia ABC (ABCA-1) y el receptor de LDL.
2. Evaluar la generación de estrés oxidativo por medio de niveles de ROS. Estudiar la posible interacción sinérgica entre una sobrecarga de Cu y la respuesta inflamatoria inducida por A β sobre el estrés oxidativo mitocondrial.
3. Investigar la respuesta inflamatoria de la microglia midiendo la expresión interleuquinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF α) y la activación del inflammasoma vía NLRP3.

4.2.4 Resultados

Siendo el objetivo evaluar el efecto del Cu sobre los mecanismos bioquímico-moleculares subyacentes a la respuesta inflamatoria y la posible interacción del Cu con A β analizamos la viabilidad celular a diferentes concentraciones tanto de Cu durante 24 horas en presencia y ausencia de A β (Figura 32). Observamos que el tratamiento Cu 200 μ M + A β generó una disminución significativa de la viabilidad en un 50 % ($p < 0,01$) respecto al agregado de Cu 200 μ M solo. Sin embargo, el Cu solo (200 μ M) no generó cambios significativos en la viabilidad celular respecto del control.

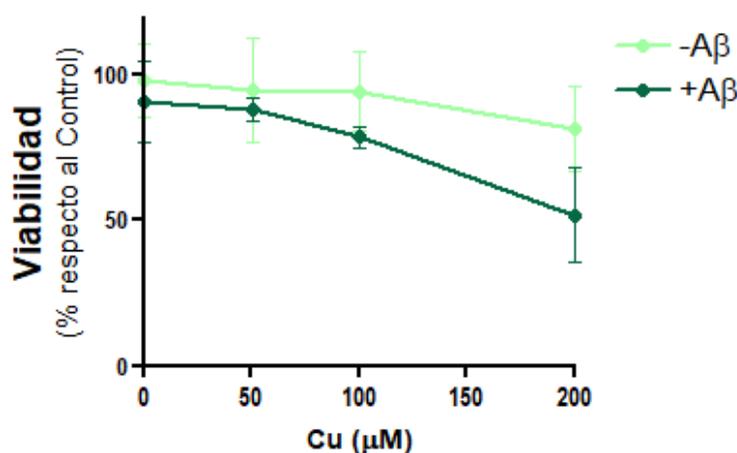


Figura 32: Viabilidad celular. Viabilidad celular determinada mediante el ensayo de MTT. Los resultados se calcularon utilizando ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett y expresaron el porcentaje medio \pm DE respecto del control ($n = 6$ para cada concentración utilizada). Las diferencias estadísticas con respecto al control (sin agregado de Cu) se indican como ** $p < 0,01$.

Por lo expuesto anteriormente, elegimos concentraciones de trabajo sub-tóxicas de 50, 100 y 200 μM de Cu para usar en los experimentos posteriores.

En una primera instancia, se analizó la concentración de ROS generado en las células luego de 24 horas de exposición a 100 y 200 μM de Cu, con y sin el agregado de A β (1 μM). Los niveles de ROS se analizaron por fluorimetría, incubando con con la sonda DHE. Nuestros resultados muestran que tanto la exposición a Cu 100 μM como Cu 200 μM aumentaron significativamente los niveles de ROS respecto del control (Cu 100 μM : 277 urf \pm 49,2 y Cu 200 μM : 339 urf \pm 108,7 vs. Ctrl 104,7 urf \pm 33,8) ($p < 0,05$). Por otro lado, observamos mayores niveles de ROS luego del tratamiento combinado de Cu 200 μM y A β ($p < 0,05$; 763 urf \pm 37) respecto a Cu 200 μM solo. (578 urf \pm 81). (Figura 33A).

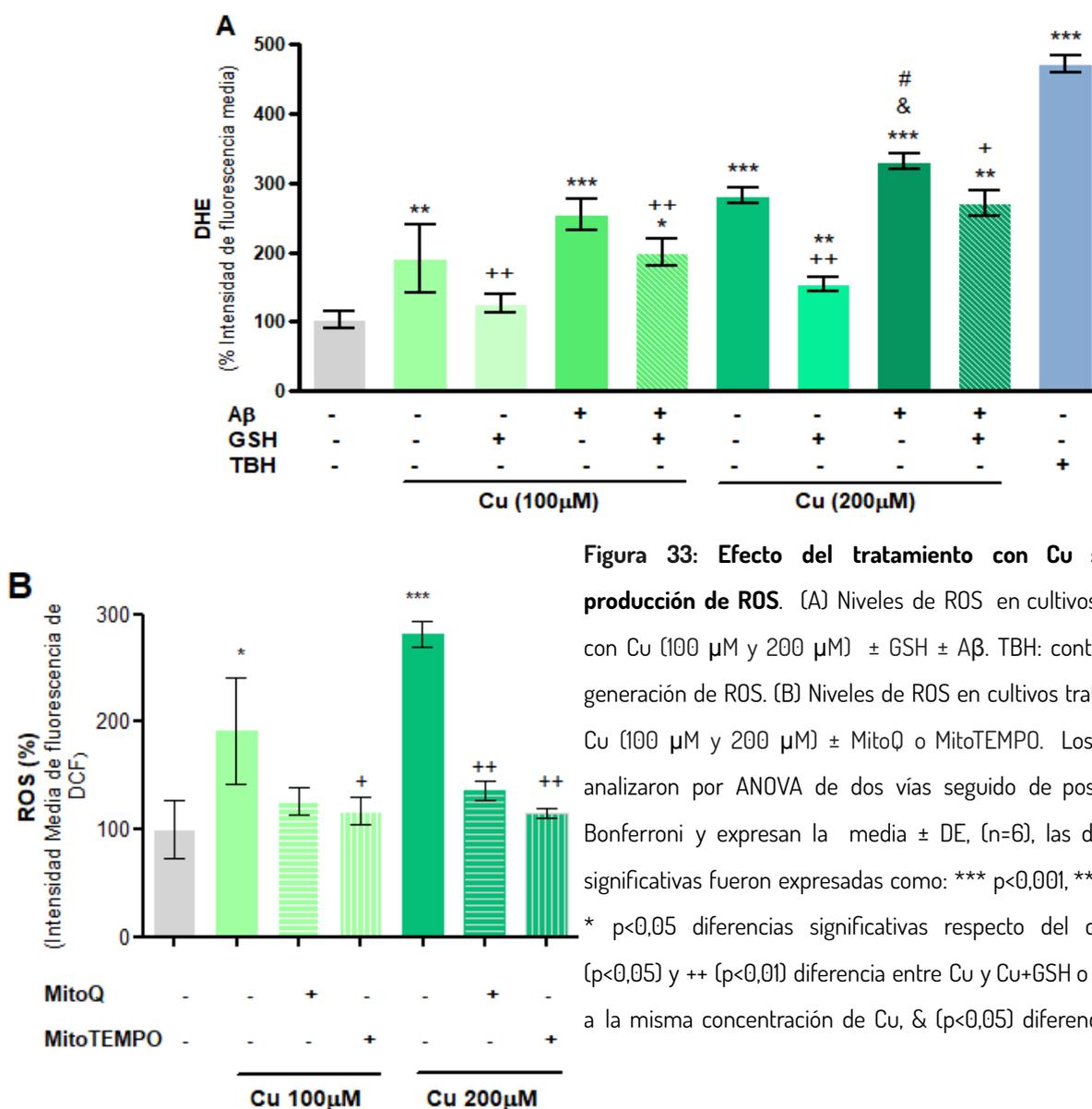


Figura 33: Efecto del tratamiento con Cu sobre la producción de ROS. (A) Niveles de ROS en cultivos tratados con Cu (100 μM y 200 μM) \pm GSH \pm A β . TBH: control (+) de generación de ROS. (B) Niveles de ROS en cultivos tratados con Cu (100 μM y 200 μM) \pm MitoQ o MitoTEMPO. Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías seguido de post test de Bonferroni y expresan la media \pm DE, (n=6), las diferencias significativas fueron expresadas como: *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ y * $p < 0,05$ diferencias significativas respecto del control, + ($p < 0,05$) y ++ ($p < 0,01$) diferencia entre Cu y Cu+GSH o Cu+MitoQ a la misma concentración de Cu, & ($p < 0,05$) diferencias entre

Cu:100 μM y Cu:200 μM tratados sólo con Cu, y # ($p < 0,05$) diferencias significativas Cu (200 μM) vs CuA β .

Además, observamos que el aumento de ROS se prevenía tanto con el tratamiento con éster de GSH (GSH + 100 μM Cu: 125 urf \pm 17,3 y GSH+ 200 μM Cu: 162,4 urf \pm 89,1), así como con los antioxidantes mitocondriales MitoTEMPO (MitoTEMPO + 100 μM Cu: 127 urf \pm 34,2 y MitoTEMPO + 200 μM Cu: 112,8 urf \pm 9,8) y MitoQ (MitoQ + 100 μM Cu: 142,1 urf \pm 26,2 y MitoQ + 200 μM Cu: 142,8 urf \pm 28,2). Esto

último sugiere que la mitocondria participaría también en la generación de ROS mediado por Cu.

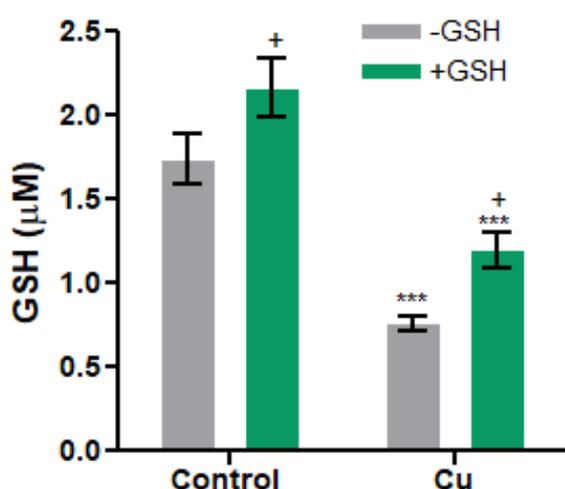


Figura 34: Efecto del tratamiento con Cu sobre los niveles de GSH mitocondrial. Los niveles de GSH se midieron utilizando el kit GSH/GSSH. Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías seguido de post test de Bonferroni y expresan la media \pm DE, (n=6), las diferencias significativas fueron expresadas como *** $p < 0,01$ diferencias significativas respecto del control, + ($p < 0,05$) diferencias entre pre-incubación con GSH (+GSH) y sin pre-incubación con GSH (-GSH)

Nuestros resultados revelaron una disminución significativa en los niveles de GSH mitocondrial (mGSH) con el tratamiento con Cu (100 μM) \pm GSH ($p < 0,01$; Cu 0,76 μM \pm 0,08 y Cu+GSH 1,22 μM \pm 0,13) (Figura 34). Confirmamos que los co-tratamiento con éster de GSH mejoraron parcialmente los niveles de mGSH en las células tratadas con Cu respecto del control.

A su vez, analizamos la posible regulación de la biosíntesis del colesterol mediada por el Cu y Cu \pm A β y el consiguiente aumento de los niveles de colesterol mitocondrial. En la figura 35 evaluamos el efecto del Cu sobre la expresión de las proteínas *Srebp-2* (figura 35A), y *Hmgcr* (figura 35B) relacionadas con la regulación de la síntesis de colesterol. Nuestros resultados muestran un aumento significativo respecto del control de la expresión de las mismas tanto luego del tratamiento con Cu (100 μM) (*Srebp-2*: Cu 3,08 UA \pm 0,55 vs Ctrl 1,02 UA \pm 0,02; *Hmgcr*: Cu 4,3 UA \pm 0,37 vs Ctrl 1,04 UA \pm 0,03; *ApoE*: Cu 6,75 UA \pm 0,46 vs Ctrl 1,11 UA \pm 0,03) como con Cu \pm A β (*Srebp-2*: Cu+A β 3,25 UA \pm 1,14 vs Ctrl 1,02 UA \pm 0,02; *Hmgcr*: Cu+A β 4,2 UA \pm 0,42 vs Ctrl 1,04 UA \pm 0,03) (Figura 35).

También se observó un aumento del ARNm de ApoE (Ctrl 1,19 UA ± 0,03; Cu 6,97 UA ± 0,054; Cu+Aβ 9,94 UA ± 0,431) (Figura 35C), proteína relacionada con el transporte de colesterol.

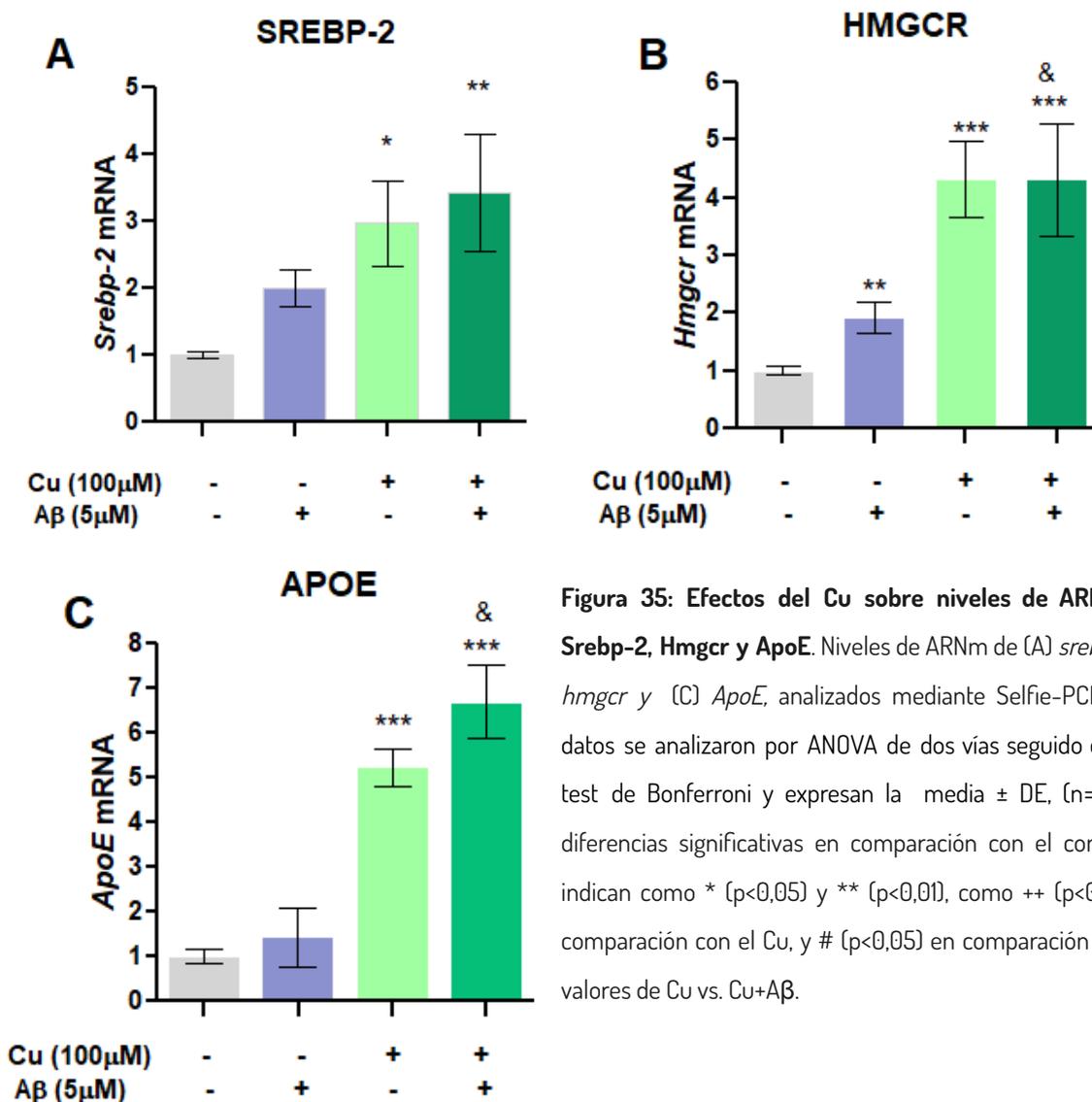


Figura 35: Efectos del Cu sobre niveles de ARNm de Srebp-2, Hmgcr y ApoE. Niveles de ARNm de (A) *srebp2*, (B) *hmgcr* y (C) *apoE*, analizados mediante Selfie-PCR. Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías seguido de post test de Bonferroni y expresan la media ± DE, (n=6). Las diferencias significativas en comparación con el control se indican como * (p<0,05) y ** (p<0,01), como ++ (p<0,01) en comparación con el Cu, y # (p<0,05) en comparación con los valores de Cu vs. Cu+Aβ.

También analizamos los niveles de proteína de la enzima HMGCR observando un aumento significativo respecto del control luego del tratamiento de Cu (p<0,01) y Cu+Aβ (p<0,01) (Cu 1,434 UA ± 0,315; Cu+Aβ 1,684 UA ± 0,228; Cu+GSH 0,712 UA ± 0,112; Cu+Aβ+GSH 0,921 UA ± 0,213) (figura 36A). Por otro lado, evaluamos los niveles de colesterol total (figura 36B) a partir del homogenato celular y los niveles de colesterol mitocondrial a partir de mitocondrias aisladas (sección 3.4.11). Observamos

que el tratamiento con Cu incrementó los niveles de colesterol total (Cu 14,3 $\mu\text{g}/\text{mL} \pm 0,72$ vs. Ctrl 7,85 $\mu\text{g}/\text{mL} \pm 0,23$) y mitocondrial 8,36 $\mu\text{g}/\text{mL} \pm 1,09$ vs. Ctrl 6,13 $\mu\text{g}/\text{mL} \pm 1,12$) en concordancia con una tendencia a aumentar el colesterol libre (figura 36C).

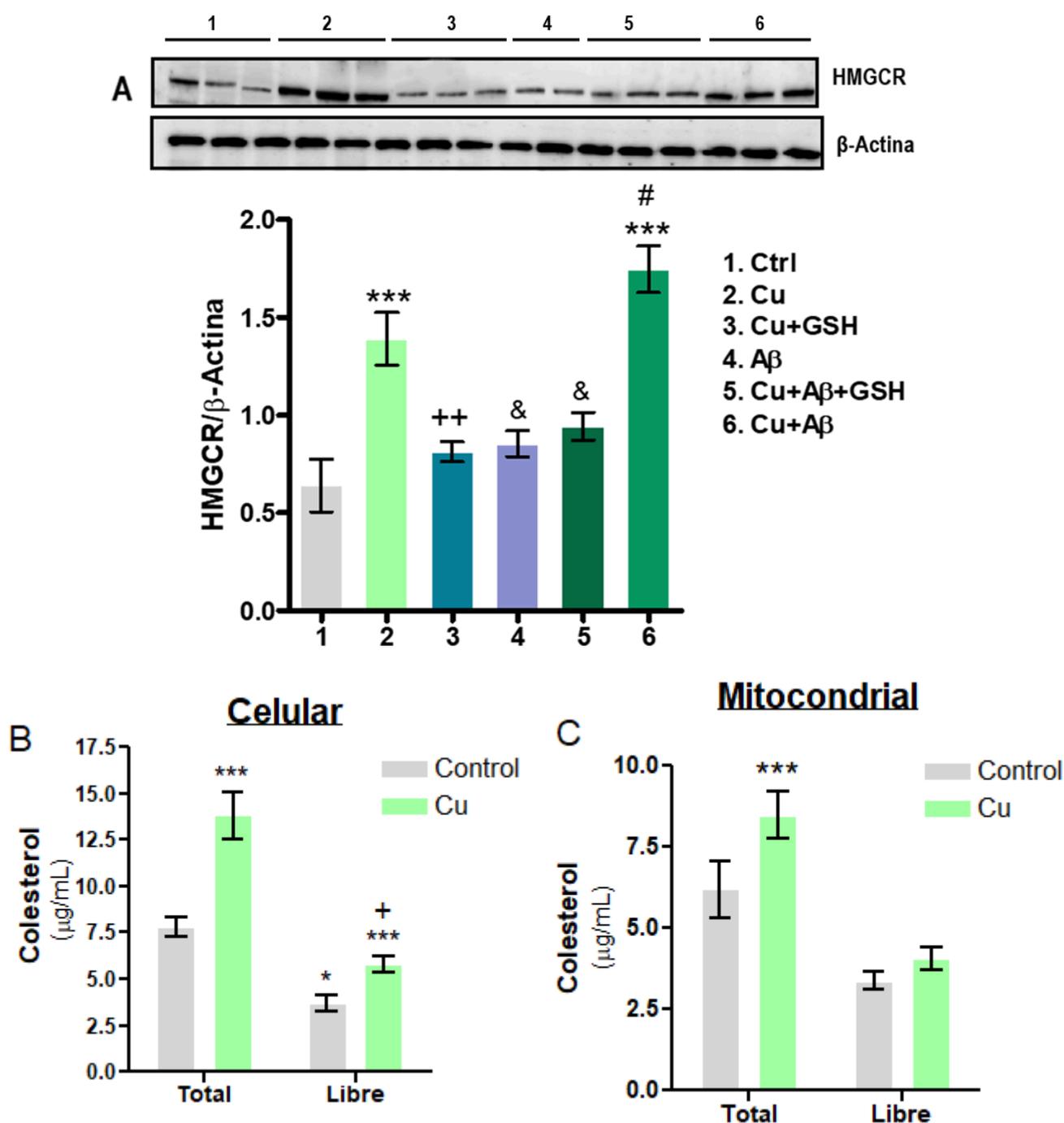


Figura 36: Efectos del Cu sobre los niveles de la proteína HMGR y del colesterol celular y mitocondrial. (A) Niveles de proteína HMGR, (B) Niveles de colesterol celular y (C) Niveles de colesterol mitocondrial. Los niveles del colesterol se midieron con el Kit Amplex Red. Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías seguido de post test de Bonferroni y expresan la media \pm DE, (n=6). Las diferencias estadísticas en comparación con el control se indican como *

($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) y *** ($p < 0,001$), como ++ ($p < 0,01$) en comparación con los valores de Cu, y # ($p < 0,05$) entre los valores de Cu vs. Cu+A β .

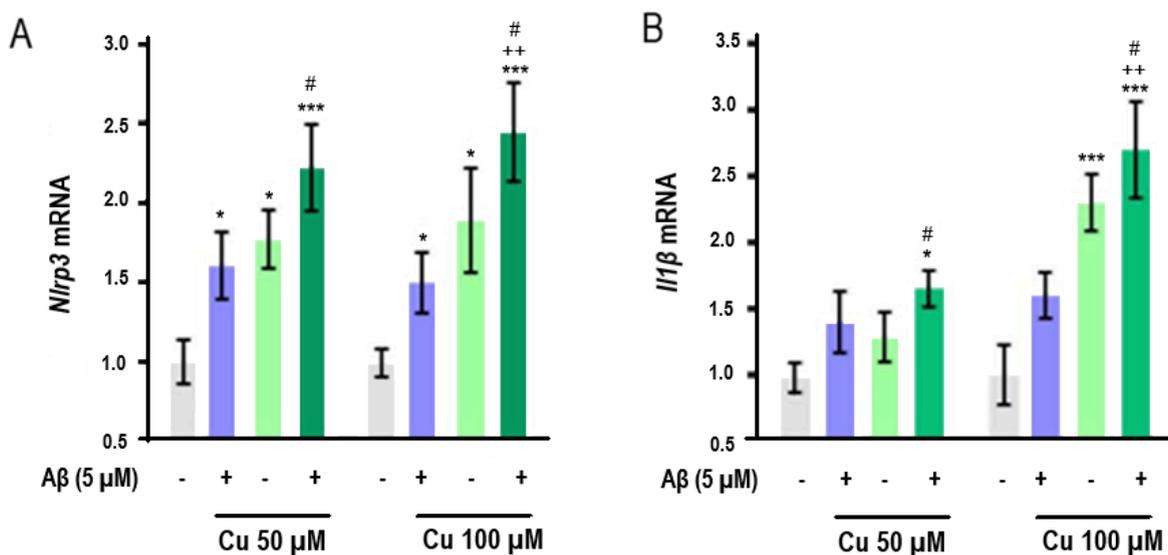
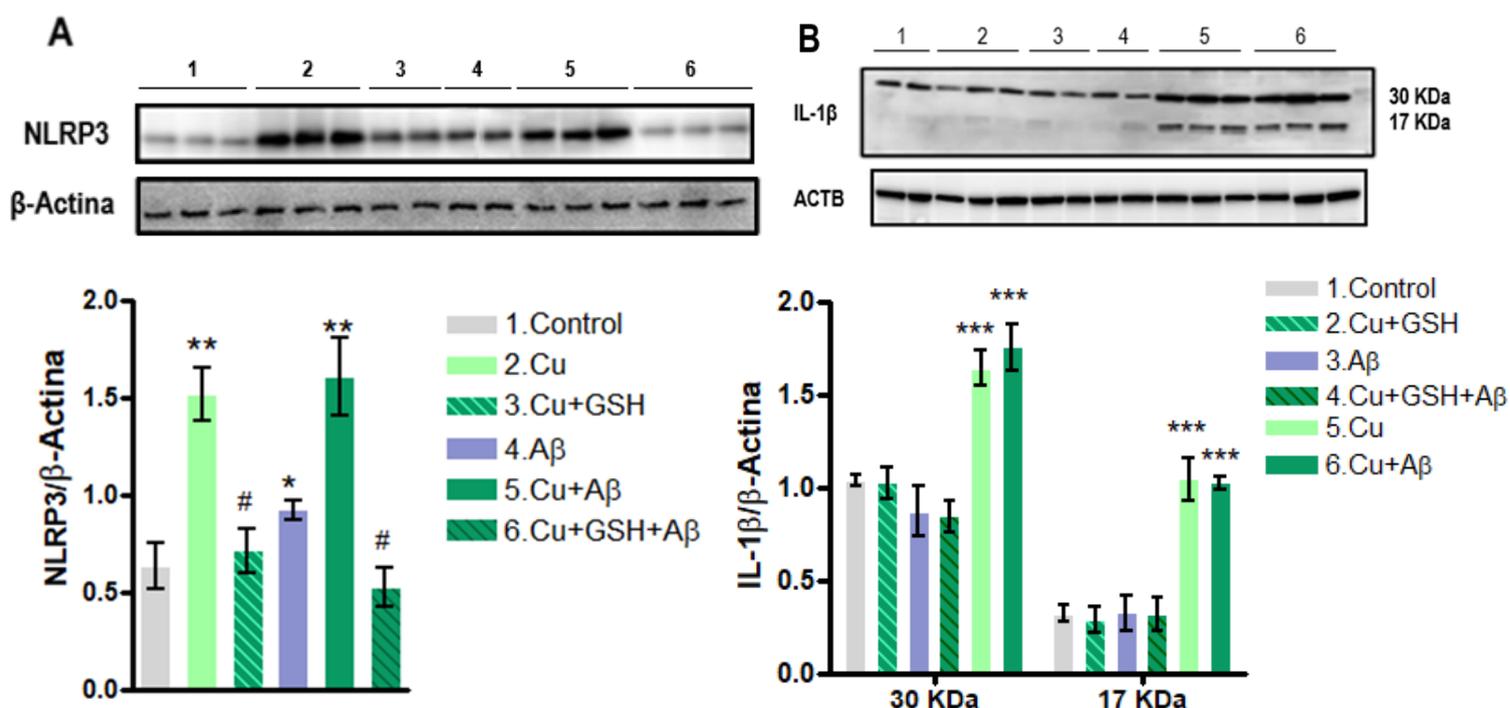


Figura 37: Expresión de *IL-1β* y *Nlrp3*. La expresión de (A) *Nlrp3* y (B) *IL-1β* se determinó mediante Selfie-PCR. Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías seguido de post test de Bonferroni y expresan la media \pm DE, (n=6). Las diferencias estadísticas respecto del control se indican con * ($p < 0,05$) y *** ($p < 0,01$), como ++ ($p < 0,01$) respecto a Cu, y # ($p < 0,05$) respecto a A β (n=6).

En la [figura 37](#) analizamos la expresión de *il-1β* y *Nlrp3*, dos proteínas que se ven aumentadas cuando hay activación del inflamasoma. El tratamiento con Cu (100 μ M) indujo la expresión de *Nlrp3* ([figura 37A](#)) (Ctrl 1,02 UA \pm 0,22; Cu 1,79 UA \pm 0,99; Cu+A β 2,47 UA \pm 0,86) y de *IL-1β* ([Figura 37B](#)) (Ctrl 1,01 UA \pm 0,67; Cu 2,28 UA \pm 0,88; Cu+A β 2,63 UA \pm 1,02), indicativo de una posible participación del inflamasoma. La combinación de Cu y A β potenció esta activación. Decidimos evaluar también los niveles de estas proteínas, observando un marcado aumento con los tratamientos con Cu (1,49 UA \pm 0,98) y Cu+A β (1,66 UA \pm 0,85) respecto el control (0,62 UA \pm 0,33) en NLRP3 ([figura 38A](#)) y en los niveles de pro-IL-1 β -30kDa- (Cu 16,4 UA \pm 2,28 y Cu+A β 17,33 UA \pm 5,75 vs. Ctrl 9,94 UA \pm 3,55) e IL-1 β activa -17kDa- (Cu 11,2 UA \pm 1,13 y Cu+A β 11,43 UA \pm 1,07 vs. Ctrl 2,88 UA \pm 0,75 ([figura 38B](#))). Además, se observó que la expresión (Ctrl 9,98 UA \pm 1,19 Cu UA 19,44 \pm 2,13; Cu+A β 21,05 UA \pm 7,88) ([Figura 38C](#)) y actividad de Caspasa-1 (Ctrl 1932,25 RLU \pm 62,47; Cu 9902,25 RLU \pm 482,98; Cu+GSH 2979,75 RLU \pm 786,57; CuMitoQ 1532,5 RLU \pm 507,04; Cu+A β 8170,25 RLU \pm 1427,83) ([Figura 38D](#)) aumentaron tras la incubación con Cu y Cu+Ab. El tratamiento con GSH previno

el efecto inductor del Cu pero se observó una diferencia más marcada cuando se trató con el antioxidante MitoQ dirigido a la mitocondria. Por otro lado, se midieron los niveles de IL-1 β en el medio de cultivo (Figura 38E) utilizando el Kit de ELISA de IL-1 β de ratón y se observó un aumento significativo ($p < 0,01$) con en tratamiento con Cu (87,5 pg/mL \pm 11,46) y con Cu+A β (64,17 pg/mL \pm 12,58) respecto al control (8,33 pg/mL \pm 2,89). Se observó una disminución de la liberación de IL-1 β luego del tratamiento con Cu respecto a los tratamientos Cu + GSH (58,33 pg/mL \pm 7,64) y Cu + MitoQ (30,83 pg/mL \pm 6,29), Sólo se observaron diferencias significativas en la liberación de IL-1 β con y sin Tritón cuando se trataron a las células con Cu (Sin Tritón 87,5 pg/mL \pm 11,46 vs. con Tritón 91,67 pg/mL \pm 18,43). Esto puede dar una idea de que el Cu promueve la liberación de IL-1 β libre (sin tritón) y en vesículas (con tritón). Como marcador de ensamblaje y activación del inflammasoma analizamos la presencia de oligómeros de la proteína ASC (Figura 38F). Transfectamos las células con el vector pLEX-MSC-ASC-GFP con el fin de lograr visualizar su oligomerización por microscopía, y luego de 24 horas de tratamiento con Cu, analizamos la distribución intracelular de la proteína. Las células no tratadas (Ctrl) presentaron una distribución homogénea en el citosol de ASC, por el contrario, en las células tratadas con Cu y Cu+A β se observó la presencia de agregados de ASC ("specks") cercanos al núcleo indicativo de la presencia de inflammasomas.



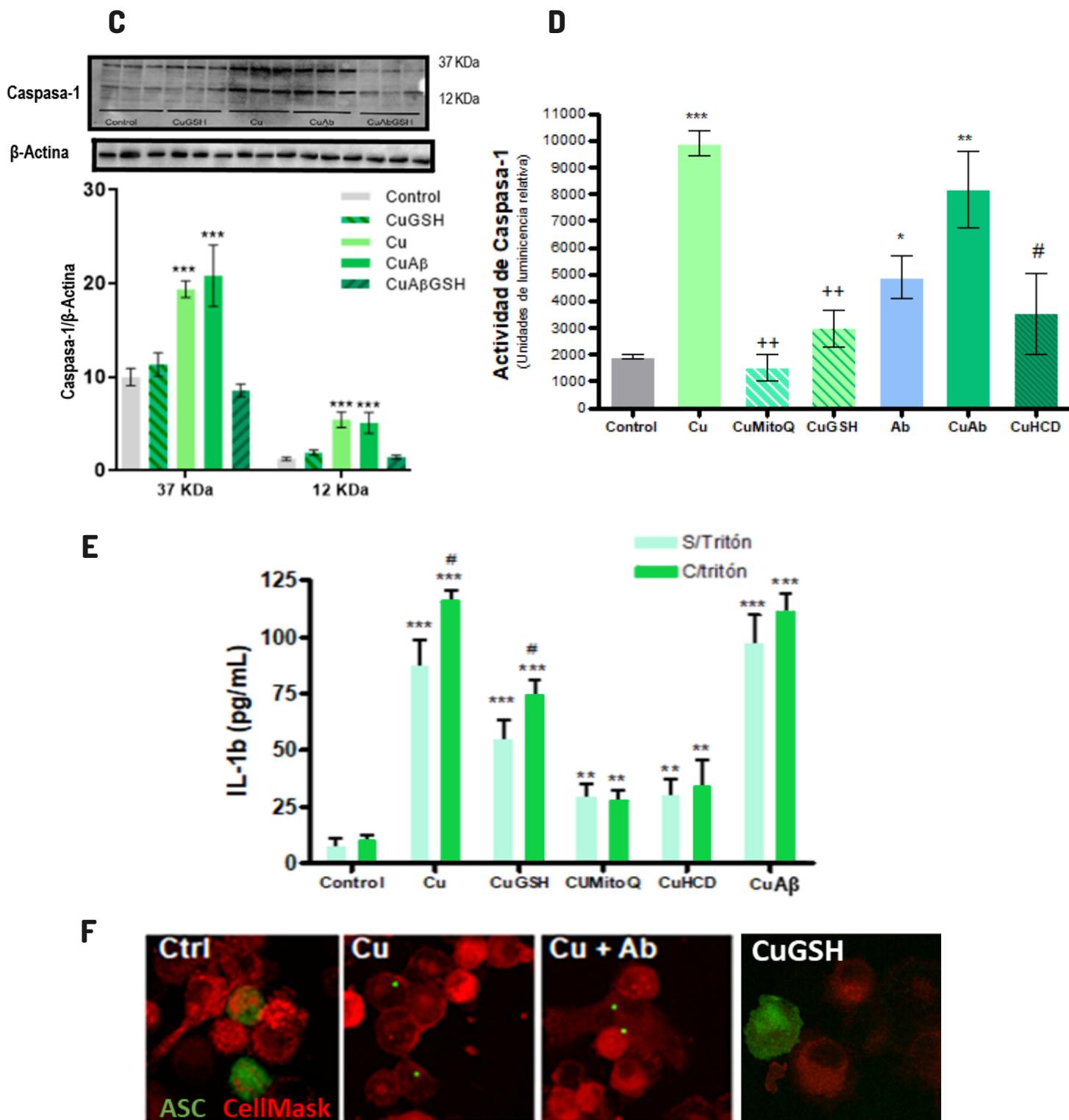


Figura 38: Activación del inflamasoma. Niveles de las proteínas (A) NLRP3, (B) IL-1 β y (C) caspasa-1 por western blot. β -actina se utilizó como control de carga. (D) Medida de la actividad de Caspasa-1 por luminiscencia mediante el Kit

caspasa-1 Glo®. (E) Niveles de IL-1 β liberado al medio de cultivo con y sin tritón para evaluar posible liberación en VE. (F) El ensamblaje del inflamasoma. Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías seguido de post test de Bonferroni y expresan la media \pm DE, (n=8). Las diferencias estadísticas respecto a los valores de control se indican con * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) y *** ($p < 0,001$); con ++ ($p < 0,01$) en comparación con los valores de Cu+A β , y como # ($p < 0,05$) en comparación con los valores de Cu (n=6).

Finalmente, evaluamos la posible activación microglial de las células SIMA-9 luego del tratamiento con Cu. Observamos que esta activación se acompaña de un deterioro de la capacidad fagocítica (Figura 39) y de una reducción de los niveles del ARNm de TREM2 (Figura 40).

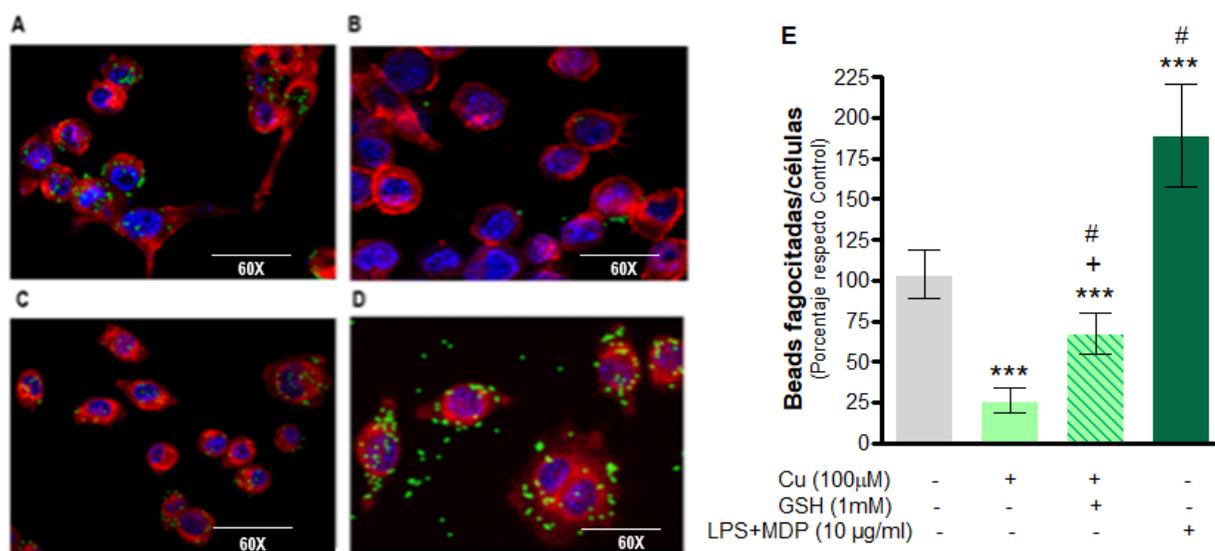


Figura 39: Fagocitosis microglial. La fagocitosis microglial se evaluó considerando el nivel de internalización de microperlas fluorescentes amarillo-verde (1 μ m) por microscopía confocal. La imagen (A) corresponde a células control y la (B) a células tratadas con Cu 100 μ M. En algunos casos, las células se pre-trataron con (C) GSH (GSH, 1 mM) o (D) LPS+MDP como control positivo de fagocitosis. La membrana plasmática y el núcleo se tiñeron con CellMask (dilución 1:20.000, rojo) y DAPI (dilución 1:500, azul), respectivamente, durante 5 minutos. La letra (E) corresponde a la cuantificación del número de beads fagocitadas respecto a cada célula individual. Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías seguido de post test de Bonferroni y expresan la media \pm DE, (n=20). Las diferencias estadísticas en comparación con los valores de control se indican como *** ($p < 0,01$), como + ($p < 0,05$) en comparación con los valores de Cu, y como # ($p < 0,05$) en comparación con los valores de Cu+GSH. (n=20)

La capacidad fagocítica se analizó mediante microscopía confocal, empleando 0,01 % p/v beads fluorescentes (1 μ m). Observamos que el tratamiento con Cu (26,25 % \pm 7,77) disminuye

significativamente la fagocitosis ($p < 0,01$) respecto del control ($103,85 \% \pm 14,84$). La recuperación de los niveles de GSH ($67,23 \% \pm 12,7$) recuperó parcialmente la fagocitosis. Como control positivo empleamos una combinación de endotoxinas bacterianas [LPS+muramil-dipéptido (MDP)] que inducen la activación de la microglía donde observamos un aumento de la fagocitosis ($156,84 \% \pm 33,2$). Esto se acompañó de una regulación al alza de Iba-1 (Figura 40) marcador de activación microglial y una regulación a la baja de los niveles de ARNm de Trem2.

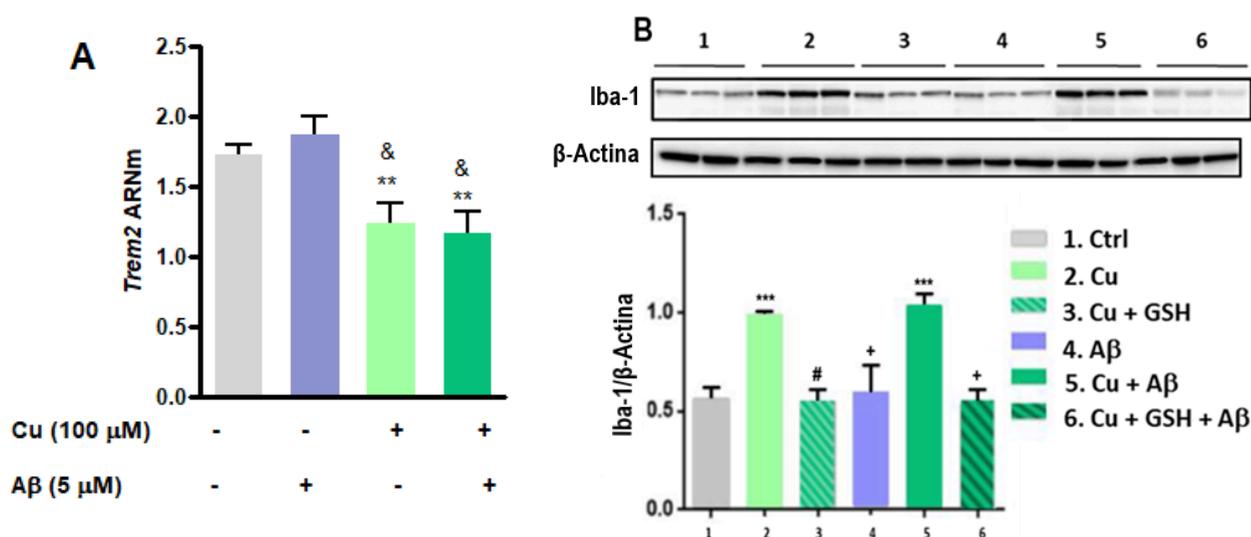


Figura 40: Niveles de ARNm de *Trem2* y de proteína Iba-1. (A) Análisis de los niveles de ARNm de Trem2 mediante Selfie-PCR. (B) Los niveles de proteína Iba-1 se evaluaron mediante western blot. Los cultivos se trataron con Cu (100 mM) y/o Aβ (5 mM). En algunos casos, las células se pre-trataron con éster etílico de GSH (GSH, 1 mM). La β-actina se utilizó como control de carga. Los datos se analizaron por ANOVA de dos vías seguido de post test de Bonferroni y expresan la media \pm DE, (n=6). Las diferencias estadísticas con los valores de control se indican como *** ($p < 0,01$), como & ($p < 0,05$; *trem2*) ó + ($p < 0,01$; Iba-1) en comparación con los valores de Cu+Aβ y # ($p < 0,05$) en comparación con los valores de Cu (n=6).

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

La EA es la causa más común de demencia en personas de edad avanzada (mayores de 65 años) en todo el mundo y actualmente carece de cura. Varios trabajos han demostrado que las concentraciones cerebrales de colesterol son mayores en las personas que padecen EA esporádico que en los adultos sanos (Bogdanovic et al. 2001; Cohn et al. 2021). Nuestro grupo, junto con otros autores, hemos demostrado previamente que las personas pueden estar expuestas a una sobrecarga de Cu de diferentes maneras (Arnal et al. 2011; Arnal et al. 2010; Brewer 2011). Este metal, ampliamente utilizado en diversas industrias, puede contaminar aguas superficiales y acuíferos, incluyendo el suministro de agua potable (Buchanan et al. 1999; Riedel 2008). Las zonas urbanas y rurales son fuentes adicionales de contaminación debido al uso de combustibles fósiles y pesticidas, respectivamente (Gunay et al. 2006). Experimentos *in vivo* mostraron que cantidades mínimas de Cu (0,12 ppm) en el agua de bebida, junto con una dieta rica en colesterol, inducen cambios estructurales en A β , la formación de placas A β y déficits de aprendizaje, en conejos (Sparks & Schreurs 2003). Además, se demostró en ratones, que la exposición prolongada a bajos niveles de Cu (20 μ M) en el agua de bebida produce niveles elevados de A β en el cerebro y neuroinflamación, dos fenómenos considerados característicos del desarrollo de la EA (Singh et al. 2013). Cabe destacar que se sabe que quienes padecen EA tienen niveles plasmáticos elevados de Cu libre respecto a los individuos adultos sanos (Arnal et al. 2010a; Squitti et al. 2008). En relación con estos resultados se ha observado en autopsias de cerebros de pacientes con EA, que los mismos poseen niveles anormalmente altos de Cu (25 μ g/g,) en las placas seniles (Chen et al. 2011; Lovell et al. 1998). Esto es aproximadamente 393 μ M de Cu.

La Alzheimer's Association también señala que la EA afecta más a las mujeres que a los hombres (Alzheimer's Association. 2022). Existen varias hipótesis biológicas importantes sobre estas diferencias sexuales en la EA, como las diferencias en la reducción de las hormonas sexuales relacionadas con la edad (reducción de estrógenos en la menopausia). Además, algunos trabajos han mostrado que en las mujeres, pero no en los hombres, todos los indicadores de imágenes mostraban curvas de correlación consistentes con la progresión de la EA. Durante el seguimiento de dos años, solo las mujeres presentaron un deterioro metabólico cerebral evidente, y la proporción de A β plasmático 42/40 se identificó como un posible biomarcador del metabolismo cerebral en ellas. Además, nuestro análisis del transcriptoma reveló

diferencias de sexo en los cerebros de pacientes con EA, así como una red molecular específica de 25 genes metabólicos de la glucosa en las mujeres (Cui et al. 2013; Park et al. 2023).

En primer lugar analizamos la concentración intracelular de Cu luego de 24 horas de tratamiento en los ADCH y ADCM tratados con y sin Cu. Pudimos observar que los astrocitos expuestos a 400 μM de Cu tenían concentraciones intracelulares de este metal significativamente más altas que las del grupo control. A pesar de ello no se observaron diferencias significativas entre ADCH o ADCM indicando que el Cu se incorpora de igual manera independientemente del sexo del animal del cual deriva el cultivo primario. En este sentido, investigaciones previas han demostrado *in vivo* e *in vitro* que los astrocitos pueden incorporar los iones Cu de forma eficaz (Haywood et al. 2008; Haywood & Vaillant 2014; Scheiber et al. 2010) a través de transportadores como el transportador de Cu 1 (CTR1) (Scheiber et al. 2010; Eisses & Kaplan 2002) y el transportador de metales divalentes 1 (DMT1) (Burdo et al. 2001; Urrutia et al. 2013). Es interesante remarcar que previamente hemos demostrado *in vitro* que no sólo la exposición a Cu aumenta la producción de ROS, sino que la exposición a hierro (Fe) también, (Zubillaga et al. 2022). Sin embargo, al exponer las células al zinc (Zn), a pesar de haberlo utilizado en su forma divalente, al igual que el Cu y el Fe, no se observaron aumentos en ROS. Dado que el Cu y el Fe son metales de transición redox-activos, y no así el Zn, pueden participar en las reacciones de Fenton o Haber-Weiss generando aumentos en los niveles de ROS (Tsang et al. 2021), no fue sorprendente observar un aumento de las mismas luego del tratamiento con estos metales. De manera interesante, en el presente trabajo pudimos notar que los ADCH generaron significativamente más ROS que los ADCM, no sólo luego del tratamiento con Cu, sino también luego de la exposición a TBH. Es relevante destacar que, a lo largo de estos estudios, se utilizó sulfato (SO_4^{2-}) como anión acompañante en todos los metales, por lo que pudimos concluir que las diferencias observadas fueron consecuencia de la presencia de los metales y no del grupo sulfato (Zubillaga et al. 2022). Por otro lado, nuestros resultados muestran por primera vez que los ADCH son más sensibles a las sustancias generadoras de ROS respecto de los ADCM. En concordancia, algunos estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado diferencias relacionadas con el sexo en la capacidad de desintoxicación con antioxidantes, siendo mayor en hembras que en machos (Demarest & McCarthy 2015). En nuestro trabajo, esta mayor sensibilidad de los ADCH se reflejó en una mayor actividad de la enzima SOD, que forma parte del sistema enzimático de defensa antioxidante de las células. En consonancia con estos resultados, la peroxidación lipídica, medida como TBARS, aumentó luego del tratamiento con Cu, pero no fue diferente en ADCH comparado con ADCM. A pesar del aumento de la actividad SOD y de los niveles de TBARS luego del

tratamiento con Cu, no se observaron diferencias ligadas al sexo en la supervivencia de los astrocitos en comparación con las células control. Además de observar aumentos de estrés oxidativo en los astrocitos tratados con Cu, pudimos ver aumentos significativos en la producción de TNF- α , los cuales a su vez, fueron mayores en los ADCH con respecto a los ADCM. Nuestros resultados difieren de los resultados previos publicados donde concluyen que los ADCH producen niveles más bajos, que los ADCM, de las citocinas proinflamatorias como TNF- α cuando se exponen astrocitos de rata a LPS (Santos-Galindo et al. 2011; Chistyakov et al. 2018). Es fundamental resaltar que las formas en que el LPS y el Cu activan a los astrocitos difieren considerablemente, lo cual podría explicar las disparidades observadas en los niveles de ARNm de TNF- α respecto a estos trabajos. Para comprender mejor estas diferencias, es necesario explorar más a fondo los mecanismos distintivos de activación de cada uno de estos agentes. Es interesante notar que otros investigadores han observado aumentos de estrés oxidativo y aumentos en la expresión de GFAP en astrocitos expuestos a agentes tóxicos (McCann et al. 2021). De igual manera, nosotros observamos un aumento notable en los niveles de expresión de GFAP en cultivos astrocitarios tratados con Cu, el cual fue significativamente más pronunciado en ADCH respecto de ADCM. Esto concuerda con trabajos previos donde proponen que las hembras serían más susceptibles a los agentes generadores de ROS que los machos (Schmid et al. 2019). Por otro lado, pudimos observar que la incubación con el antioxidante NAC junto con el Cu logró restablecer los niveles de GFAP a valores cercanos a los del control en ADCM, mientras que en ADCH persistieron niveles significativamente elevados. Cabe destacar que si bien se han informado diferencias sexuales subyacentes en la expresión de GFAP de los astrocitos en varias regiones del SNC de la rata, entre ellas el hipocampo y corteza (Arias et al. 2009; Johnson et al. 2008), nosotros no hemos observado diferencias en los niveles de GFAP en ADCH o ADCM. Es probable que esto se deba a que los experimentos se llevaron a cabo en cultivos combinados de astrocitos provenientes de corteza e hipocampo. Es importante mencionar que Sun y col han realizado un análisis proteómico del hipocampo en ratones tras una exposición prolongada a niveles bajos de Cu (0,13 ppm) en el agua de bebida y observaron que GFAP, entre otras, se encontraba significativamente regulada al alza en el hipocampo de los ratones tratados con Cu en comparación con los ratones control. De acuerdo con los datos del análisis proteómico, Sun y col demostraron un deterioro de la memoria en ratones tratados con Cu, medido mediante la prueba del laberinto acuático de Morris (Sun et al. 2016).

Varios trabajos han demostrado que las ROS no sólo pueden oxidar moléculas, sino también actuar como segundos mensajeros (Seo et al. 2019; Forrester et al. 2018). De hecho, se ha observado *in vitro* que

aumentos de ROS se relacionan con aumentos de la expresión de SREBP-2 (Seo & Shin 2017). Dado que se sabe que la hipercolesterolemia es un factor de riesgo para el desarrollo de EA, y que los astrocitos son las células responsables de la síntesis y entrega de colesterol a las neuronas en el cerebro maduro, uno de los objetivos de este trabajo de tesis fue dilucidar el posible efecto ligado al sexo de la concentración subletal de Cu sobre el metabolismo de colesterol en cultivos primarios de estas células gliales, diferenciando además, las posibles respuestas dependiendo del sexo de las ratas de origen. A su vez, analizamos la, y analizar una posible relación con las variaciones de los niveles de colesterol y APP en las balsas lipídicas neuronales y los niveles de APP. En concordancia con la literatura, en este trabajo mostramos un aumento de la expresión de SREBP-2 luego de los tratamientos generadores de ROS, Cu y TBH. Es importante señalar que, aunque ambos tratamientos produjeron cantidades similares de ROS, el Cu indujo una mayor expresión de SREBP-2 que TBH. De manera interesante, pudimos ver que este aumento fue mayor en los ADCH respecto de los ADCM. Cabe destacarse que los niveles de expresión de SREBP-2 no mostraron cambios significativos en comparación con el control cuando el Cu se combinó con la molécula antioxidante NAC. Estos resultados sugieren que el aumento de SREBP-2 podría deberse principalmente a la producción de ROS. En línea con nuestros resultados, Fuhrman y col demostraron en células monocíticas THP-1 diferenciadas en macrófagos que la activación de SREBP-2 está regulada positivamente por la cascada de señalización ligada a ROS-ERK1/2 dependiente de PI3K-NADPH oxidasa (Fuhrman et al. 2009). En este sentido, especulamos que este mecanismo podría justificar los aumentos de expresión de SREBP-2 al exponer los cultivos de astrocitos al Cu y TBH. Por otro lado, y en concordancia con la mayor sensibilidad de los ADCH que observamos en el presente trabajo, Roemgens y col (2011) observaron que al tratar ADCH de corteza con cianuro y cobalto, aumentaban los niveles de la Ciclooxygenasa IV-2 (COX IV-2) acompañada por una mayor producción de ROS y muerte celular necrótica. En los ADCM, la relación de COX IV-1/COX IV-2 fue más baja respecto de los ADCH (Roemgens et al. 2011). Esto nos da indicios de que existe un mecanismo por el cual los ADCH responden de manera más sensible a los efectos de ROS. A pesar de esto, consideramos necesario seguir profundizando los estudios, ya que existen trabajos donde observaron que los ADCH son más resistentes que los ADCM a la privación de oxígeno y glucosa y a la muerte celular inducida por oxidantes (Liu et al. 2007). Como he descrito anteriormente, SREBP-2 es un factor de transcripción que promueve la expresión de genes relacionados con la síntesis de colesterol como HMGCR, la principal enzima reguladora de la vía del mevalonato (Keller et al. 2010; Xue et al. 2020). Es más, Liu y col demostraron que el aumento de SREBP-2 fue seguido de la sobreexpresión de HMGCR

(Liu et al. 2015). En concordancia, nuestros resultados revelan aumentos en la expresión de HMGCR después de los tratamientos con Cu y TBH, los cuales también habían incrementado la expresión de SREBP-2. Cabe destacar que este aumento de la expresión de HMGCR también fue mayor en los ADCH que en los ADCM. La diferencia en los niveles de expresión de SREBP-2 y HMGCR entre los tratamientos con Cu y TBH en astrocitos del mismo sexo puede deberse a la diferencia en los niveles de ROS, los cuales fueron significativamente menores luego de tratamiento con TBH respecto del tratamiento con Cu. Es interesante remarcar, que si bien en este trabajo de tesis, no observamos aumentos de ROS ni de la expresión de SREBP-2 luego del tratamiento con Cu + NAC respecto al control. Pudimos observar un incremento notable respecto al control en la expresión de HMGCR en los ADCH, pero no en los ADCM, luego del tratamiento con Cu + NAC. De esta manera, podemos especular que el Cu podría modular de alguna manera la expresión de HMGCR en ADCH y no en ADCM. Debido a que observamos que NAC no logra reducir los niveles de ROS a los niveles del control, pensamos que el incremento observado podría ser resultado tanto de la capacidad del Cu como inductor de estrés oxidativo activando SREBP-2 (Xiao et al. 2013; Kim et al. 2018) y de la habilidad de este metal para unirse a diversas proteínas (Blockhuys et al. 2017) pudiendo activar directamente la transcripción de HMGCR. En relación con esto, trabajos previos han observado aumentos de la cantidad de SREBP-2 en los núcleos de un modelo de ratones de enfermedad de Wilson donde se acumula Cu en el citosol de sus células (Huster et al. 2007). Este grupo también observó que los genes diana de SREBP-2, entre ellos HMGCR, estaban desregulados, sugiriendo que el Cu elevado altera la función de SREBP-2 en lugar de su procesamiento o relocalización (Huster et al. 2007). En línea con los aumentos de expresión de SREBP-2 y HMGCR, pudimos observar un aumento de la síntesis *de novo* de colesterol luego de los tratamientos con Cu y TBH. Esto refuerza los resultados previos, *in vitro*, hallados por nosotros donde vimos que la exposición a sobrecargas subletales de Cu promueve la síntesis de colesterol *de novo* en cultivos establecidos (Zubillaga et al. 2022). Nosotros hipotetizamos que este aumento de la síntesis puede deberse por dos motivos: en primer lugar, a través de la generación de ROS, que podría actuar como un segundo mensajero, activando SREBP-2 (Zubillaga et al. 2022; Forman et al. 2010; Fuhrman et al. 2009); y en segundo lugar, a través del Cu de manera directa, utilizando un mecanismo aún no dilucidado. Por esta razón, podemos pensar que el aumento más marcado en ADCH de la expresión de SREBP-2 y HMGCR reportado en este trabajo de tesis, puede justificar el mayor aumento en la síntesis de colesterol observado en esas células. Entonces consideramos que los aumentos de la síntesis de colesterol *de novo* con Cu y TBH podría deberse al aumento en la expresión del factor de

transcripción SREBP-2 y de la enzima HMGCR, enzima limitante en la vía de síntesis de colesterol. Por otro lado, pudimos observar que el tratamiento con Cu + NAC tanto en los ADCM como los ADCH suprimió la ruta de activación de SREBP-2 y HMGCR inducida por ROS, respaldando la hipótesis de que el Cu afecta directamente la expresión de HMGCR y por ende, puede aumentar los niveles de colesterol.

Varios trabajos han demostrado que el colesterol sintetizado por los astrocitos se incorpora principalmente a lipoproteínas para ser secretado al medio extracelular por transportadores específicos y posteriormente importado a las neuronas (Li et al. 2022; Gliozzi et al. 2021). Se ha descrito una disminución de la liberación de colesterol en los astrocitos que se acompaña de una disminución de los niveles de ABCA-1 (Sierra et al. 2021). En concordancia con esto, en el presente trabajo el aumento de ABCA-1 se asoció con un aumento significativo del flujo de colesterol *de novo* hacia el medio de cultivo. A su vez, nuevamente los ADCH mostraron mayores niveles de ABCA-1 que los ADCM tras el tratamiento con Cu, y de forma similar una mayor liberación de colesterol marcado radiactivamente. Cabe remarcar que se sabe que las neuronas maduras del cerebro adulto son incapaces de sintetizar colesterol siendo los astrocitos los responsables de su producción, Esto hace que los resultados descritos anteriormente adquieran aún más relevancia en relación al rol de estas células gliales y su papel en la EA (Li et al. 2022; Quan et al. 2003). Por otro lado, se ha demostrado *in vitro* que el colesterol derivado de los astrocitos modula el tráfico de APP dentro y fuera de las balsas lipídicas de membrana (Avila-Muñoz & Arias 2015). Un trabajo reciente de Wang y col (2021) demostró que el aumento de la concentración de colesterol derivado de astrocitos en las neuronas aumenta la incorporación del mismo en las membranas, lo que conduce a un aumento del tamaño de las balsas lipídicas (pero no del número) y de APP dentro de estas, favoreciendo la vía de procesamiento amiloidogénico (Pfrieger 2003). Es interesante notar, que estudios previos *in vitro* demostraron que los niveles elevados de colesterol intracelular total se correlacionan con mayor colesterol en las balsas lipídicas (Cho et al. 2019; Zubillaga et al. 2022). Además, los niveles altos de colesterol en las membranas se correlacionan positivamente con la actividad β y γ -secretasa (Wahrle et al. 2002). En concordancia, nosotros reportamos previamente en un modelo *in vitro* de neuronas inmaduras, que un aumento de colesterol en las balsas lipídicas se relaciona con un aumento de APP en las mismas (Zubillaga et al. 2022), viéndose reflejado en un incremento de los niveles del péptido A β en el medio de cultivo (Zubillaga et al. 2022). En relación con esto, bibliografía previa demuestra que aumentos de A β desencadenan déficits de memoria y atrofia del hipocampo y corteza, contribuyendo posiblemente a la aparición de la EA (Djelti et al. 2015). En línea con lo mencionado, en el presente trabajo observamos niveles

más altos de colesterol y APP en balsas lipídicas de neuronas que habían sido tratadas con medio de cultivo condicionado derivado de astrocitos expuestos a una dosis subletal de Cu. Cabe destacar que las neuronas provenientes de crías hembra expuestas al medio de cultivo de ADCH tratados con Cu tienen más colesterol y APP en las balsas de membrana respecto de las neuronas provenientes de crías macho que fueron tratadas con el medio condicionado de ADCM luego del tratamiento con Cu. Varias podrían ser las razones por las que el aumento de la exportación de colesterol desde los astrocitos al medio de cultivo favorecen el aumento de colesterol en las balsas lipídicas de las neuronas. Por un lado, observamos que aumentan los niveles de ABCA-1 que está involucrado en la formación de la lipoproteína de alta densidad (HDL) (Li et al. 2013). Otra posible explicación de este fenómeno podría residir en la comunicación entre astrocitos y neuronas a través de VE. Es sabido que las VE podrían contener metales como Cu (Bellingham et al. 2015) y colesterol (Pfrieger & Vitale 2018). Estas VE son capaces de alterar el estrés oxidativo neuronal (Pfrieger & Vitale 2018). Nuestros resultados mostraron un aumento en la producción de ROS y una disminución en la viabilidad de neuronas expuestas a VE derivadas de astrocitos tratados con Cu, indicando la participación de estas VE como piezas fundamentales en la comunicación astrocito-neurona.

Como hemos mencionado anteriormente IGF-1 es una hormona peptídica que tiene un papel importante en la neurogénesis y el neurodesarrollo (O'Kusky et al. 2012). La disminución de los niveles cerebrales de IGF-1 con la edad se relaciona con el deterioro de las funciones cognitivas asociadas al envejecimiento y a otras enfermedades neurodegenerativas (Miller & Gore 2001; Calvo et al. 2013; Rivera et al. 2005; Steen et al. 2005). Selles y col caracterizaron los niveles de IGF-1 y del receptor de IGF-1 (IGF-1R) en tejido postmortem del hipocampo de pacientes con EA y controles sanos. Observaron una disminución del 60 % de la relación IGF-1 activo/inactivo en el tejido de pacientes con EA en comparación con los hipocampos de pacientes control (Selles et al. 2020). Por otra parte, este grupo también encontró que de manera similar a los hallazgos en el tejido cerebral humano, los hipocampos de ratones transgénicos APP/PS1 mostraron una tendencia a una disminución de la proporción de IGF-1 activo/inactivo (Selles et al. 2020). Por su parte, Montivero y col han demostrado que la implementación temprana de terapia génica con IGF-1 previene el estrés oxidativo y los déficits cognitivos inducidos por una lesión cerebral traumática en ratas Wistar (Montivero et al. 2021). En base a lo mencionado, consideramos al estudio de la terapia génica con IGF-1 como un abordaje sumamente relevante en nuestros cultivos de ADCH y ADCM de ratas Sprague-Dawley tratados con Cu. En este sentido, y como era de esperar, pudimos observar que el Cu indujo un aumento significativo en la generación de ROS, tanto en ADCH como en ADCM, en comparación

con los controles. Sin embargo, la administración de Cu+NAC y Cu+IGF-1 redujo significativamente la generación de ROS. Este efecto fue más pronunciado con Cu+IGF-1 demostrando que el IGF-1 actúa de forma más efectiva como protector frente a sustancias oxidantes como el Cu. Por su parte, nuestros hallazgos indican que el tratamiento con Cu aumenta significativamente la expresión de la interleucina proinflamatoria TNF- α , así como aumenta los niveles de los biomarcadores de estrés oxidativo en astrocitos, siendo estos incrementos más pronunciados en ADCH que en ADCM. La administración de Cu+NAC atenúa parcialmente estos efectos pero es la terapia génica con IGF-1 quien resulta más eficaz, mostrando reducciones mucho más significativas en los biomarcadores de estrés oxidativo y TNF- α en comparación con Cu+NAC. Estos resultados sugieren que el tratamiento con IGF-1 podría ser una estrategia más efectiva para contrarrestar los efectos perjudiciales del Cu, ofreciendo una posible vía terapéutica para mitigar el estrés oxidativo y la inflamación asociados a la enfermedad. Estos hallazgos respaldan resultados previos de Genis y col, quienes demostraron que en situaciones de estrés oxidativo, el IGF-1 desempeña una función protectora sobre los astrocitos, colaborando así en la protección neuronal (Genis et al. 2014). Además, Pérez-González y col han demostrado que el IGF-1 mejora la cognición, y disminuye tanto los niveles de A β como la activación astrogial en el cerebro en ratones APP/PS2 (Pérez-Gonzalez et al. 2006). Respecto al análisis del metabolismo del colesterol, el tratamiento Cu+NAC logró disminuir significativamente la expresión de HMGCR y SREBP-2 respecto al aumento observado con el tratamiento con Cu, aunque no de manera completa, ya que se observaron aumentos significativos en comparación con el control. En contraste, el tratamiento Cu+IGF-1 previno de manera más marcada el aumento de los niveles de SREBP-2 y HMGCR en comparación con el tratamiento Cu+NAC, sugiriendo un potencial efecto protector más robusto del IGF-1 frente a los cambios inducidos por el Cu en la síntesis del colesterol. Esto podría deberse a que IGF-1 actúa como modulador de la vía de señalización de Akt, una vía de señalización para la supervivencia celular, y esta señalización tiene efectos sobre la activación de SREBP-2 (Luu et al. 2012) o que el IGF-1 ha demostrado ser más eficaz para disminuir los niveles de ROS y, como hemos abordado previamente en este capítulo, los ROS son capaces de activar a la proteína SREBP-2 al inducir estrés de RE (Xiao et al. 2013; Kim et al. 2018; Kusnadi et al. 2019).

Finalmente, decidimos evaluar los efectos de la exposición de VE obtenidas del medio de cultivo de ADCH y ADCM luego de los tratamientos con Cu, control, Cu+NAC y Cu+IGF-1. En nuestra investigación, hallamos un aumento significativo en la generación de ROS en neuronas tratadas con VE provenientes de astrocitos tratados con Cu, siendo más pronunciado en VE derivadas de ADCH respecto de VE derivadas de

ADCM. La exposición a VE de astrocitos tratados con Cu+NAC o con Cu+IGF-1 resultó en una disminución significativa de la generación de ROS, siendo este efecto más marcado con IGF-1, sugiriendo su mayor eficacia en contrarrestar la formación de ROS en comparación con NAC. Además, evaluamos la viabilidad celular y observamos una significativa reducción en la viabilidad neuronal al tratar los cultivos con VE de astrocitos tratados con Cu. Sin embargo, la exposición a VE de Cu+NAC o IGF-1+Cu condujo a una disminución significativa en la muerte celular por apoptosis en comparación con las VE de astrocitos tratados solo con Cu, siendo la reducción de esta muerte más pronunciada con IGF-1. Aunque la viabilidad se mantuvo alta con Cu+NAC y con Cu+IGF-1, observamos que no se obtuvo una viabilidad similar al control. Las diferencias en la viabilidad neuronal entre cultivos de neuronas derivados de crías machos y hembras solo fueron significativas en el tratamiento con Cu, mientras que los demás tratamientos no mostraron variaciones sustanciales. Estos resultados resaltan la capacidad del IGF-1 para mitigar el estrés oxidativo y preservar la viabilidad neuronal en comparación con NAC en el contexto de la exposición al Cu. Como hemos mencionado con anterioridad, en el SNC el IGF-1 se une a su receptor para activar principalmente la vía PI3-quinasa/Akt (Brywe et al. 2005; Ye et al. 2010) que ha sido relacionada con una mayor supervivencia neuronal después de una lesión cerebral traumática en roedores (Noshita et al. 2002). Esta mayor supervivencia neuronal es favorecida las ADEV que parecieran ejercer un efecto protector. En este sentido, trabajos previos han demostrado que los astrocitos pueden apoyar a las neuronas en respuesta al estrés oxidativo permitiendo su desintoxicación (Fernandez-Fernandez et al. 2012). Entre las diferentes defensas antioxidantes proporcionadas por los astrocitos a las neuronas, ahora encontramos que el IGF-1, que no puede proteger a las neuronas aisladas contra el exceso de ROS (Dávila & Torres-Aleman 2008) coopera con este punto, activando en los astrocitos un fenotipo antiinflamatorio para apoyar a las neuronas y reducir tanto el estrés oxidativo como la muerte por apoptosis que se observa en los cultivos neuronales tratados con las VE provenientes de astrocitos expuestos solo a Cu.

Considerando los resultados obtenidos previamente en astrocitos derivados de ratas Sprague-Dawley, investigamos los efectos de la sobrecarga subletal de Cu en astrocitos obtenidos de ratones transgénicos APP/PS1, ampliamente reconocidos como modelo relevante para el estudio de la EA (Borchelt et al. 1997; Hall & Roberson, 2012). Observamos que los astrocitos provenientes de ratones APP/PS1 tratados con Cu eran más susceptibles a la producción de ROS en comparación con los astrocitos de ratones WT con el mismo tratamiento. En concordancia Hsieh y col demostraron que las ROS aumentan significativamente en el cerebro del ratón APP/PS1 en comparación con los controles WT de la misma edad

utilizando un marcador de ROS durante el curso de la EA y que existe una correlación con la carga de A β en la corteza (Hsieh et al. 2022). Además, observaron que la producción de ROS es mayor, y ocurre antes, en ratones hembra APP/PS1. Por otra parte, como he comentado anteriormente, el Cu puede generar ROS a través de las reacciones químicas de Fenton y Haber-Weiss o disminuyendo las concentraciones de GSH (Jomova & Valko, 2011), a la vez que puede unirse a A β , generando reacciones de tipo redox (Hashim et al. 2011). Nuestros resultados muestran una diferencia significativa en la producción de ROS entre los cultivos de astrocitos WT tratados con Cu y los cultivos de astrocitos derivados de ratones APP/PS1 sin exposición a Cu (control), siendo mayor en estos últimos. Este hallazgo sugiere que nuestro tratamiento con Cu tiene un impacto más notable junto con A β , proporcionando indicios de su mayor impacto en la producción de ROS en presencia de A β que estando solo. Es interesante notar que el agregado de GSH junto con Cu (Cu+GSH) redujo significativamente la producción de ROS en comparación con el tratamiento de Cu solo. Sin embargo, los astrocitos APP/PS1 continuaron mostrando una mayor producción de ROS en comparación con los WT. Se sabe que el GSH funciona no sólo como reductor intracelular y eliminador de radicales, sino que también puede servir como ligando para cationes de metales de transición (Cao et al. 2003). La formación de complejos con iones de Cu es de particular interés ya que el GSH juega un papel crítico en la homeostasis celular de este metal. Por otro lado, la incubación con Cu y un antioxidante mitocondrial (mitoQ) igualó los niveles de producción de ROS entre APP/PS1 y WT, lo que sugiere que el estrés mitocondrial estaría contribuyendo sustancialmente a la producción de ROS en los astrocitos APP/PS1.

Por otro lado, bibliografía previa muestra que los pacientes con enfermedades neurodegenerativas, como la EA, poseen aumentados diferentes marcadores UPR como p-eIF2 α , BIP/GRP78 y CHOP (García-González et al. 2018). La evidencia previa sugiere que los mediadores de la UPR están directamente involucrados en la fisiopatología de los trastornos del plegamiento incorrecto de proteínas (PMD) (Sweeney et al. 2017). Curiosamente, en los cerebros de los pacientes afectados con PMD, los marcadores de estrés del RE a menudo se localizan con agregados de proteínas (Hughes & Mallucci 2019; Cabral-Miranda & Hetz 2017). En concordancia con esto, pudimos observar aumentos significativos en los niveles de BIP/GRP78 en los astrocitos derivados de ratones tanto WT como APP/PS1 luego del tratamiento con Cu. Esto indicaría que existe una respuesta al estrés de RE y una activación de la vía UPR. La incubación con Cu+GSH redujo los niveles de BIP/GRP78, sugiriendo una posible mitigación del estrés de RE con la adición del antioxidante. La fosforilación de eIF2- α también aumentó en los astrocitos derivados de ratones WT y

APP/PS1 tratados con Cu, apoyando la hipótesis de que el Cu induce estrés de RE. Esta respuesta fue más pronunciada en los astrocitos derivados de ratones APP/PS1 en comparación con los derivados de ratones WT. Finalmente, un comportamiento similar se pudo observar respecto a los niveles de la proteína CHOP, en donde nuevamente se evidenciaron mayores niveles de la misma en los astrocitos derivados de ratones APP/PS1 en comparación con los derivados de ratones WT. Como hemos mencionado anteriormente, varias formas de estrés celular activan SREBP-2, incluido el estrés de RE (Xiao et al. 2013; Kim et al. 2018; Kusnadi et al. 2019). En consistencia con esto, se observaron cambios significativos en los niveles de colesterol en respuesta al tratamiento con Cu. Los niveles de colesterol total y mitocondrial aumentaron tras el tratamiento de Cu, siendo este aumento más pronunciado en los astrocitos derivados de ratones APP/PS1 en comparación con los derivados de ratones WT. Esto puede explicarse, en parte, gracias al aumento de la expresión de las enzimas relacionadas con la síntesis y transporte del colesterol, que fue mayor en los ratones transgénicos en comparación con los WT, probablemente debido a la presencia de mayores niveles de ROS en los astrocitos derivados de ratones APP/PS1 respecto a los WT. Sumado a esto, Barbero-Camps y col demostraron que ratones triple transgénicos APP/PS1/SREBP-2, que presentaban una sobreexpresión de SREBP-2 similar a la que observamos en nuestros astrocitos APP/PS1 cuando son tratados con Cu, tenían un aumento en los niveles de colesterol celular y mitocondrial (Barbero-Camps et al. 2014). A su vez, observaron que el daño oxidativo cerebral y la neuroinflamación empeoraba con la edad (Barbero-Camps et al. 2014). Además este grupo describió que el estrés del RE promueve la síntesis de colesterol y la entrada de colesterol mitocondrial, lo que resulta en el agotamiento del mGSH en ratones APP/PS1 (Barbero-Camps et al. 2014). Nuestros resultados apoyan estos datos, ya que observamos una disminución significativa en los niveles de mGSH luego del tratamiento con Cu, tanto en ratones WT como APP/PS1. Es importante destacar que la disminución en mGSH fue considerablemente más marcada en los ratones APP/PS1 respecto a los WT. El vínculo entre estos eventos, es decir, el aumento del colesterol y el agotamiento de mGSH, se debe a la sensibilidad de transportadores de mGSH a los cambios en la fluidez de las membranas mitocondriales inducidos por la acumulación de colesterol (Mari et al. 2009). Nuestros hallazgos plantean la posibilidad de una conexión entre el estrés en el RE, la regulación del colesterol y la generación de ROS en el contexto de EA, como ya fue previamente mencionado por Barbero-Camps y col en 2014.

En relación a los resultados obtenidos en la línea establecida de microglia SIMA-9 nos ha permitido dilucidar posibles mecanismos de los efectos de la exposición al Cu de estas células gliales.

Algunos autores han descrito previamente un vínculo entre el aumento de Cu intracelular y la neurotoxicidad inducida por A β (Atwood et al., 2004; Cheignon et al., 2018). Nuestros resultados indican claramente que la combinación de Cu y A β conduce a un incremento gradual y significativo en la generación de ROS en la microglía. Este hallazgo sugiere una cooperación entre Cu y A β en la promoción del estrés oxidativo. Nuestros resultados que indican que la prevención del estrés oxidativo es alcanzada tanto por el GSH como por agentes antioxidantes dirigidos específicamente a las mitocondrias (MitoTEMPO y MitoQ), resaltan la contribución activa y crucial de esta organela en la generación y propagación de estrés oxidativo, provocado por la combinación de Cu y A β . Como ya he mencionado al discutir los resultados obtenidos en astrocitos, una observación interesante durante el tratamiento con Cu es la disminución notable en los niveles de mGSH, un componente esencial en la defensa antioxidante de las células (Jomova & Valko, 2011). Se sabe que el Cu elevado promueve la formación de ROS y sus efectos citotóxicos al reducir el nivel de GSH (Jomova & Valko, 2011). La razón probable de la reducción tras la exposición al Cu puede estar relacionada con la interacción entre Cu y GSH, que forma un complejo Cu(I)-[GSH] que logra disminuir los niveles de ROS (Speisky et al., 2009). Se destaca que el tratamiento con éster de GSH logró mantener parcialmente los niveles de mGSH en las células expuestas al Cu. Esta observación sugiere que el GSH podría poseer un efecto protector contra el estrés oxidativo inducido por Cu y A β . Por otro lado, también pudimos observar una clara activación de las células SIMA-9 después del tratamiento con Cu. Esta activación se caracterizó por una disminución en la capacidad fagocítica de estas células, acompañada por una regulación a la baja de los niveles del ARNm *trem2* y una regulación al alza de *ApoE*. Llamativamente, el tratamiento con Cu provocó una disminución significativa en la fagocitosis de microesferas fluorescentes, lo que sugiere un impacto negativo del Cu, y el estrés oxidativo generado por el mismo, en la capacidad de las células para eliminar partículas extracelulares. Es sabido que bajo la influencia de un microambiente proinflamatorio la microglía activada se polariza en un fenotipo inflamatorio M1 (Calvello et al., 2017) que produce mediadores proinflamatorios contribuyendo a la inflamación del tejido (Tang et al., 2018). Por otra parte, las células microgliales activadas con fenotipo M2 provocan fuertemente la fagocitosis de los desechos, previniendo respuestas inflamatorias secundarias y promoviendo la regeneración de tejidos (Xia et al., 2015). Esto nos hace pensar que el Cu tiene la capacidad de activar a la microglía hacia un fenotipo M1 proinflamatorio. Esta idea encuentra respaldo en el hallazgo de Yu y col., quienes observaron que el Cu (II) potencia el efecto de A β en la activación de la microglía y la consecuente

neurotoxicidad. La activación microglial desencadenada por Cu (II) -A β implica la activación de NF- κ B y la producción de ROS mitocondrial (Yu et al. 2015).

Finalmente, pudimos observar que al tratamiento con Cu (100 μ M) aumentó la expresión de las proteínas NLRP3, IL-1 β , pro-caspasa-1 y caspasa-1 activa, lo que sugiere la posible activación y participación del inflamasoma. Esto adquiere relevancia si consideramos que trabajos previos han demostrado que la activación del inflamasoma NLRP3 contribuye a la progresión de la patología al disminuir la capacidad fagocítica de la microglía (Heneka et al. 2013; Halle et al. 2008). Para evaluar el ensamblaje y la activación del inflamasoma, empleamos oligómeros de la proteína ASC como marcadores. La distribución observada de estos agregados cerca del núcleo en las células tratadas con Cu y la combinación de Cu+A β es indicativa de la presencia de inflamasomas, lo que refuerza aún más la noción de que el inflamasoma puede estar activado en respuesta a la exposición a Cu y Cu+A β . En concordancia con nuestros resultados y con la literatura previa, podemos inferir que la activación del inflamasoma podría deberse a los aumentos en los niveles de ROS (Cruz et al. 2007). Específicamente serían las ROS mitocondriales (mtROS) las que tendrían un papel importante en la activación de NLRP3 (Cruz et al. 2007). Esto se propuso originalmente a partir de un estudio que mostraba que las mtROS, generadas por la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial, pueden activar el inflamasoma NLRP3 (Zhou et al. 2011b). De manera similar, Nakahira y col descubrieron que se requiere mtROS generadas a partir de mitocondrias disfuncionales para la activación del inflamasoma NLRP3 en respuesta a LPS y ATP, y que el ADN mitocondrial (mtDNA) se libera en el citosol de manera dependiente tanto de NLRP3 como de mtROS (Nakahira et al. 2011). Por otra parte, Deigendesch y col demostraron que el Cu es específicamente necesario para la activación del inflamasoma en macrófagos, ya que el agotamiento del Cu biodisponible da como resultado una inflamación atenuada dependiente de caspasa-1 y una susceptibilidad reducida al shock séptico inducido por LPS (Deigendesch et al. 2018). Asimismo, otro grupo de investigación observó una activación del inflamasoma NLRP3 en células de la microglía primaria murina tratada con CuCl₂, acompañada por niveles elevados de caspasa-1 escindida, ASC e interleucina-1 β (Dong et al. 2021). Por último, resultó notorio que el agregado de GSH previno el efecto inductor de NLRP3 favorecido por el Cu, sugiriendo un papel clave del estrés oxidativo en este proceso apoyando la hipótesis de que el estrés oxidativo también juega un rol importante en la activación del inflamasoma. Cabe destacar que la activación vía NLRP3 se potenció considerablemente cuando se combinó el Cu con A β , sugiriendo una sinergia positiva para la activación del inflamasoma vía NLRP3, entre ambos compuestos. Esto puede deberse a que el NLRP3 se activa no sólo por A β sino

también por agregados fibrilares de A β (Friker et al. 2020). Por otro lado, es interesante destacar que la activación del inflamasoma NLRP3 puede reducir la fagocitosis de A β por parte de la microglía, aumentando así la deposición de A β y promoviendo la aparición y desarrollo de lesiones de EA (Lučiūnaitė et al. 2020), algo que se condice con los resultados presentados en esta tesis.



CONCLUSIONES

6. Conclusiones

- En esta tesis demostramos por primera vez que **los ADCH son más susceptibles a la generación de ROS inducida por el Cu.**
- Hemos demostrado **que el Cu no sólo aumenta la expresión de SREBP-2 sino también de HMGCR, promoviendo la síntesis de colesterol *de novo* y su liberación al espacio extracelular,** presentando una **respuesta diferencial ligada al sexo** en células en cultivo.
- Nuestros resultados muestran que **el tratamiento con Cu conlleva a un aumento significativo en los niveles de expresión de GFAP, siendo este aumento más pronunciado en los cultivos de ADCH respecto de los cultivos de ADCM,** demostrando un **efecto sexo dependiente del Cu sobre la reactividad astrocitaria.**
- Nuestros hallazgos sugieren que **tanto los medios condicionados como las VE derivadas de astrocitos tratados con Cu afectan los niveles de ROS neuronales, así como la distribución de APP en las balsas lipídicas de membranas neuronales,** lo que **podría favorecer la vía amiloidogénica y el consecuente aumento de A β .**
- La **terapia génica con IGF-1 muestra gran efectividad en la reducción de estrés oxidativo y la inflamación asociados al tratamiento con Cu,** demostrando ser una estrategia **más eficaz que el tratamiento con NAC** en modelos de cultivos de astrocitos y neuronas tratadas con ADEV.
- La **terapia génica con IGF-1 muestra un efecto protector ante el aumento de la síntesis de colesterol en presencia de Cu,** con reducciones más marcadas en los niveles de SREBP-2 y HMGCR.
- El **IGF-1 actúa como un potente protector neuronal, preservando la viabilidad celular y mitigando el estrés oxidativo** inducido por Cu.

- Nuestra investigación demostró que **los astrocitos provenientes de los ratones transgénicos APP/PS1 eran más susceptibles a producir ROS que los WT cuando se trataban con Cu.**
- Los datos obtenidos en este trabajo de tesis, muestran que el **tratamiento con Cu aumenta tanto los niveles de ARNm de *Sreb-2*, *Hmgcr* y *Ldlr*, como los niveles de dichas proteínas, siendo mayores en los cultivos de APP/PS1 respecto de los WT.**
- Se observó un **incremento significativo en proteínas de la vía UPR** relacionada con el estrés de RE, **estableciendo una relación entre el tratamiento con Cu, la generación de estrés de RE y la activación de SREBP-2, y posterior regulación positiva del colesterol, en un modelo de EA.**
- El incremento de estrés de RE estuvo acompañado por **un aumento en los niveles de colesterol total y mitocondrial y una mayor expresión del transportador de colesterol ABCA-1, considerablemente más marcados en los cultivos de ratones APP/PS1 en comparación con los ratones WT.**
- Hemos demostrado que **los antioxidantes dirigidos a la mitocondria son capaces de restaurar no sólo los niveles de ROS sino también los niveles de colesterol mitocondrial y de mGSH en los astrocitos APP/PS1 y WT.**
- En nuestro trabajo hemos determinado que **el Cu y la combinación de Cu+A β conllevan a un incremento gradual y significativo en la generación de ROS en la microglía murina.**
- La exposición al **Cu provoca una activación microglial**, evidenciada por la **sobreexpresión de Iba-1, y una reducción en la capacidad fagocítica de estas células**, acompañada por una **regulación a la baja en los niveles de ARNm de *Trem2* y una regulación a la alta de *ApoE*.**
- Revelamos que **el Cu induce la activación del inflammasoma con una expresión elevada de las proteínas IL-1 β y Nlrp3, una mayor actividad de Caspasa-1, y una distribución en forma de agregados de la proteína ASC, que se correlaciona con una activación del**

inflammasoma vía NLRP3. Esta activación del inflammasoma se ve **potenciada por la presencia de Cu+A β .** Por otro lado, **el tratamiento con GSH previno parcialmente el efecto inductor del Cu, señalando la relevancia clave del estrés oxidativo en este proceso.**

En resumen, en esta tesis doctoral se han hallado distintos mecanismos moleculares que podrían explicar los motivos por los que una sobrecarga de Cu podría favorecer el desarrollo de EA. Específicamente, **esta tesis proporciona evidencia sólida de que el Cu induce estrés oxidativo en astrocitos,** afectando la homeostasis del colesterol y promoviendo la inflamación. Estos efectos son más pronunciados en las células de ADCH y en astrocitos de modelos de ratones transgénicos de EA (APP/PS1). Además, hemos observado cómo **los astrocitos tratados con Cu pueden reducir la viabilidad de cultivos primarios de neuronas y aumentar no solo los niveles de ROS sino también los de APP y colesterol en balsas lipídicas neuronales,** indicando una posible vía amiloidogénica.

Finalmente, se destaca cómo **la activación microglial murina, impulsada por el Cu, puede contribuir tanto a la neuroinflamación activando el inflammasoma, como al depósito amiloide disminuyendo la fagocitosis microglial.** Toda esta evidencia subraya la relevancia de las interacciones entre astrocitos, microglía y neuronas en la patología de la EA.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abad-Rodríguez, J., Ledesma, M. D., Craessaerts, K., Perga, S., Medina, M., Delacourte, A., Dingwall, C., De Strooper, B., & Dotti, C. G. (2004). Neuronal membrane cholesterol loss enhances amyloid peptide generation. *The Journal of cell biology*, *167*(5), 953–960.
- Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, *7*(1), 41–53.
- Aizenstein, H. J., Nebes, R. D., Saxton, J. A., Price, J. C., Mathis, C. A., Tsopelas, N. D., Ziolkowski, S. K., James, J. A., Snitz, B. E., Houck, P. R., Bi, W., Cohen, A. D., Lopresti, B. J., DeKosky, S. T., Halligan, E. M., & Klunk, W. E. (2008). Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. *Archives of neurology*, *65*(11), 1509–1517.
- Al-Hilaly, Y. K., Foster, B. E., Biasetti, L., Lutterotti, A., & De Luigi, A. (2013). A central role for dityrosine crosslinking of Amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, *1*(1), 83.
- Allen, N. J., Bennett, M. L., Foo, L. C., Wang, G. X., Chakraborty, C., Smith, S. J., & Barres, B. A. (2012). Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AMPA receptors. *Nature*, *486*(7403), 410–414.
- Alzheimer A. Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozeß der Hirnrinde. *Neurol Central*. 1906; *25* :1134.
- Anchisi, L., Dessi, S., Pani, A., & Mandas, A. (2012). Cholesterol homeostasis: A key to prevent or slow down neurodegeneration. *Frontiers in Physiology*, *3*, 486.
- Arias, C., Zepeda, A., Hernández-Ortega, K., Leal-Galicia, P., Lojero, C., & Camacho-Arroyo, I. (2009). Sex and estrous cycle-dependent differences in glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the adult rat hippocampus. *Hormones and behavior*, *55*(1), 257–263.
- Arnal, N., Astiz, M., de Alaniz, M. J., & Marra, C. A. (2011). Clinical parameters and biomarkers of oxidative stress in agricultural workers who applied copper-based pesticides. *Ecotoxicology and environmental safety*, *74*(6), 1779–1786.
- Arnal, N., Cristalli, D. O., de Alaniz, M. J., & Marra, C. A. (2010a). Clinical utility of copper, ceruloplasmin, and metallothionein plasma determinations in human neurodegenerative patients and their first-degree relatives. *Brain Research*, *1319*, 118–130.
- Arnal, N., de Alaniz, M. J., & Marra, C. A. (2011). Carnosine and neocuproine as neutralizing agents for copper overload-induced damages in cultured human cells. *Chemico-biological interactions*, *192*(3), 257–263.
- Arnal, N., Tacconi de Alaniz, M. J., & Marra, C. A. (2010b). Alterations in copper homeostasis and oxidative stress biomarkers in women using the intrauterine device Tcu380A. *Toxicology Letters*, *192*, 373–378.
- Argaw, A. T., Asp, L., Zhang, J., Navrazhina, K., Pham, T., Mariani, J. N., Mahase, S., Dutta, D. J., Seto, J., Kramer, E. G., Ferrara, N., Sofroniew, M. V., & John, G. R. (2012). Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *The Journal of Clinical Investigation*, *122*(7), 2454–2468.
- Argaw, A. T., Zhang, Y., Snyder, B. J., Zhao, M. L., Kopp, N., Lee, S. C., Raine, C. S., Brosnan, C. F., & John, G. R. (2006). IL-1beta regulates blood-brain barrier permeability via reactivation of the hypoxia-angiogenesis program. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *177*(8), 5574–5584.
- Atagi, Y., Liu, C. C., Painter, M. M., Chen, X. F., Verbeeck, C., Zheng, H., ... & Li, L. (2015). Apolipoprotein E is a ligand for triggering receptors expressed on myeloid cells 2 (TREM2). *Journal of Biological Chemistry*, *290*(43), 26043–26050.
- Atwood, C. S., Scarpa, R. C., Huang, X., Moir, R. D., Jones, W. D., Fairlie, D. P., Tanzi, R. E., & Bush, A. I. (2004). Copper mediates dityrosine cross-linking of Alzheimer's amyloid-beta. *Biochemistry*, *43*(2), 560–568.
- Avila-Muñoz, E., & Arias, C. (2015). Cholesterol-induced astrocyte activation is associated with increased amyloid precursor protein expression and processing. *Glia*, *63*(11), 2010–2022.
- Bachiller, S., Jiménez-Ferrer, I., Paulus, A., Yang, Y., Swanberg, M., Deierborg, T., & Boza-Serrano, A. (2018). Microglia in Neurological Diseases: A Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response. *Frontiers in cellular neuroscience*, *12*, 488.

- Bailey, C. C., DeVaux, L. B., & Farzan, M. (2015). The Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2 Binds Apolipoprotein E. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(43), 26033–26042.
- Bales, K. R., Verina, T., Cummins, D. J., Du, Y., Dodel, R. C., Saura, J., ... & Paul, S. M. (1997). Apolipoprotein E is essential for amyloid deposition in the APP(V717F) transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(6), 15233–15238.
- Bales, K. R., Verina, T., Dodel, R. C., Du, Y., Altstiel, L., Bender, M., ... & Paul, S. M. (1999). Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid β -peptide deposition. *Nature Genetics*, 17(3), 263–264.
- Barbero-Camps, E., Fernández, A., Baulies, A., Martínez, L., Fernández-Checa, J. C., & Colell, A. (2014). Endoplasmic reticulum stress mediates amyloid β neurotoxicity via mitochondrial cholesterol trafficking. *The American journal of pathology*, 184(7), 2066–2081.
- Barnham, K. J., Masters, C. L., & Bush, A. I. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature reviews. Drug discovery*, 3(3), 205–214.
- Barteneva, N. S., Maltsev, N., & Vorobjev, I. A. (2013). Microvesicles and intercellular communication in the context of parasitism. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, 49.
- Bavarsad, K., Barreto, G. E., Hadjzadeh, M. A., Sahebkar, A., & Majeed, M. (2014). N-acetylcysteine: A potential therapeutic agent against oxidative stress, apoptosis and neurodegeneration. *Current Medicinal Chemistry*, 21(32), 3646–3651.
- Bellini, M. J., Hereñú, C. B., Goya, R. G., & Garcia-Segura, L. M. (2011). Insulin-like growth factor-I gene delivery to astrocytes reduces their inflammatory response to lipopolysaccharide. *Journal of neuroinflammation*, 8, 21.
- Bellingham, S. A., Guo, B., & Hill, A. F. (2015). The secret life of extracellular vesicles in metal homeostasis and neurodegeneration. *Biology of the cell*, 107(11), 389–418.
- Bianco, F., Perrotta, C., Novellino, L., Francolini, M., Riganti, L., Menna, E., ... & Verderio, C. (2009). Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells. *EMBO Journal*, 28, 1043–1054.
- Bien-Ly, N., Gillespie, A. K., Walker, D., Yoon, S. Y., & Huang, Y. (2012). Reducing human apolipoprotein E levels attenuates age-dependent A β accumulation in mutant human amyloid precursor protein transgenic mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(14), 4803–4811.
- Bisht, K., Sharma, K., & Tremblay, M. È. (2018). Chronic stress as a risk factor for Alzheimer's disease: Roles of microglia-mediated synaptic remodeling, inflammation, and oxidative stress. *Neurobiology of stress*, 9, 9–21.
- Block, M. L., Zecca, L., & Hong, J. S. (2007). Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(1), 57–69.
- Blockhuys, S., & Wittung-Stafshede, P. (2017). Roles of Copper-Binding Proteins in Breast Cancer. *International journal of molecular sciences*, 18(4), 871.
- Boekhoorn, K., Joels, M., & Lucassen, P. J. (2006). Increased proliferation reflects glial and vascular-associated changes, but not neurogenesis in the presenile Alzheimer hippocampus. *Neurobiology of disease*, 24(1), 1–14.
- Bogdanovic, N., Bretillon, L., Lund, E. G., Diczfalusy, U., Lannfelt, L., Winblad, B., Russell, D. W., & Björkhem, I. (2001). On the turnover of brain cholesterol in patients with Alzheimer's disease. Abnormal induction of the cholesterol-catabolic enzyme CYP46 in glial cells. *Neuroscience letters*, 314(1–2), 45–48.
- Boller, F., & Duyckaerts, C. (1997). Alzheimer disease: clinical and anatomical aspects. En T. E. Feinberg & M. J. Farah (Eds.), *Behavioral neurology and neuropsychology* (pp. 637–660). New York: McGraw-Hill.
- Borchelt, D. R., Ratovitski, T., van Lare, J., Lee, M. K., Gonzales, V., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Price, D. L., & Sisodia, S. S. (1997). Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins. *Neuron*, 19(4), 939–945.
- Bouvier, D. S., Jones, E. V., Quesseveur, G., Davoli, M. A., & Hermans, E. (2016). Astrocytic β 2-adrenergic receptors mediate hippocampal long-term memory consolidation. *Molecular psychiatry*, 21(4), 514–522.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*;72: 248–54.

- Breese, C. R., D'Costa, A., Rollins, Y. D., Adams, C., Booze, R. M., Sonntag, W. E., & Leonard, S. (1996). Expression of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-binding protein 2 (IGF-BP2) in the hippocampus following cytotoxic lesion of the dentate gyrus. *The Journal of comparative neurology*, *369*(3), 388–404.
- Brecht, W. J., Harris, F. M., Chang, S., Tesseur, I., Yu, G.-Q., Xu, Q., & Mahley, R. W. (2004). ABCA-1 deficiency in mice causes an upregulation of apoE in the retina. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(18), 20396–20406.
- Brewer, G. J. (2008). The risks of free copper in the body and the development of useful anticopper drugs. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, *11*(6), 727–732.
- Brewer, G. J. (2011). Issues raised involving the copper hypotheses in the causation of Alzheimer's disease. *International journal of Alzheimer's disease*, *2011*, 537528.
- Brooker, G. J., Kalloniatis, M., Russo, V. C., Murphy, M., Werther, G. A., & Bartlett, P. F. (2000). Endogenous IGF-1 regulates the neuronal differentiation of adult stem cells. *Journal of neuroscience research*, *59*(3), 332–341.
- Brown, M. S., Ye, J., Rawson, R. B., & Goldstein, J. L. (2000). Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell*, *100*(4), 391–398.
- Brywe, K. G., Mallard, C., Gustavsson, M., Hedtjärn, M., Leverin, A. L., Wang, X., Blomgren, K., Isgaard, J., & Hagberg, H. (2005). IGF-1 neuroprotection in the immature brain after hypoxia-ischemia, involvement of Akt and GSK3beta?. *The European journal of neuroscience*, *21*(6), 1489–1502.
- Buchanan, S. D., Diseker, R. A. 3rd, Sinks, T., Olson, D. R., Daniel, J., & Flodman, T. (1999). Copper in drinking water, Nebraska, 1994. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, *5*(4), 256–261.
- Bucossi, S., Polimanti, R., Mariani, S., Ventriglia, M., & Bonvicini, C. (2011). Copper in Alzheimer's disease: A meta-analysis of serum, plasma, and cerebrospinal fluid studies. *Journal of Alzheimer's Disease*, *24*(1), 175–185.
- Burdo, J. R., Menzies, S. L., Simpson, I. A., Garrick, L. M., Garrick, M. D., Dolan, K. G., Haile, D. J., Beard, J. L., & Connor, J. R. (2001). Distribution of divalent metal transporter 1 and metal transport protein 1 in the normal and Belgrade rat. *Journal of neuroscience research*, *66*(6), 1198–1207.
- Bush, A. I., Masters, C. L., & Tanzi, R. E. (2003). Copper, beta-amyloid, and Alzheimer's disease: tapping a sensitive connection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(20), 11193–11194.
- Butterfield, D. A., Bader Lange, M. L., & Sultana, R. (2010). Involvements of the lipid peroxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta*, *1801*(8), 924–929.
- Butterfield, D. A., Castegna, A., Lauderback, C. M., & Drake, J. (2002). Evidence that amyloid beta-peptide-induced lipid peroxidation and its sequelae in Alzheimer's disease brain contribute to neuronal death. *Neurobiology of aging*, *23*(5), 655–664.
- Cabezas, R., Avila, M., Gonzalez, J., El-Bachá, R. S., Báez, E., García-Segura, L. M., Jurado Coronel, J. C., Capani, F., Cardona-Gomez, G. P., & Barreto, G. E. (2014). Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, *8*, 211.
- Cabral-Miranda F & Hetz C (2017). ER stress in neurodegenerative disease: From disease mechanisms to therapeutic interventions. *Endoplasmic Reticulum Stress Dis.*;4:11–26.
- Calvello, R., Cianciulli, A., Nicolardi, G., De Nuccio, F., Giannotti, L., Salvatore, R., Porro, C., Trotta, T., Panaro, M. A., & Lofrumento, D. D. (2017). Vitamin D Treatment Attenuates Neuroinflammation and Dopaminergic Neurodegeneration in an Animal Model of Parkinson's Disease, Shifting M1 to M2 Microglia Responses. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, *12*(2), 327–339.
- Calvo, D., Gunstad, J., Miller, L. A., Glickman, E., & Spitznagel, M. B. (2013). Higher serum insulin-like growth factor-1 is associated with better cognitive performance in persons with mild cognitive impairment. *Psychogeriatrics : the official journal of the Japanese Psychogeriatric Society*, *13*(3), 170–174.
- Cao, X., & Südhof, T. C. (2001). A transcriptionally [correction of transcriptively] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60. *Science (New York, N.Y.)*, *293*(5527), 115–120.
- Cao, Z., Hardej, D., Trombetta, L. D., & Li, Y. (2003). The role of chemically induced glutathione and glutathione S-transferase in protecting against 4-hydroxy-2-nonenal-mediated cytotoxicity in vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular toxicology*, *3*(2), 165–177.
- Carroll, J. C., Rosario, E. R., Kreimer, S., Villamagna, A., & Gentschein, E. (2010). Sex differences in β -amyloid accumulation in 3xTg-AD mice: role of neonatal sex steroid hormone exposure. *Brain Research*, *1366*, 233–245.

- Chacon-Quintero, M. V., Wu, H. Y., Molofsky, A. V., & Escala, W. L. (2021). Genomic stability of human induced pluripotent stem cells in neural differentiation. *Stem Cell Reports*, 16(2), 416-429.
- Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, Faller P, Hureau C, Collin F (2018). Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biol.*;14:450-464.
- Chen, P., Chakraborty, S., Mukhopadhyay, S., Lee, E., Paoliello, M. M., Bowman, A. B., & Aschner, M. (2020a). Manganese and copper toxicity in neuroblastoma cells: evidence for involvement of oxidative stress and lipid signaling. *Neurotoxicology*, 77, 14-24.
- Chen, W. T., Liao, Y. H., Yu, H. M., Cheng, I. H., & Chen, Y. R. (2011). Distinct effects of Zn²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, and Al³⁺ on amyloid-beta stability, oligomerization, and aggregation: amyloid-beta destabilization promotes annular protofibril formation. *The Journal of biological chemistry*, 286(11), 9646-9656.
- Chen, Y., Ai, Y., Slevin, J. R., Maley, B. E., Gash, D. M., & Proeschel, C. (2020b). Increased Oxidative Stress and Astrocyte Alterations in the Transgenic Mouse Model Expressing Human α -Synuclein: Implications for Parkinson's Disease. *Neurochemical Research*, 45(11), 2693-2707.
- Chen, Y., Yin, M., Cao, X., Hu, G., & Xiao, M. (2018). Pro- and Anti-inflammatory Effects of High Cholesterol Diet on Aged Brain. *Aging and disease*, 9(3), 374-390.
- Chene, G., Beiser, A., Au, R., Preis, S. R., Wolf, P. A., Dufouil, C., & Seshadri, S. (2015). Gender and incidence of dementia in the Framingham Heart Study from mid-adult life. *Alzheimer's & Dementia*, 11(3), 310-320.
- Cherny, R. A., Atwood, C. S., Xilinas, M. E., Gray, D. N., Jones, W. D., McLean, C. A., ... Bush, A. I. (2001). Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits β -amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron*, 30(3), 665-676.
- Cherry, J. D., Olschowka, J. A., & O'Banion, M. K. (2014). Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *Journal of Neuroinflammation*, 11(1), 98.
- Chi, E. Y., Ege, C., Winans, A., Majewski, J., Wu, G., Kjaer, K., & Lee, K. Y. (2008). Lipid membrane templates the ordering and induces the fibrillogenesis of Alzheimer's disease amyloid-beta peptide. *Proteins*, 72(1), 1-24.
- Chistyakov, D.V., Astakhova, A.A., Sergeeva, M.G., & Chistyakov, V.V. (2018). Sex differences in the responses of astrocytes to immune stimuli. *Molecular Neurobiology*, 55(2), 1566-1578.
- Cho, Y. Y., Kwon, O. H., Park, M. K., Kim, T. W., & Chung, S. (2019). Elevated cellular cholesterol in Familial Alzheimer's presenilin 1 mutation is associated with lipid raft localization of β -amyloid precursor protein. *PLoS one*, 14(1), e0210535.
- Choi, S. S., Lee, H. J., Lim, I., Satoh, J., & Kim, S. U. (2014). Human astrocytes: secretome profiles of cytokines and chemokines. *PLoS one*, 9(4), e92325.
- Choo XY, Alukaidey L, White AR, Grubman A. (2013). Neuroinflammation and copper in Alzheimer's disease. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2013, 145345.
- Chung, W. S., Allen, N. J., & Eroglu, C. (2015). Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(9), a020370.
- Ciesielska, A., Matyjek, M., Kwiatkowska, K., & Sobota, A. (2021). Mechanisms of cholesterol-dependent and cholesterol-independent effects of cholesterol-binding proteins in membrane domains. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78(2), 393-413.
- Circu, M. L., & Aw, T. Y. (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free radical biology & medicine*, 48(6), 749-762.
- Cobine, P. A., Pierrel, F., & Winge, D. R. (2006). Copper trafficking to the mitochondrion and assembly of copper metalloenzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763, 759-772.
- Cohn, W., Melnik, M., Huang, C., Teter, B., Chandra, S., Zhu, C., McIntire, L. B., John, V., Gylys, K. H., & Bilousova, T. (2021). Multi-Omics Analysis of Microglial Extracellular Vesicles From Human Alzheimer's Disease Brain Tissue Reveals Disease-Associated Signatures. *Frontiers in pharmacology*, 12, 766082.
- Colombo, E., Di Dario, M., Capitolo, E., Chaabane, L., Newcombe, E. A., & Kutzelnigg, A. (2021). Microglia-induced neuroinflammation compromises the homeostasis of lipid droplets in astrocytes. *Glia*, 69(1), 3-19.
- Colonna, M., & Butovsky, O. (2017). Microglia Function in the Central Nervous System during Health and Neurodegeneration. *Annual Review of Immunology*, 35, 441-468.

- Condello, C., Yuan, P., Schain, A., & Grutzendler, J. (2015). Microglia constitute a barrier that prevents neurotoxic protofibrillar A β 42 hotspots around plaques. *Nature Communications*, 6, 6176.
- Cordy, J. M., Hussain, I., Dingwall, C., Hooper, N. M., & Turner, A. J. (2003). Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(20), 11735–11740.
- Costet, P., Luo, Y., Wang, N., & Tall, A. R. (2000). Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 275(36), 28240–28245.
- Crews, L., & Masliah, E. (2010). Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Human molecular genetics*, 19(R1), R12–R20.
- Cruz, C. M., Rinna, A., Forman, H. J., Ventura, A. L. M., Persechini, P. M., & Ojcius, D. M. (2007). ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 282(5), 2871–2879.
- Cui J., Shen, Y., & Li, R. (2013). Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends in Molecular Medicine*, 19, 197–209.
- Cunningham, C., Wilcockson, D. C., Campion, S., Lunnon, K., & Perry, V. H. (2005). Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(40), 9275–9284.
- Dalal, N. V., Pranski, E. L., Tansey, M. G., Lah, J. J., Levey, A. I., & Betarbet, R. S. (2012). RNF11 modulates microglia activation through NF- κ B signalling cascade. *Neuroscience letters*, 528(2), 174–179.
- Datta Chaudhuri, A., Dasgheby, R. M., DeVine, L. R., Bi, H., Cole, R. N., & Haughey, N. J. (2020). Stimulus-dependent modifications in astrocyte-derived extracellular vesicle cargo regulate neuronal excitability. *Glia*, 68, 128–144.
- Dávila, D., & Torres-Aleman, I. (2008). Neuronal death by oxidative stress involves activation of FOXO3 through a two-arm pathway that activates stress kinases and attenuates insulin-like growth factor I signaling. *Molecular biology of the cell*, 19(5), 2014–2025.
- Deane, R., Sagare, A., Hamm, K., Parisi, M., Lane, S., Finn, M. B., Holtzman, D. M., & Zlokovic, B. V. (2008). apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *The Journal of clinical investigation*, 118(12), 4002–4013.
- de Almeida, L., Dorfleutner, A., & Stehlik, C. (2016). ASC-particle-induced Peritonitis. *Bio-protocol*, 6(19), e 1944.
- De Deyn, P. P., Goeman, J., Vervaet, A., Dourcy-Belle-Rose, B., Van Dam, D., & Geerts, E. (2011). Prevalence and incidence of dementia among 75–80-year-old community-dwelling elderly in different districts of Antwerp, Belgium: the Antwerp Cognition (ANCOG) Study. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 113, 736–745.
- Deigendesch, N., Zychlinsky, A., & Meissner, F. (2018). Copper Regulates the Canonical NLRP3 Inflammasome. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 200(5), 1607–1617.
- DeKosky, S. T., & Scheff, S. W. (1990). Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Annals of neurology*, 27(5), 457–464.
- Demarest, T. G., & McCarthy, M. M. (2015). Sex differences in mitochondrial (dys)function: Implications for neuroprotection. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 47(1–2), 173–188.
- Deczkowska, A., Keren-Shaul, H., Weiner, A., Colonna, M., Schwartz, M., & Amit, I. (2018). Disease-associated microglia: A universal immune sensor of neurodegeneration. *Cell*, 173(5), 1073–1081.
- Dietschy, J. M. (2009). Central nervous system: cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. *Biological chemistry*, 390(5–6), 287–293.
- Djelti, F., Braudeau, J., Hudry, E., Dhenain, M., Varin, J., Bièche, I., Marquer, C., Chali, F., Ayciriex, S., Auzeil, N., Alves, S., Langui, D., Potier, M. C., Laprevote, O., Vidaud, M., Duyckaerts, C., Miles, R., Aubourg, P., & Cartier, N. (2015). CYP46A1 inhibition, brain cholesterol accumulation and neurodegeneration pave the way for Alzheimer's disease. *Brain : a journal of neurology*, 138(Pt 8), 2383–2398.
- Dong, J., Wang, X., Xu, C., Gao, M., Wang, S., Zhang, J., Tong, H., Wang, L., Han, Y., Cheng, N., & Han, Y. (2021). Inhibiting NLRP3 inflammasome activation prevents copper-induced neuropathology in a murine model of Wilson's disease. *Cell death & disease*, 12(1), 87.

- Dong, W. K., & Greenough, W. T. (2004). Plasticity of nonneuronal brain tissue: roles in developmental disorders. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews*, 10(2), 85–90.
- Donoso, A. (2001). La enfermedad de Alzheimer y otras demencias (3ª ed.). Santiago: Ed. Universitaria.
- Doran, A. C., Yurdagul, A., Jr., Tabas, I., & Eitzman, D. T. (2020). FOXOs in Macrophages: Important Integrators of the Response to Pathogen and Stress. *Journal of Immunology*, 204(2), 313–325.
- Doré, S., Kar, S., & Quirion, R. (1997). Rediscovering an old friend, IGF-1: potential use in the treatment of neurodegenerative diseases. *Trends in neurosciences*, 20(8), 326–331.
- Drake, J., Link, C. D., & Butterfield, D. A. (2003). Oxidative stress precedes fibrillar deposition of Alzheimer's disease amyloid beta-peptide (1–42) in a transgenic *Caenorhabditis elegans* model. *Neurobiology of aging*, 24(3), 415–420.
- Duong, Q. V., Chan, J. S. K., Geraldo, M. P., Burrell, T., Miller, A. A., & Ooi, L. (2021). High fat diet induced changes in microglia activation are associated with the development of a pro-inflammatory state. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 202, 173108.
- Echeverria V, Greenberg D, & Dore S. (2005). Expression of Prostaglandin E2 Synthases in Mouse Postnatal Cortical Neurons. *Ann NY Acad Sci*; 1053:460–471.
- Eisses, J. F., & Kaplan, J. H. (2002). Molecular characterization of hCTR1, the human copper uptake protein. *The Journal of biological chemistry*, 277(32), 29162–29171.
- Esch, F. S., Keim, P. S., Beattie, E. C., Blacher, R. W., Culwell, A. R., Oltersdorf, T., McClure, D., & Ward, P. J. (1990). Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science (New York, N.Y.)*, 248(4959), 1122–1124.
- Escott-Price, V., Sims, R., Bannister, C., Harold, D., Vronskaya, M., Majounie, E., ... & Brayne, C. (2015). Common polygenic variation enhances risk prediction for Alzheimer's disease. *Brain*, 138, 3673–3684.
- Esparza, T. J., Zhao, H., Cirrito, J. R., Cairns, N. J., Bateman, R. J., Holtzman, D. M., & Brody, D. L. (2013). Amyloid- β oligomerization in Alzheimer dementia versus high-pathology controls. *Annals of Neurology*, 73, 104–119.
- Estrada Rodriguez, A. E., & Zomosa Signoret, V. C. (2017). Papel de la agregación del péptido beta amiloide en la enfermedad de Alzheimer. *Revista de Educación Bioquímica (REB)*, 36(1), 2–11.
- Estus, S., Tucker, H. M., van Rooyen, C., Wright, S., Brigham, E. F., & Wogulis, M. (1997). Aggregated amyloid- β protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant "apoptotic" pattern of gene induction. *Journal of Neuroscience*, 17(20), 7736–7745.
- Falomir-Lockhart, E., Dolcetti, F. J. C., García-Segura, L. M., Hereñú, C. B., & Bellini, M. J. (2019). IGF-1 Gene Therapy Modifies Microglia in the Striatum of Senile Rats. *Frontiers in aging neuroscience*, 11, 48.
- Farr, S. A. (2003). N-Acetylcysteine improves memory and attention deficits in an object recognition task. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75(3), 639–645.
- Farrer, L. A., Cupples, L. A., Haines, J. L., Hyman, B., Kukull, W. A., Mayeux, R., Myers, R. H., Pericak-Vance, M. A., Risch, N., & van Duijn, C. M. (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease: A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA*, 278(16), 1349–1356.
- Fawzi, N. L., Okabe, Y., Yap, E. H., & Head-Gordon, T. (2007). Determining the critical nucleus and mechanism of fibril elongation of the Alzheimer's Abeta(1–40) peptide. *Journal of molecular biology*, 365(2), 535–550.
- Feng, B., Yao, P. M., Li, Y., Devlin, C. M., Zhang, D., Harding, H. P., Sweeney, M., Rong, J. X., Kuriakose, G., Fisher, E. A., Marks, A. R., Ron, D., & Tabas, I. (2003). The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nature cell biology*, 5(9), 781–792.
- Fernández, A., Llacuna, L., Fernández-Checa, J. C., & Colell, A. (2009). Mitochondrial cholesterol loading exacerbates amyloid beta peptide-induced inflammation and neurotoxicity. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(20), 6394–6405.
- Fernández-Checa, J. C., Ookhtens, M., & Kaplowitz, N. (1987). Effect of chronic ethanol feeding on rat hepatocytic glutathione. Compartmentation, efflux, and response to incubation with ethanol. *The Journal of clinical investigation*, 80(1), 57–62.
- Fernandez-Fernandez, S., Almeida, A., & Bolaños, J. P. (2012). Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. *The Biochemical journal*, 443(1), 3–11.

- Finkel, T. (1998). Oxygen radicals and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 10(2), 248–253.
- Fischer, R., & Maier, O. (2015). Interrelation of oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease: role of TNF. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015, 610813.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*;226:497-509.
- Forloni, G., Chiesa, R., Smioldo, S., Verga, L., Salmona, M., Tagliavini, F., & Angeretti, N. (1993). Apoptosis mediated neurotoxicity induced by chronic application of beta amyloid fragment 25–35. *Neuroreport*, 4(5), 523–526.
- Forman, H. J., Maiorino, M., & Ursini, F. (2010). Signaling functions of reactive oxygen species. *Biochemistry*, 49(5), 835–842.
- Fornazzari, L. (1997). Epidemiología de la enfermedad de Alzheimer. En L. Fornazzari (Ed.), *Alzheimer* (pp. 17–34). Santiago: Mediterráneo.
- Forrester, S. J., Kikuchi, D. S., Hernandez, M. S., Xu, Q., & Griendling, K. K. (2018). Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circulation research*, 122(6), 877–902.
- Frautschy, S. A., Yang, F., Irrizarry, M., Hyman, B., Saido, T. C., Hsiao, K., & Cole, G. M. (1998). Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *The American journal of pathology*, 152(1), 307–317.
- Friker, L. L., Scheiblich, H., Hochheiser, I. V., Brinkschulte, R., Riedel, D., Latz, E., Geyer, M., & Heneka, M. T. (2020). β -Amyloid Clustering around ASC Fibrils Boosts Its Toxicity in Microglia. *Cell reports*, 30(11), 3743–3754.e6.
- Frühbeis, C., Fröhlich, D., & Krämer-Albers, E. M. (2012). Emerging roles of exosomes in neuron–glia communication. *Frontiers in physiology*, 3, 119.
- Frühbeis, C., Fröhlich, D., Kuo, W. P., & Krämer-Albers, E. M. (2013). Extracellular vesicles as mediators of neuron–glia communication. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, 182.
- Fuhrman, B., Gantman, A., Khateeb, J., Volkova, N., Horke, S., Kiyan, J., Dumler, I., Aviram, M. (2009). Urokinase Activates Macrophage PON2 Gene Transcription via the PI3K/ROS/MEK/SREBP-2 Signaling Cascade Mediated by the PDGFR- β . *Cardiovascular Research*, 84, 145.
- Furman, J. L., Sama, D. M., Gant, J. C., Beckett, T. L., Murphy, M. P., Bachstetter, A. D., Van Eldik, L. J., & Norris, C. M. (2012). Targeting astrocytes ameliorates neurologic changes in a mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(46), 16129–16140.
- Furman, J. L., Sama, D. M., Gant, J. C., Beckett, T. L., Murphy, M. P., Bachstetter, A. D., ... & Van Eldik, L. J. (2017). Targeting astrocytes ameliorates neurologic changes in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 37(41), 4827–4837.
- Galea, E., Morrison, W., Hudry, E., Arbel-Ornath, M., Bacsikai, B. J., Gómez-Isla, T., & Hyman, B. T. (2015). Topological analyses in APP/PS1 mice reveal that astrocytes do not migrate to amyloid- β plaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(51), 15556–15561.
- Gamba, P., Testa, G., Gargari, G., Staurengi, E., Poli, G., & Leonarduzzi, G. (2015). Oxidized cholesterol as the driving force behind the development of Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7, 119.
- García-González, P., Cabral-Miranda, F., Hetz, C., & Osorio, F. (2018). Interplay Between the Unfolded Protein Response and Immune Function in the Development of Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in immunology*, 9, 2541.
- Garwood, C. J., Cooper, J. D., Hanger, D. P., & Noble, W. (2011). Anti-inflammatory impact of minocycline in a mouse model of tauopathy. *Frontiers in Psychiatry*, 2, 63.
- Genis, L., Dávila, D., Fernandez, S., Pozo-Rodríguez, A., Martínez-Murillo, R., & Torres-Aleman, I. (2014). Astrocytes require insulin-like growth factor I to protect neurons against oxidative injury. *F1000Research*, 3, 28.
- Glenner, G., & Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 120(3), 885–890.
- Gliozzi, M., Musolino, V., Bosco, F., Scicchitano, M., Scarano, F., Nucera, S., ... & Mollace, V. (2021). Cholesterol homeostasis: Researching a dialogue between the brain and peripheral tissues. *Pharmacological Research*, 163.
- Golomb, B. A., & Evans, M. A. (2008). Statin adverse effects: a review of the literature and evidence for a mitochondrial mechanism. *American journal of cardiovascular drugs*, 8(6), 373–418

- González-Reyes, R. E., Nava-Mesa, M. O., Vargas-Sanchez, K., Ariza-Salamanca, D., Mora-Munoz, L., & Inestrosa, N. C. (2017). Oxidative stress in Alzheimer's disease: a critical review. *Neurochemistry International*, 108, 66-77.
- Gu, Y., Misonou, H., Sato, T., Dohmae, N., Takio, K., & Ihara, Y. (2001). Distinct intramembrane cleavage of the beta-amyloid precursor protein family resembling gamma-secretase-like cleavage of Notch. *The Journal of biological chemistry*, 276(38), 35235-35238.
- Guillamón-Vivancos, T., Gómez-Pinedo, U., & Matías-Guiu, J. (2015). Astrocytes in neurodegenerative diseases (I): function and molecular description. *Neurología (Barcelona, Spain)*, 30(2), 119-129.
- Gunay, N., Yildirim, C., Karcioğlu, O., Gunay, N. E., Yılmaz, M., Usalan, C., Kose, A., & Togun, I. (2006). A series of patients in the emergency department diagnosed with copper poisoning: recognition equals treatment. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 209(3), 243-248.
- Gupte, A., & Mumper, R. J. (2009). Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer treatment reviews*, 35(1), 32-46.
- Gutiérrez-Gracia, J., García-García, A. G., Salazar-Ramiro, A., Mendieta-Condado, E., Treviño-Saldaña, N., & Gómez-Manzo, S. (2013). Copper toxicity induces oxidative stress and apoptosis in granulosa cells through the intrinsic and extrinsic pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 273(3), 516-524.
- Haass C. (2004). Take five--BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *The EMBO journal*, 23(3), 483-488.
- Haass, C., & Selkoe, D. J. (1993). Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell*, 75(6), 1039-1042.
- Hall, A. M., & Roberson, E. D. (2012). Mouse models of Alzheimer's disease. *Brain research bulletin*, 88(1), 3-12.
- Halle, A., Hornung, V., Petzold, G. C., Stewart, C. R., Monks, B. G., Reinheckel, T., Fitzgerald, K. A., Latz, E., Moore, K. J., & Golenbock, D. T. (2008). The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nature immunology*, 9(8), 857-865.
- Hanamsagar, R., & Bilbo, S. D. (2016). Sex differences in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders: Focus on microglial function and neuroinflammation during development. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 160, 127-133.
- Hanisch, U. K., & Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature neuroscience*, 10(11), 1387-1394.
- Hansen, D. V., Hanson, J. E., & Sheng, M. (2018). Microglia in Alzheimer's disease. *The Journal of cell biology*, 217(2), 459-472.
- Hardy, J. (1997). Amyloid, the presenelins and Alzheimer's disease. *Trends in Neurosciences*, 20(4), 154-159.
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science (New York, N.Y.)*, 256(5054), 184-185.
- Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5580), 353-356.
- Hartlage-Rübsamen, M., Zeitschel, U., Apelt, J., Gärtner, U., Franke, H., Stahl, T., Günther, A., Schliebs, R., Penkowa, M., Bigl, V., & Rossner, S. (2003). Astrocytic expression of the Alzheimer's disease beta-secretase (BACE1) is stimulus-dependent. *Glia*, 4(2), 169-179.
- Hashim, A., Wang, L., Juneja, K., Ye, Y., Zhao, Y., & Ming, L. J. (2011). Vitamin B6s inhibit oxidative stress caused by Alzheimer's disease-related Cu(II)-beta-amyloid complexes-cooperative action of phospho-moiety. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 21(21), 6430-6432.
- Haughey, N. J., Nath, A., Chan, S. L., Borchard, A. C., Rao, M. S., & Mattson, M. P. (2002). Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 83(6), 1509-1524.
- Haure-Mirande, J. V., Audrain, M., Ehrlich, M. E., & Gandy, S. (2022). Microglial TYROBP/DAPI2 in Alzheimer's disease: Transduction of physiological and pathological signals across TREM2. *Molecular neurodegeneration*, 17(1), 55.
- Hayashi, H., Campenot, R. B., Vance, D. E., & Vance, J. E. (2004). Glial lipoproteins stimulate axon growth of central nervous system neurons in compartmented cultures. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 14009-14015.
- Haywood, S., Paris, J., Ryvar, R., & Botteron, C. (2008). Brain copper elevation and neurological changes in north ronaldsay sheep: a model for neurodegenerative disease?. *Journal of comparative pathology*, 139(4), 252-255.

- Haywood, S., & Vaillant, C. (2014). Overexpression of copper transporter CTR1 in the brain barrier of North Ronaldsay sheep: implications for the study of neurodegenerative disease. *Journal of comparative pathology*, *150*(2-3), 216-224.
- He Y, Yue Y, Zheng X, Zhang K, Chen S, Du Z. (2015a). Curcumin, Inflammation, and Chronic Diseases: How Are They Linked? *Molecules*, *20*(5), 9183-9213.
- He, W. T., Wan, H., Hu, L., Chen, P., Wang, X., Huang, Z., ... & Han, J. (2015b). Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. *Cell Research*, *25*(12), 1285-1298.
- Henderson AS (1988). Risk factors for Alzheimer's disease: a review and hypothesis. *Acta Psychiatr Scand*; *78*: 257-275.
- Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G. C., ... Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet. Neurology*, *14*(4), 388-405.
- Heneka, M. T., Kummer, M. P., Stutz, A., Delekate, A., Schwartz, S., Vieira-Saecker, A., Griep, A., Axt, D., Remus, A., Tzeng, T. C., Gelpi, E., Halle, A., Korte, M., Latz, E., & Golenbock, D. T. (2013). NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and contributes to pathology in APP/PS1 mice. *Nature*, *493*(7434), 674-678.
- Hensley, K., Hall, N., Subramaniam, R., Cole, P., Harris, M., Aksenov, M., Aksenova, M., Gabbita, S. P., Wu, J. F., & Carney, J. M. (1995). Brain regional correspondence between Alzheimer's disease histopathology and biomarkers of protein oxidation. *Journal of neurochemistry*, *65*(5), 2146-2156.
- Hereñú, C. B., Cristina, C., Rimoldi, O. J., Becú-Villalobos, D., Cambiaggi, V., Portiansky, E. L., & Goya, R. G. (2007). Restorative effect of insulin-like growth factor-I gene therapy in the hypothalamus of senile rats with dopaminergic dysfunction. *Gene therapy*, *14*(3), 237-245.
- Herrera, M. L., Basmadjian, O. M., Falomir Lockhart, E., Dolcetti, F. J., Hereñú, C. B., & Bellini, M. J. (2019). Novel adenoviral IGF-1 administration modulates the association between depressive symptoms and aging: Does gender matter?. *Behavioural brain research*, *372*, 112050.
- Herrera, M. L., Basmadjian, O. M., Falomir-Lockhart, E., Dolcetti, F. J., Hereñú, C. B., & Bellini, M. J. (2020). Sex frailty differences in ageing mice: Neuropathologies and therapeutic projections. *The European journal of neuroscience*, *52*(1), 2827-2837.
- Herrmann, J. E., Imura, T., Song, B., Qi, J., Ao, Y., Nguyen, T. K., ... & Sofroniew, M. V. (2008). The astrocyte-specific glial fibrillary acidic protein promoter drives robust reporter gene expression in astrocytes and radial glia-type neural stem cells. *Journal of Neuroscience*, *28*(32), 6589-6600.
- Higgins, M. E., & Ioannou, Y. A. (2001). Apoptosis-induced release of mature sterol regulatory element-binding proteins activates sterol-responsive genes. *Journal of lipid research*, *42*(12), 1939-1946.
- Hoffmann, A., & Baltimore, D. (2006). Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunological reviews*, *210*, 171-186.
- Holmes, C., El-Okli, M., Williams, A. L., Cunningham, C., Wilcockson, D., & Perry, V. H. (2003). Systemic infection, interleukin 1beta, and cognitive decline in Alzheimer's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, *74*(6), 788-789.
- Hong, H. S., Maezawa, I., Yao, N., Xu, B., Diaz-Avalos, R., Rana, S., ... & Lam, K. S. (2003). Combining the rapid MTT formazan exocytosis assay and the MC65 protection assay led to the discovery of carbazole analogs as small molecule inhibitors of A β oligomer-induced cytotoxicity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *13*(24), 4355-4358.
- Hossain, G. S., van Thienen, J. V., Werstuck, G. H., Zhou, J., Sood, S. K., Dickhout, J. G., de Koning, A. B., Tang, D., Wu, D., Falk, E., Poddar, R., Jacobsen, D. W., Zhang, K., Kaufman, R. J., & Austin, R. C. (2003). TDA651 is induced by homocysteine, promotes detachment-mediated programmed cell death, and contributes to the development of atherosclerosis in hyperhomocysteinemia. *The Journal of biological chemistry*, *278*(32), 30317-30327.
- Hsiao, Y. H., Chen, P. S., Yeh, S. H., Lin, C. H., & Gean, P. W. (2008). N-acetylcysteine prevents beta-amyloid toxicity by a stimulatory effect on p35/cyclin-dependent kinase 5 activity in cultured cortical neurons. *Journal of neuroscience research*, *88*(12), 2685-2695.
- Hsieh, C. J., Hou, C., Zhu, Y., Lee, J. Y., Kohli, N., Gallagher, E., Xu, K., Lee, H., Li, S., McManus, M. J., & Mach, R. H. (2022). [18F]ROstrace detects oxidative stress in vivo and predicts progression of Alzheimer's disease pathology in APP/PS1 mice. *EJNMMI research*, *12*(1), 43.
- Hu, Z., Yu, F., Gong, P., Qiu, Y., Zhou, W., Cui, Y., Li, J., Chen, H. (2014). Subneurotoxic copper(II)-induced NF- κ B-dependent microglial activation is associated with mitochondrial ROS. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *276*, 95-103.
- Huang, Q., Aluise, C. D., Joshi, G., Sultana, R., St Clair, D. K., Markesbery, W. R., & Butterfield, D. A. (2010). Potential in vivo amelioration by N-acetyl-L-cysteine of oxidative stress in brain in human double mutant APP/PS-1 knock-in mice: toward therapeutic modulation of mild cognitive impairment. *Journal of neuroscience research*, *88*(12), 2618-2629.

- Hughes, D., & Mallucci, G. R. (2019). The unfolded protein response in neurodegenerative disorders - therapeutic modulation of the PERK pathway. *The FEBS journal*, 286(2), 342-355.
- Huster, D., Purnat, T. D., Burkhead, J. L., Ralle, M., Fiehn, O., Stuckert, F., Olson, N. E., Teupser, D., & Lutsenko, S. (2007). High copper selectively alters lipid metabolism and cell cycle machinery in the mouse model of Wilson disease. *The Journal of biological chemistry*, 282(11), 8343-8355.
- Ising, C., Venegas, C., Zhang, S., Scheiblich, H., Schmidt, S. V., Vieira-Saecker, A., Schwartz, S., Albasset, S., McManus, R. M., Tejera, D., Griep, A., Santarelli, F., Brosseron, F., Opitz, S., Stunden, J., Merten, M., Kaye, R., Golenbock, D. T., Blum, D., Latz, E., ... Heneka, M. T. (2019). NLRP3 inflammasome activation drives tau pathology. *Nature*, 575(7784), 669-673.
- Itagaki, S., McGeer, P. L., & Akiyama, H. (1988). Presence of T-cytotoxic suppressor and leucocyte common antigen positive cells in Alzheimer's disease brain tissue. *Neuroscience letters*, 9(3), 259-264.
- Jackson, R. J., Meltzer, J. C., Nguyen, H., Commins, C., Bennett, R. E., Hudry, E., & Hyman, B. T. (2022). APOE4 derived from astrocytes leads to blood-brain barrier impairment. *Brain : a journal of neurology*, 145(10), 3582-3593.
- Janssen, J. C., Beck, J. A., Campbell, T. A., Dickinson, A., Fox, N. C., Harvey, R. J., ... & Collinge, J. (2003). Early onset familial Alzheimer's disease: Mutation frequency in 31 families. *Neurology*, 60(2), 235-239.
- Jaragh-Alhadad, L. A., & Falahati, M. (2022). Copper oxide nanoparticles promote amyloid- β -triggered neurotoxicity through formation of oligomeric species as a prelude to Alzheimer's diseases. *International journal of biological macromolecules*, 207, 121-129.
- Jay, T. R., Miller, C. M., Cheng, P. J., Graham, L. C., Bemiller, S., Broihier, M. L., ... & Lamb, B. T. (2015). TREM2 deficiency eliminates TREM2+ inflammatory macrophages and ameliorates pathology in Alzheimer's disease mouse models. *Journal of Experimental Medicine*, 212(3), 287-295.
- Jiang, J., Wu, X. Y., Zhou, X. Q., Feng, L., Liu, Y., Jiang, W. D., Wu, P., & Zhao, Y. (2016). Glutamate ameliorates copper-induced oxidative injury by regulating antioxidant defences in fish intestine. *The British journal of nutrition*, 116(1), 70-79.
- Jin, S. M., Cho, H. J., Kim, Y. W., Hwang, J. Y., Kim, D. W., & Chung, Y. H. (2012). A β -induced mitochondria-dependent cell death is mediated by caspase-8 activation in neuronal cells. *Neurochemistry International*, 61(2), 203-210.
- Jin, Y., Sun, G., Li, X., Li, G., Lu, C., & Qu, L. (2004). Study on the toxic effects induced by different arsenicals in primary cultured rat astroglia. *Toxicology and applied pharmacology*, 196(3), 396-403.
- Jo, S., Yarishkin, O., Hwang, Y. J., Chun, Y. E., Park, M., Woo, D. H., Bae, J. Y., Kim, T., Lee, J., Chun, H., Park, H. J., Lee, D. Y., Hong, J., Kim, H. Y., Oh, S. J., Park, S. J., Lee, H., Yoon, B. E., Kim, Y., Jeong, Y., ... Lee, C. J. (2014). GABA from reactive astrocytes impairs memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Nature medicine*, 20(8), 886-896.
- Johansson, P., Åberg, D., Johansson, J. O., Mattsson, N., Hansson, O., Ahrén, B., Isgaard, J., Åberg, N. D., Blennow, K., Zetterberg, H., Wallin, A., & Svensson, J. (2013). Serum but not cerebrospinal fluid levels of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein-3 (IGFBP-3) are increased in Alzheimer's disease. *Psychoneuroendocrinology*, 38(9), 1729-1737.
- Johnson, R. T., Breedlove, S. M., & Jordan, C. L. (2008). Sex differences and laterality in astrocyte number and complexity in the adult rat medial amygdala. *The Journal of comparative neurology*, 511(5), 599-609.
- Jomova, K., & Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283(2-3), 65-87.
- Jones, L. P., Stefansson, S., Kim, M. S., & Ahn, S. N. (2011). Comparison of radioimmuno and carbon nanotube field-effect transistor assays for measuring insulin-like growth factor-1 in a preclinical model of human breast cancer. *Journal of nanobiotechnology*, 9, 36.
- Jones, R. S., Minogue, A. M., Connor, T. J., & Lynch, M. A. (2013). Amyloid- β -induced astrocytic phagocytosis is mediated by CD36, CD47 and RAGE. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 8(1), 301-311.
- Jonsson, T., Atwal, J. K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P. V., Bjornsson, S., ... & Stefansson, H. (2012). A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*, 488(7409), 96-99.
- Joshi, P., Riffel, F., Satoh, K., Enomoto, M., Qamar, S., Scheiblich, H., Villacampa, N., Kumar, S., Theil, S., Parhizkar, S., Haass, C., Heneka, M. T., Fraser, P. E., St George-Hyslop, P., & Walter, J. (2021). Differential interaction with TREM2 modulates microglial uptake of modified A β species. *Glia*, 69(12), 2917-2932.
- Kaether, C., & Haass, C. (2004). A lipid boundary separates APP and secretases and limits amyloid beta-peptide generation. *The Journal of cell biology*, 167(5), 809-812.

- Karch, C. M., & Goate, A. M. (2015). Alzheimer's disease risks genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biological Psychiatry*, 77, 43–51.
- Karten, B., Campenot, R. B., Vance, D. E., & Campenot, E. S. (2005). Cholesterol accumulates in cell bodies, but is decreased in distal axons of Niemann-Pick C1-deficient neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 82(1), 87–94.
- Katzman, R., & Saitoh, T. (1991). Advances in Alzheimer's disease. *FASEB Journal*, 4(11), 278–286.
- Kaufman R. J. (2002). Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *The Journal of clinical investigation*, 110(10), 1389–1398.
- Kayed, R., Sokolov, Y., Edmonds, B., McIntire, T. M., Milton, S. C., Hall, J. E., & Glabe, C. G. (2004). Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. *The Journal of biological chemistry*, 279(45), 46363–46366.
- Keller, L., Murphy, C., Wang, H. X., Fratiglioni, L., Olin, M., Gafvels, M., ... & Lilius, L. (2010). A functional polymorphism in the HMGR promoter affects transcriptional activity but not the risk for Alzheimer's disease in Swedish populations. *Brain Research*, 1344, 185–191.
- Keren-Shaul, H., Spinrad, A., Weiner, A., Matcovitch-Natan, O., Dvir-Szternfeld, R., Ulland, T. K., et al. (2017). A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease. *Cell*, 169(7), 1276–1290 e1217.
- Kwon, H. S., & Koh, S. H. (2020). Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Translational neurodegeneration*, 9(1), 42.
- Kim, J. Y., Garcia-Carbonell, R., Yamachika, S., Zhao, P., Dhar, D., Loomba, R., Kaufman, R. J., Saltiel, A. R., & Karin, M. (2018). ER Stress Drives Lipogenesis and Steatohepatitis via Caspase-2 Activation of S1P. *Cell*, 175(1), 133–145.e15.
- Kim, S. I., Yi, J. S., & Ko, Y. G. (2006a). Amyloid beta oligomerization is induced by brain lipid rafts. *Journal of cellular biochemistry*, 99(3), 878–889.
- Kim, W. S., Guillemin, G. J., Glaros, E. N., Lim, C. K., & Garner, B. (2006b). Quantitation of ATP-binding cassette subfamily-A transporter gene expression in primary human brain cells. *Neuroreport*, 17(9), 891–896.
- Kim, W. S., Weickert, C. S., & Garner, B. (2008). Role of ATP-binding cassette transporters in brain lipid transport and neurological disease. *Journal of neurochemistry*, 104(5), 1145–1166.
- Kinney, J. W., Bemiller, S. M., Murtishaw, A. S., Leisgang, A. M., Salazar, A. M., & Lamb, B. T. (2018). Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia (New York, N. Y.)*, 4, 575–590.
- Kiray, H., Lindsay, S. L., Hosseinzadeh, S., Barnett, S. C., & Theodore, W. (2016). Astrocyte-mediated remodelling of the interhemispheric midline during telencephalic development is exclusive to eutherian mammals. *Open Biology*, 6(10), 160254.
- Kitazawa M, Hsu HW & Medeiros R. (2016). Copper exposure perturbs brain inflammatory responses and impairs clearance of amyloid-beta. *Toxicology. Sci.* 152(1):194–204.
- Kleinberger, G., Yamanishi, Y., Suárez-Calvet, M., Czirr, E., Lohmann, E., Cuyvers, E., ... & Haass, C. (2014). TREM2 mutations implicated in neurodegeneration impair cell surface transport and phagocytosis. *Science Translational Medicine*, 6(243), 243ra86.
- Kotler, S. A., Brender, J. R., Vivekanandan, S., Suzuki, Y., Yamamoto, K., Monette, M., Krishnamoorthy, J., Walsh, P., Cauble, M., Holl, M. M., Marsh, E. N., & Ramamoorthy, A. (2015). High-resolution NMR characterization of low abundance oligomers of amyloid- β without purification. *Scientific reports*, 5, 11811.
- Krasemann, S., Madore, C., Cialic, R., Baufeld, C., Calcagno, N., El Fatimy, R., Beckers, L., O'Loughlin, E., Xu, Y., Fanek, Z., et al. (2017). The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity*, 47, 566–581.e9.
- Kukull, W. A., & Ganguli, M. (2000). Epidemiology of dementia: concepts and overview. *Neurologic Clinics*, 18(4), 923–949.
- Kulkarni, P. P., She, Y. M., Smith, S. D., Roberts, E. A., & Sarkar, B. (2006). Proteomics of metal transport and metal-associated diseases. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 12(9), 2410–2422.
- Kusnadi, A., Park, S. H., Yuan, R., Pannellini, T., Giannopoulou, E., Oliver, D., Lu, T., Park-Min, K. H., & Ivashkiv, L. B. (2019). The Cytokine TNF Promotes Transcription Factor SREBP Activity and Binding to Inflammatory Genes to Activate Macrophages and Limit Tissue Repair. *Immunity*, 51(2), 241–257.e9.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.

- Laron, Z. (2001). Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Molecular pathology : MP*, 54(5), 311–316.
- Lawrence de Koning, A. B., Werstuck, G. H., Zhou, J., & Austin, R. C. (2003). Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. *Clinical biochemistry*, 36(6), 431–441.
- Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P., & Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 39(1), 151–170.
- Lee A. S. (2001). The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends in biochemical sciences*, 26(8), 504–510.
- Lee, J. N., & Ye, J. (2004). Proteolytic activation of sterol regulatory element-binding protein induced by cellular stress through depletion of Insig-1. *The Journal of biological chemistry*, 279(43), 45257–45265.
- Leoni, V., & Caccia, C. (2015). Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta (PPAR β/δ) is highly expressed in the prefrontal cortex and hippocampus, and controls cholesterol homeostasis. *Journal of Lipid Research*, 56(5), 869–881.
- Li, B., Yamamori, H., Tatebayashi, Y., Shafit-Zagardo, B., Tanimukai, H., Chen, S., Iqbal, K., & Grundke-Iqbal, I. (2008). Failure of neuronal maturation in Alzheimer disease dentate gyrus. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 67(1), 78–84.
- Li, D., Zhang, J., & Liu, Q. (2022). Brain cell type-specific cholesterol metabolism and implications for learning and memory. *Trends in Neurosciences*, 45, 401–414.
- Li, G., Gu, H. M., & Zhang, D. W. (2013). ATP-binding cassette transporters and cholesterol translocation. *IUBMB life*, 65(6), 505–512.
- Lian, H., Yang, L., Cole, A., Sun, L., Chiang, A. C., Fowler, S. W., Shim, D. J., Rodriguez-Rivera, J., Tagliatalata, G., Jankowsky, J. L., Lu, H. C., & Zheng, H. (2015). NF κ B-activated astroglial release of complement C3 compromises neuronal morphology and function associated with Alzheimer's disease. *Neuron*, 85(1), 101–115.
- Liang, Y., Raven, F., Ward, J. F., Zhen, S., Zhang, S., Sun, H., Miller, S. J., Choi, S. H., Tanzi, R. E., & Zhang, C. (2020). Upregulation of Alzheimer's Disease Amyloid- β Protein Precursor in Astrocytes Both in vitro and in vivo. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 76(3), 1071–1082.
- Lichtenthaler, S. F., Haass, C., & Steiner, H. (2011). Regulated intramembrane proteolysis--lessons from amyloid precursor protein processing. *Journal of neurochemistry*, 117(5), 779–796.
- Lichtenwalner, R. J., Forbes, M. E., Bennett, S. A., Lynch, C. D., Sonntag, W. E., & Riddle, D. R. (2001). Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-I ameliorates the age-related decline in hippocampal neurogenesis. *Neuroscience*, 107(4), 603–613.
- Liddelov, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., ... & Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638), 481–487.
- Lin, H., Bhatia, R., & Lal, R. (2001). Amyloid beta protein forms ion channels: implications for Alzheimer's disease pathophysiology. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(13), 2433–2444.
- Lin, Y. M., Raffen, R., Zhou, Y., Cassidy, C. S., Flavin, M. T., & Stevens, F. J. (2001). Amyloid fibril formation in microwell plates for screening of inhibitors. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis*, 8(3), 182–193.
- Liu, J., Liu, Y., Chen, J., Hu, C., Teng, M., Jiao, K., Shen, Z., Zhu, D., Yue, J., Li, Z., & Li, Y. (2017). The ROS-mediated activation of IL-6/STAT3 signaling pathway is involved in the 27-hydroxycholesterol-induced cellular senescence in nerve cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 45(Pt 1), 10–18.
- Liu, J. P., Tang, Y., Zhou, S., Toh, B. H., McLean, C., & Li, H. (2010). Cholesterol involvement in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Molecular and cellular neurosciences*, 43(1), 33–42.
- Liu, M., Hurn, P. D., Roselli, C. E., & Alkayed, N. J. (2007). Role of P450 aromatase in sex-specific astrocytic cell death. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(1), 135–141.
- Liu, S., Jing, F., Yu, C., Gao, L., Qin, Y., & Zhao, J. (2015). AICAR-Induced Activation of AMPK Inhibits TSH/SREBP-2/HMGCR Pathway in Liver. *PLoS one*, 10(5), e0124951.

- Lleó, A., Blesa, R., Queralt, R., Ezquerra, M., Molinuevo, J. L., Clavaguera, F., ... & Ariza, A. (2002). Frequency of pathogenic and rare alleles in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & Dementia*, 8(2), 87-94.
- Loram, L.C., Harrison, J.A., & Sloane, E.M. (2012). Sex and estradiol influence glial pro-inflammatory responses to lipopolysaccharide in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 37(10), 1688-1699.
- Lovell, M. A., Ehmann, W. D., Butler, S. M., & Markesbery, W. R. (1995). Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology*, 45(8), 1594-1601.
- Lovell, M. A., Robertson, J. D., Teesdale, W. J., Campbell, J. L., & Markesbery, W. R. (1998). Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *Journal of the neurological sciences*, 158(1), 47-52.
- Lovell, M. A., & Markesbery, W. R. (2007). Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. *Nucleic acids research*, 35(22), 7497-7504.
- Lu, J., Zheng, Y.-L., Wu, D.-M., Sun, D.-X., Shan, Q., & Fan, S.-H. (2006). Trace amounts of copper induce neurotoxicity in the cholesterol-fed mice through apoptosis. *FEBS Letters*, 580(28-29), 6730-6740.
- Lučiūnaitė, A., McManus, R. M., Jankunec, M., Rącz, I., Dansokho, C., Dalgėdienė, I., Schwartz, S., Brosseron, F., & Heneka, M. T. (2020). Soluble A β oligomers and protofibrils induce NLRP3 inflammasome activation in microglia. *Journal of neurochemistry*, 155(6), 650-661.
- Luo, J., Yang, H., & Song, B. L. (2020). Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(4), 225-245.
- Luu, W., Sharpe, L. J., Stevenson, J., & Brown, A. J. (2012). Akt acutely activates the cholesterologenic transcription factor SREBP-2. *Biochimica et biophysica acta*, 1823(2), 458-464.
- Mahley, R. W., Huang, Y., & Weisgraber, K. H. (2006). Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport. *Journal of Clinical Investigation*, 116(5), 1226-1229.
- Malavolta M, Piacenza F, Basso A, Giacconi R, Costarelli L, Mocchegiani E. (2015). Serum copper to zinc ratio: Relationship with aging and health status. *Mech. Ageing Dev.*
- Manual de señalización celular, 2^{da} edición 2010, Páginas 2505-2510
- Marcilla, A., Trelis, M., Cortés, A., Sotillo, J., Cantalapiedra, F., Minguez, M. T., Valero, M. L., Sánchez del Pino, M. M., Muñoz-Antoli, C., Toledo, R., & Bernal, D. (2012). Extracellular vesicles from parasitic helminths contain specific excretory/secretory proteins and are internalized in intestinal host cells. *PLoS one*, 7(9), e45974.
- Mari, M., Morales, A., Colell, A., García-Ruiz, C., & Fernández-Checa, J. C. (2009). Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11, 2685-2700.
- Markowska, A. L., Mooney, M., & Sonntag, W. E. (1998). Insulin-like growth factor-1 ameliorates age-related behavioral deficits. *Neuroscience*, 87(3), 559-569.
- Marschallinger, J., Iram, T., Zardeneta, M., Lee, S. E., Lehallier, B., Haney, M. S., Pluvinage, J. V., Mathur, V., Hahn, O., Morgens, D. W., Kim, J., Tevini, J., Felder, T. K., Wolinski, H., Bertozzi, C. R., Bassik, M. C., Aigner, L., & Wyss-Coray, T. (2020). Lipid-droplet-accumulating microglia represent a dysfunctional and proinflammatory state in the aging brain. *Nature neuroscience*, 23(2), 194-208.
- Martin, M. G., Pfrieger, F., & Dotti, C. G. (2014). Cholesterol in brain disease: Sometimes determinant and frequently implicated. *EMBO Reports*, 15(10), 1036-1052.
- Martinon, F., Burns, K., & Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell*, 10(2), 417-426.
- Masliah, E., Mallory, M., Alford, M., DeTeresa, R., Hansen, L. A., McKeel, D. W., Jr, & Morris, J. C. (2001). Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease. *Neurology*, 56(1), 127-129.
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. (1985). Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:4245-4249.
- Masters, S. L., O'Neill, L. A. (2011). Disease-associated amyloid and misfolded protein aggregates activate the inflammasome. *Trends in Molecular Medicine*, 17, 276-282.

- Matsuoka, Y., Picciano, M., Malester, B., LaFrancois, J., Zehr, C., Daeschner, J. M., Olschowka, J. A., Fonseca, M. I., O'Banion, M. K., Tenner, A. J., Lemere, C. A., & Duff, K. (2001). Inflammatory responses to amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *The American journal of pathology*, *158*(4), 1345-1354.
- Mattioli, G. A., Rosa, D. E., Turic, E., Relling, A. E., Galarza, E., & Fazio, L. E. (2018). Effects of Copper and Zinc Supplementation on Weight Gain and Hematological Parameters in Pre-weaning Calves. *Biological Trace Element Research*, *185*(2), 327-331.
- Mauch, D. H., Nägler, K., Schumacher, S., Göritz, C., Müller, E. C., Otto, A., et al. (2001). CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* (New York, N.Y.), *294*, 1354-1357.
- McCann, M. S., Fernandez, H. R., Flowers, S. A., & Maguire-Zeiss, K. A. (2021). Polychlorinated biphenyls induce oxidative stress and metabolic responses in astrocytes. *Neurotoxicology*, *86*, 59-68.
- McGeer, P. L., McGeer, E. G., Itagaki, S., & Mizukawa, K. (1987). Anatomy and pathology of the basal ganglia. *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques*, *14*(3 Suppl), 363-372.
- Mecocci, P., MacGarvey, U., & Beal, M. F. (1994). Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Annals of neurology*, *36*(5), 747-751.
- Merlini G & Bellott V. (2008). Molecular mechanisms of amyloidosis, *N. Engl. J. Med.* 2003 (549), 583-596.
- Merlini G & Westermark P. (2004). The systemic amyloidoses: clearer understanding of the molecular mechanisms offers hope for more effective therapies. *J.intern. Med* 255, 154-178.
- Mettlen, M., Chen, P. H., Srinivasan, S., Danuser, G., & Schmid, S. L. (2018). Regulation of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Annual review of biochemistry*, *87*, 871-896.
- Miller, B. H., & Gore, A. C. (2001). Alterations in hypothalamic insulin-like growth factor-I and its associations with gonadotropin releasing hormone neurones during reproductive development and ageing. *Journal of neuroendocrinology*, *13*(8), 728-736.
- Miller, L. J., & Chacko, R. (2004). The role of cholesterol and statins in Alzheimer's disease. *The Annals of pharmacotherapy*, *38*(1), 91-98.
- Miranda, K. M., Espey, M. G., & Wink, D. A. (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, *5*, 62-71.
- Misra, H. P., & Fridovich, I. (1977). Superoxide dismutase: a photochemical augmentation assay. *Archives of biochemistry and biophysics*, *181*(1), 308-312.
- Mocchegiani, E., Malavolta, M., Lattanzio, F., Piacenza, F., Basso, A., Abbatecola, A. M., Russo, A., Giovannini, S., Capoluongo, E., Bustacchini, S., Guffanti, E. E., Bernabei, R., & Landi, F. (2012). Cu to Zn ratio, physical function, disability, and mortality risk in older elderly (iSIRENTE study). *Age (Dordrecht, Netherlands)*, *34*(3), 539-552.
- Molofsky, A. V., Kelley, K. W., Tsai, H. H., Redmond, S. A., Chang, S. M., Madireddy, L., Chan, J. R., Baranzini, S. E., Ullian, E. M., & Rowitch, D. H. (2014). Astrocyte-encoded positional cues maintain sensorimotor circuit integrity. *Nature*, *509*(7499), 189-194.
- Mong, J. A., & McCarthy, M. M. (2002). Ontogeny of sexually dimorphic astrocytes in the neonatal rat arcuate. *Brain research. Developmental brain research*, *139*(2), 151-158.
- Montivero, A. J., Ghersi, M. S., Silvero, C. M. J., Artur de la Villarmois, E., Catalan-Figueroa, J., Herrera, M., Becerra, M. C., Hereñú, C. B., & Pérez, M. F. (2021). Early IGF-1 Gene Therapy Prevented Oxidative Stress and Cognitive Deficits Induced by Traumatic Brain Injury. *Frontiers in pharmacology*, *12*, 672392.
- Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T., & Yasuhiko, Y. (2002). An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *The Journal of biological chemistry*, *277*(37), 34287-34294.
- Morris, M. C., Evans, D. A., Bienias, J. L., Tangney, C. C., Bennett, D. A., Wilson, R. S., & Aggarwal, N. (2003). Dietary fat intake and 6-year cognitive change in an older biracial community population. *Neurology*, *60*(2), 256-261.
- Morris, M. C., Scherr, P. A., Hebert, L. E., Glynn, R. J., Bennett, D. A., & Evans, D. A. (2006). Association of incident Alzheimer disease and blood pressure measured from 13 years before to 2 years after diagnosis in a large community study. *Archives of Neurology*, *63*(10), 1397-1401.

- Moser, V. A., & Pike, C. J. (2016). Obesity and sex interact in the regulation of Alzheimer's disease. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 67, 102-118.
- Multhaup, G., Schlicksupp, A., Hesse, L., Beher, D., Ruppert, T., Masters, C. L., & Beyreuther, K. (1996). The Amyloid Precursor Protein of Alzheimer's Disease in the Reduction of Copper(II) to Copper(I). *Science*, 271(5254), 1406-1409.
- Nagele, R. G., D'Andrea, M. R., Lee, H., Venkataraman, V., & Wang, H. Y. (2003). Astrocytes accumulate A beta 42 and give rise to astrocytic amyloid plaques in Alzheimer disease brains. *Brain research*, 971(2), 197-209.
- Najm, R., Jones, E. A., & Huang, Y. (2019). Apolipoprotein E4, inhibitory network dysfunction, and Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration*, 14(1), 24.
- Nakahira, K., Haspel, J. A., Rathinam, V. A., Lee, S. J., Dolinay, T., Lam, H. C., Englert, J. A., Rabinovitch, M., Cernadas, M., Kim, H. P., Fitzgerald, K. A., Ryter, S. W., & Choi, A. M. (2011). Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nature immunology*, 12(3), 222-230.
- Nakanishi, A., Kaneko, N., Takeda, H., Sawasaki, T., Morikawa, S., Zhou, W., Kurata, M., Yamamoto, T., Akbar, S. M. F., Zako, T., & Masumoto, J. (2018). Amyloid β directly interacts with NLRP3 to initiate inflammasome activation: identification of an intrinsic NLRP3 ligand in a cell-free system. *Inflammation and regeneration*, 38, 27.
- N'Diaye, E. N., Branda, C. S., Branda, S. S., Nevarez, L., Colonna, M., Lowell, C., & Hamerman, J. A. (2009). TREM-2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2) is a phagocytic receptor for bacteria. *Journal of Cell Biology*, 184(2), 215-223.
- Nelson, L.H., & Lenz, K.M. (2017). Microglia depletion in early life programs persistent changes in social, mood-related, and locomotor behavior in male and female rats. *Behavioral Brain Research*, 316, 279-293.
- Neu, S. C., Pa, J., Kukull, W., Beekly, D., Kuzma, A., Gangadharan, P., Wang, L. S., Romero, K., Arneric, S. P., Redolfi, A., Orlandi, D., Frisoni, G. B., Au, R., Devine, S., Auerbach, S., Espinosa, A., Boada, M., Ruiz, A., Johnson, S. C., Kosciak, R., ... Toga, A. W. (2017). Apolipoprotein E Genotype and Sex Risk Factors for Alzheimer Disease: A Meta-analysis. *JAMA neurology*, 74(10), 1178-1189.
- Neuwelt, E. A., Pagel, M. A., Hasler, B. P., Deloughery, T. G., & Muldoon, L. L. (2001). Therapeutic efficacy of aortic administration of N-acetylcysteine as a chemoprotectant against bone marrow toxicity after intracarotid administration of alkylators, with or without glutathione depletion in a rat model. *Cancer research*, 61(21), 7868-7874.
- Newcombe, E. A., Camats-Perna, J., Silva, M. L., Valmas, N., Huat, T. J., & Medeiros, R. (2018). Inflammation: the link between comorbidities, genetics, and Alzheimer's disease. *Journal of neuroinflammation*, 15(1), 276.
- Newton, K., & Dixit, V. M. (2012). Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(3).
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308(5726), 1314-1318.
- Nishijima, T., Piriz, J., Duflot, S., Fernandez, A. M., Gaitan, G., Gomez-Pinedo, U., Verdugo, J. M., Leroy, F., Soya, H., Nuñez, A., & Torres-Aleman, I. (2010). Neuronal activity drives localized blood-brain-barrier transport of serum insulin-like growth factor-I into the CNS. *Neuron*, 67(5), 834-846.
- Noda, Y., Anzai, I., Suzuki, K., Higashi, T., Oyama, T., & Kamiya, T. (2013). Copper enhances APP dimerization and promotes Abeta production. *Neuroscience Letters*, 547, 10-15.
- Noshita, N., Lewén, A., Sugawara, T., & Chan, P. H. (2002). Akt phosphorylation and neuronal survival after traumatic brain injury in mice. *Neurobiology of disease*, 9(3), 294-304.
- O'Kusky, J., & Ye, P. (2012). Neurodevelopmental effects of insulin-like growth factor signaling. *Frontiers in neuroendocrinology*, 33(3), 230-251.
- Ooi, S. L., Green, R., & Pak, S. C. (2018). N-Acetylcysteine for the Treatment of Psychiatric Disorders: A Review of Current Evidence. *BioMed research international*, 2018, 2469486.
- Orre, M., Kamphuis, W., Osborn, L. M., Jansen, A. H., Kooijman, L., Bossers, K., ... & Hol, E. M. (2014). Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. *Neurobiology of Aging*, 35(12), 2746-2760.
- Oveisgharan, S., Buchman, A. S., Yu, L., Farfel, J., Hachinski, V., Gaiteri, C., et al. (2018). APOE $\epsilon 2\epsilon 4$ genotype, incident AD and MCI, cognitive decline, and AD pathology in older adults. *Neurology*, 90, e2119-e2126.

- Oyinloye, B. E., Adenowo, A. F., & Kappo, A. P. (2015). Reactive oxygen species, apoptosis, antimicrobial peptides and human inflammatory diseases. *Pharmaceuticals (Basel)*, 8(2), 151-175.
- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., ... & Gross, C. T. (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, 333(6048), 1456-1458.
- Pardini R. S. (1995). Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active pro-oxidants. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 29(2), 101-118.
- Parhizkar, S., Arzberger, T., Brendel, M., Kleinberger, G., Deussing, M., Focke, C., Nuscher, B., Xiong, M., Ghasemigharagoz, A., Katzmarski, N., Krasemann, S., Lichtenthaler, S. F., Müller, S. A., Colombo, A., Monasor, L. S., Tahirovic, S., Herms, J., Willem, M., Pettkus, N., Butovsky, O., ... Haass, C. (2019). Loss of TREM2 function increases amyloid seeding but reduces plaque-associated ApoE. *Nature neuroscience*, 22(2), 191-204.
- Park, J. C., Lim, H., Byun, M. S., Yi, D., Byeon, G., Jung, G., Kim, Y. K., Lee, D. Y., Han, S. H., & Mook-Jung, I. (2023). Sex differences in the progression of glucose metabolism dysfunction in Alzheimer's disease. *Experimental & molecular medicine*, 55(5), 1023-1032.
- Pawate, S., Shen, Q., Fan, F., & Bhat, N. R. (2004). Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferon-gamma. *Journal of neuroscience research*, 77(4), 540-551.
- Pawlas, N., Zajdel, R., Kędziora, J., Sowa-Kućma, M., & Nowak, G. (2009). Antiapoptotic and neurotrophic effects of antidepressants: A review of clinical and experimental studies. *Brain Research Bulletin*, 79(5), 248-257.
- Pekny, M., & Pekna, M. (2004). GFAP belongs to a family of intermediate filament proteins, including vimentin, nestin, and others, that primarily serve cytoarchitectural functions. *The Neuroscientist*, 10(5), 452-464.
- Pekny, M., Pekna, M., Nilsson, M., & Nilsson, G. (1995). Increased levels of GFAP in transgenic mice expressing the human neurofilament heavy gene. *Neuroscience Letters*, 197(3), 195-198.
- Pereira, T. C., Campos, M. M., & Bogo, M. R. (2016). Copper toxicology, oxidative stress and inflammation using zebrafish as experimental model. *Journal of applied toxicology: JAT*, 36(7), 876-885.
- Pérez-González, R., Alvira-Botero, M. X., Robayo, O., Antequera, D., Garzón, M., Martín-Moreno, A. M., Brera, B., de Ceballos, M. L., & Carro, E. (2014). Leptin gene therapy attenuates neuronal damages evoked by amyloid- β and rescues memory deficits in APP/PS1 mice. *Gene therapy*, 21(3), 298-308.
- Perez-Nievas, B. G., Stein, T. D., Tai, H. C., Dols-Icardo, O., Scotton, T. C., Barroeta-Espar, I. M., ... & Hyman, B. T. (2013). Dissecting phenotypic traits linked to human resilience to Alzheimer's pathology. *Brain*, 136(8), 2510-2526.
- Perlmutter, L. S., Barron, E., & Chui, H. C. (1990). Morphologic association between microglia and senile plaque amyloid in Alzheimer's disease. *Neuroscience letters*, 119(1), 32-36.
- Pfrieger, F. W. (2003). Outsourcing in the brain: do neurons depend on cholesterol delivery by astrocytes? *BioEssays*, 25(1), 72-78.
- Pfrieger, F. W., & Vitale, N. (2018). Cholesterol and the journey of extracellular vesicles. *Journal of lipid research*, 59(12), 2255-2261.
- Pike C. J. (2017). Sex and the development of Alzheimer's disease. *Journal of neuroscience research*, 95(1-2), 671-680.
- Pike C.J., Walenzewicz A.J., Glabe C.G., Cotman C.W. (1991). In vitro aging of β -amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity. *Brain Res* 563:311-314.
- Pocernich, C. B., Lange, M. L., Sultana, R., & Butterfield, D. A. (2011). Nutritional approaches to modulate oxidative stress in Alzheimer's disease. *Current Alzheimer research*, 8(5), 452-469.
- Podlesniy, P., & Trullas, R. (2017). Absolute measurement of gene transcripts with Selfie-digital PCR. *Scientific reports*, 7(1), 8328.
- Podleśny-Drabiniok, A., Marcora, E., & Goate, A. M. (2020). Microglial Phagocytosis: A Disease-Associated Process Emerging from Alzheimer's Disease Genetics. *Trends in neurosciences*, 43(12), 965-979.
- Poliani, P. L., Wang, Y., Fontana, E., Robinette, M. L., Yamanishi, Y., Gilfillan, S., & Colonna, M. (2015). TREM2 sustains microglial expansion during aging and response to demyelination. *The Journal of clinical investigation*, 125(5), 2161-2170.

- Praticò, D., Rokach, J., Lawson, J., & FitzGerald, G. A. (2004). F2-isoprostanes as indices of lipid peroxidation in inflammatory diseases. *Chemistry and physics of lipids*, 128(1-2), 165-171.
- Puglielli, L., Tanzi, R. E., Kovacs, D. M. (2005). Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nature Neuroscience*, 8(5), 580-581.
- Quan, G., Xie, C., Dietschy, J. M., & Turley, S. D. (2003). Ontogenesis and regulation of cholesterol metabolism in the central nervous system of the mouse. *Developmental Brain Research*, 146(1-2), 87-98.
- Quay JL, Reed W, Samet J, Devlin RB. Air pollution particles induce IL-6 gene expression in human airway epithelial cells via NF-kappaB activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19:98-106.
- Querol-Vilaseca, M., Colom-Cadena, M., Pegueroles, J., Nuñez-Llaves, R., Luque-Cabecerans, J., Muñoz-Llahuna, L., Andilla, J., Belbin, O., Spires-Jones, T. L., Gelpi, E., Clarimon, J., Loza-Alvarez, P., Fortea, J., & Lleó, A. (2019). Nanoscale structure of amyloid- β plaques in Alzheimer's disease. *Scientific reports*, 9(1), 5181.
- Ráčková L. (2013). Cholesterol load of microglia: contribution of membrane architecture changes to neurotoxic power?. *Archives of biochemistry and biophysics*, 537(1), 91-103.
- Raff, M. C., Whitmore, A. V., & Finn, J. T. (2002). Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5569), 868-871.
- Rahimian, R., Béliand, L.C., Kriz, J., & Gaestel, M. (2018). MAPK-associated proteins in astrocytes and glial cells. *Glia*, 66(7), 1266-1287.
- Ramos-Villegas, Y., Padilla-Zambrano, H. S., Blanco-Teherán, C. C., López-Cepeda, D., Quintana-Pájaro, L., Corrales-Santander, H., & Moscote-Salazar, L. R. (2017). N-Acetilcisteína en neuroprotección y lesión traumática cerebral: revisión de la literatura.
- Reznick, A. Z., & Packer, L. (1994). Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in enzymology*, 233, 357-363.
- Riedel, G. F. (2008). Copper. *Ecotoxicology*, 17(6), 778-783.
- Rivera, E. J., Goldin, A., Fulmer, N., Tavares, R., Wands, J. R., & de la Monte, S. M. (2005). Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 8(3), 247-268.
- Robinson, J. L., Lee, E. B., Xie, S. X., Rennert, L., Suh, E., Bredenberg, C., Caswell, C., Van Deerlin, V. M., Yan, N., Yousef, A., Hurtig, H. I., Siderowf, A., Grossman, M., McMillan, C. T., Miller, B., Duda, J. E., Irwin, D. J., Wolk, D., Elman, L., McCluskey, L., ... Trojanowski, J. Q. (2018). Neurodegenerative disease concomitant proteinopathies are prevalent, age-related and APOE4-associated. *Brain : a journal of neurology*, 141(7), 2181-2193.
- Roemgens, A., Singh, S., Beyer, C., & Arnold, S. (2011). Inducers of chemical hypoxia act in a gender- and brain region-specific manner on primary astrocyte viability and cytochrome C oxidase. *Neurotoxicity research*, 20(1), 1-14.
- Romero, A., Ramos, E., de Los Ríos, C., Egea, J., Del Pino, J., & Reiter, R. J. (2014). A review of metal-catalyzed molecular damage: protection by melatonin. *Journal of Pineal Research*, 56(4), 343-370.
- Rosario, E. R., Chang, L., Head, E. H., Stanczyk, F. Z., & Pike, C. J. (2011). Brain levels of sex steroid hormones in men and women during normal aging and in Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, 32(4), 604-613.
- Rutkowski, D. T., & Kaufman, R. J. (2004). A trip to the ER: coping with stress. *Trends in cell biology*, 14(1), 20-28.
- Ryan, J., Scali, J., Carrière, I., Amieva, H., Rouaud, O., Berr, C., Ritchie, K., & Ancelin, M. L. (2014). Impact of a premature menopause on cognitive function in later life. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*, 121(13), 1729-1739.
- Sajja, V. S., Hlavac, N., & VandeVord, P. J. (2016). Role of Glia in Memory Deficits Following Traumatic Brain Injury: Biomarkers of Glia Dysfunction. *Frontiers in integrative neuroscience*, 10, 7.
- Sakashita, N., Miyazaki, A., Takeya, M., & Horiuchi, S. (2000). Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase 1 blockage enhances foam cell death in atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 20(10), 2286-2292.
- Samuni, Y., Goldstein, S., Dean, O. M., & Berk, M. (2013). The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(8), 4117-4129.
- Santos-Galindo, M., Acáz-Fonseca, E., Bellini, M. J., & Garcia-Segura, L. M. (2011). Sex differences in the inflammatory response of primary astrocytes to lipopolysaccharide. *Biology of sex differences*, 2, 7.

- Scheff, S. W., & Price, D. A. (2001). Alzheimer's disease-related synapse loss in the cingulate cortex. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 3(5), 495–505.
- Scheiber, I. F., Mercer, J. F., & Dringen, R. (2010). Copper accumulation by cultured astrocytes. *Neurochemistry international*, 56(3), 451–460.
- Schiera, G., Di Liegro, C. M., & Di Liegro, I. (2015). Extracellular membrane vesicles as vehicles for brain cell-to-cell interactions in physiological as well as pathological conditions. *BioMed Research International*, 2015, 152926.
- Schilling, T., & Eder, C. (2011). Amyloid- β -induced reactive oxygen species production and priming are differentially regulated by ion channels in microglia. *Journal of cellular physiology*, 226(12), 3295–3302.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*, 9(7), 676–682.
- Schmid, S., Rammes, G., Blobner, M., Kellermann, K., Bratke, S., Fendl, D., Kaichuan, Z., Schneider, G., & Jungwirth, B. (2019). Cognitive decline in Tg2576 mice shows sex-specific differences and correlates with cerebral amyloid-beta. *Behavioural brain research*, 359, 408–417.
- Schmid, S., Willem, M., & Haass, C. (2018). Dysfunction of mitochondria in human brain aging and Alzheimer's disease: recent advances. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 88, 34–40.
- Schreurs B. G. (2013). Cholesterol and copper affect learning and memory in the rabbit. *International journal of Alzheimer's disease*, 2013, 518780.
- Schumacher, M., Weill-Engerer, S., Liere, P., Robert, F., Franklin, R. J., Garcia-Segura, L. M., Lambert, J. J., Mayo, W., Melcangi, R. C., Paudyal, A., Suter, U., Carelli, C., Baulieu, E. E., & Akwa, Y. (2003). Steroid hormones and neurosteroids in normal and pathological aging of the nervous system. *Progress in neurobiology*, 71(1), 3–29.
- Segatto, M., Di Giovanni, A., Marino, M., & Pallottini, V. (2013). Analysis of the protein network of cholesterol homeostasis in different brain regions: an age and sex dependent perspective. *Journal of cellular physiology*, 228(7), 1561–1567.
- Segatto, M., Di Giovanni, A., Marino, M., & Pallottini, V. (2014). Analysis of cholesterol homeostasis in the central nervous system following brain injury. *Journal of neurochemistry*, 128(1), 58–71.
- Selkoe, D., & Kopan, R. (2003). Notch and Presenilin: regulated intramembrane proteolysis links development and degeneration. *Annual review of neuroscience*, 26, 565–597.
- Selkoe, D. J., & Hardy, J. (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, 8(6), 595–608.
- Selles, M. C., Fortuna, J. T. S., Zappa-Villar, M. F., de Faria, Y. P. R., Souza, A. S., Suemoto, C. K., Leite, R. E. P., Rodriguez, R. D., Grinberg, L. T., Reggiani, P. C., & Ferreira, S. T. (2020). Adenovirus-Mediated Transduction of Insulin-Like Growth Factor 1 Protects Hippocampal Neurons from the Toxicity of A β Oligomers and Prevents Memory Loss in an Alzheimer Mouse Model. *Molecular neurobiology*, 57(3), 1473–1483. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01827-y>
- Seo, E., Kang, H., Choi, H., Choi, W., Jun, H. S. (2019). Reactive Oxygen Species-Induced Changes in Glucose and Lipid Metabolism Contribute to the Accumulation of Cholesterol in the Liver during Aging. *Aging Cell*, 18, e12895.
- Seo, K., & Shin, S. M. (2017). Induction of Lipin1 by ROS-dependent SREBP-2 activation. *Toxicological Research*, 33(3), 197–202.
- Serrano-Pozo, A., Muzikansky, A., Gomez-Isla, T., Growdon, J. H., Betensky, R. A., Frosch, M. P., & Hyman, B. T. (2013). Differential relationships of reactive astrocytes and microglia to fibrillar amyloid deposits in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 72(6), 462–471.
- Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J., & Swindlehurst, C. (1992). Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature*, 359(6393), 325–327.
- Shankar GM, Li S, Mehta TH, et al. (2008). Amyloid- β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature Medicine*, 14(8), 837–842.
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., Zhuang, Y., Cai, T., Wang, F., & Shao, F. (2015). Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*, 526(7575), 660–665.

- Sierra, A., Abiega, O., Shahraz, A., & Neumann, H. (2013). Janus-faced microglia: beneficial and detrimental consequences of microglial phagocytosis. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, 6.
- Sierri, G., Dal Magro, R., Vergani, B., Leone, B. E., Formicola, B., Taiarol, L., ... & Ferrari, A. (2021). Reduced Levels of ABCA-1 Transporter Are Responsible for the Cholesterol Efflux Impairment in β -Amyloid-Induced Reactive Astrocytes: Potential Rescue from Biomimetic HDLs. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8).
- Silverman, J. M., Christy, D., Shyu, C. C., Moon, K. M., Fernando, S., Gidden, Z., Cowan, C. M., Ban, Y., Stacey, R. G., Grad, L. I., McAlary, L., Mackenzie, I. R., Foster, L. J., & Cashman, N. R. (2019). CNS-derived extracellular vesicles from superoxide dismutase 1 (SOD1)^{G93A} ALS mice originate from astrocytes and neurons and carry misfolded SOD1. *The Journal of biological chemistry*, 294(10), 3744–3759.
- Simons, M., Keller, P., De Strooper, B., Beyreuther, K., Dotti, C. G., & Simons, K. (1998). Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(11), 6460–6464.
- Simpson, D. S. A., & Oliver, P. L. (2020). ROS Generation in Microglia: Understanding Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(8), 743.
- Singh, I., Sagare, A. P., Coma, M., Perlmutter, D., Gelein, R., Bell, R. D., ... Zlokovic, B. V. (2013). Low levels of copper disrupt brain amyloid-beta homeostasis by altering its production and clearance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(36), 14771–14776.
- Sisodia, S.S. (1992). β -amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 6075–6079.
- Smith, C. D., Carney, J. M., Starke-Reed, P. E., Oliver, C. N., Stadtman, E. R., Floyd, R. A., & Markesbery, W. R. (1991). Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(23), 10540–10543.
- Snipes, G. J., & Orfali, W. (1998). Cholesterol and myelin. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 52(9), 362–367.
- Sofroniew, M. V. (2015). Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(9), 1–16.
- Sokolov, Y., Kozak, J. A., Kaye, R., Chanturiya, A., Glabe, C., & Hall, J. E. (2006). Soluble amyloid oligomers increase bilayer conductance by altering dielectric structure. *The Journal of general physiology*, 128(6), 637–647.
- Solé-Domènech, S., Cruz, D. L., Capetillo-Zarate, E., & Maxfield, F. R. (2016). The endocytic pathway in microglia during health, aging and Alzheimer's disease. *Ageing research reviews*, 32, 89–103.
- Solito, E., & Sastre, M. (2012). Microglia function in Alzheimer's disease. *Frontiers in pharmacology*, 3, 14.
- Solheiro-Villavicencio, H., & Rivas-Arancibia, S. (2018). Effect of chronic oxidative stress on neuroinflammatory response mediated by CD4+T cells in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 114.
- Sollvander, S., Nikitidou, E., Brolin, R., Soderberg, L., Sehlin, D., Lannfelt, L., & Erlandsson, A. (2016). Accumulation of amyloid- β by astrocytes result in enlarged endosomes and microvesicle-induced apoptosis of neurons. *Molecular Neurodegeneration*, 11(1), 38.
- Sonntag, W. E., Ramsey, M., & Carter, C. S. (2005). Growth hormone and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and their influence on cognitive aging. *Ageing research reviews*, 4(2), 195–212.
- Sparks, D. L. (2008). Coronary artery disease, hypertension, ApoE, and cholesterol: a link to Alzheimer's disease? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147, 118–121.
- Sparks, D. L., & Schreurs, B. G. (2003). Trace amounts of copper in water induce β -amyloid plaques and learning deficits in a rabbit model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(19), 11065–11069.
- Speisky, H., Gómez, M., Burgos-Bravo, F., López-Alarcón, C., Jullian, C., Olea-Azar, C., & Aliaga, M. E. (2009). Generation of superoxide radicals by copper-glutathione complexes: redox-consequences associated with their interaction with reduced glutathione. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(5), 1803–1810.
- Squitti, R. (2012). Copper Dysfunction in Alzheimer's Disease: From Meta-Analysis of Biochemical Studies to New Insight into Genetics. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 26, 93–96.

- Squitti, R., Lupoi, D., Pasqualetti, P., Forno, G. D., Vernieri, F., Chiovena, P., ... & Rossini, P. M. (2008). Elevation of serum copper levels in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 422(2), 76–80.
- Squitti, R., Pasqualetti, P., Dal Forno, G., Moffa, F., Cassetta, E., Lupoi, D., Vernieri, F., Rossi, L., Baldassini, M., & Rossini, P. M. (2005). Excess of serum copper not related to ceruloplasmin in Alzheimer disease. *Neurology*, 64(6), 1040–1046.
- Squitti, R., Polimanti, R., Siotto, M., Bucossi, S., Ventriglia, M., Mariani, S., Vernieri, F., Tardiolo, G., Rongioletti, M., Zanetti, O., Pasqualetti, P., Rossini, P. M., & Boccardi, V. (2014). Meta-analysis of serum non-ceruloplasmin copper in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 38(4), 809–822.
- Steen, E., Terry, B. M., Rivera, E. J., Cannon, J. L., Neely, T. R., Tavares, R., Xu, X. J., Wands, J. R., & de la Monte, S. M. (2005). Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes?. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 7(1), 63–80. <https://doi.org/10.3233/jad-2005-7107>
- Stence, N., Waite, M., & Dailey, M. E. (2001). Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia*, 33(3), 256–266.
- Stine, W. B., Jr, Dahlgren, K. N., Krafft, G. A., & LaDu, M. J. (2003). In vitro characterization of conditions for amyloid-beta peptide oligomerization and fibrillogenesis. *The Journal of biological chemistry*, 278(13), 11612–11622.
- Stone, S., & Lin, W. (2015). The unfolded protein response in multiple sclerosis. *Frontiers in neuroscience*, 9, 264.
- Storck, S. E., Meister, S., Nahrath, J., Meißner, J. N., Schubert, N., Di Spiezio, A., Baches, S., Vandenbroucke, R. E., Bouter, Y., Prikulis, I., Korth, C., Weggen, S., Heimann, A., Schwaninger, M., Bayer, T. A., & Pietrzik, C. U. (2016). Endothelial LRP1 transports amyloid-β(1–42) across the blood-brain barrier. *The Journal of clinical investigation*, 126(1), 123–136.
- Streltsov, V. A., Titmuss, S. J., & Kostyukova, A. S. (2008). The structure of the amyloid-beta peptide high-affinity copper II binding site in Alzheimer disease. *Biophysical journal*, 95(8), 3447–3456.
- Stutzmann, G. E., Smith, I., Caccamo, A., Oddo, S., Parker, I., & Laferla, F. (2007). Enhanced ryanodine-mediated calcium release in mutant PS1-expressing Alzheimer's mouse models. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1097, 265–277.
- Sun, D., Hu, X., Liu, X., Whitaker, J. N., & Walker, W. S. (1997). Expression of chemokine genes in rat glial cells: the effect of myelin basic protein-reactive encephalitogenic T cells. *Journal of neuroscience research*, 48(3), 192–200.
- Sun L. Y. (2006). Hippocampal IGF-1 expression, neurogenesis and slowed aging: clues to longevity from mutant mice. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 29(2), 181–189.
- Sun, R., Zhang, L. Y., Chen, L. S., & Tian, Y. (2016). Long-term outcome of changes in cognitive function of young rats after various/different doses of whole brain irradiation. *Neurological research*, 38(7), 647–654.
- Svensson, C. I., Nguyen, N. X., & Wickström, T. (2003). Molecular and cellular mechanisms of copper homeostasis and cytotoxicity: insights from mammalian cultured cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 192(3), 191–199.
- Sweeney, P., Park, H., Baumann, M., Dunlop, J., Frydman, J., Kopito, R., McCampbell, A., Leblanc, G., Venkateswaran, A., Nurmi, A., & Hodgson, R. (2017). Protein misfolding in neurodegenerative diseases: implications and strategies. *Translational neurodegeneration*, 6, 6.
- Takahashi, K., Rochford, C. D., & Neumann, H. (2005). Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *Journal of Experimental Medicine*, 201(4), 647–657.
- Tang, J., Yu, W., Chen, S., Gao, Z., & Xiao, B. (2018). Microglia Polarization and Endoplasmic Reticulum Stress in Chronic Social Defeat Stress Induced Depression Mouse. *Neurochemical research*, 43(5), 985–994.
- Tsang, T., Davis, C. I., & Brady, D. C. (2021). Copper biology. *Current biology: CB*, 31(9), R421–R427.
- Thathiah, A., & De Strooper, B. (2011). The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. *Nature reviews. Neuroscience*, 12(2), 73–87.
- Tolar, M., Hey, J., Power, A., & Abushakra, S. (2021). Neurotoxic Soluble Amyloid Oligomers Drive Alzheimer's Pathogenesis and Represent a Clinically Validated Target for Slowing Disease Progression. *International journal of molecular sciences*, 22(12), 6355.
- Torres-Aleman I. (1999). Insulin-like growth factors as mediators of functional plasticity in the adult brain. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*, 31(2–3), 114–119.

- Torres-Aleman I. (2012). Insulin-like growth factor-1 and central neurodegenerative diseases. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 4(2), 395–vii.
- Torres-Ramos, M. A., & Morales-López, B. I. (2022). Neuroinflammation mediated by astrocytes in aging and neurodegeneration through nuclear factor κB and aryl hydrocarbon receptor. *Enneurobiología* 13(32):180722.
- Trueba-Sáiz, A., Cavada, C., Fernandez, A. M., Leon, T., González, D. A., Fortea Ormaechea, J., Lleó, A., Del Ser, T., Nuñez, A., & Torres-Aleman, I. (2013). Loss of serum IGF-1 input to the brain as an early biomarker of disease onset in Alzheimer mice. *Translational psychiatry*, 3(12), e330.
- Tschopp, J., & Schroder, K. (2010). NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production?. *Nature reviews Immunology*, 10(3), 210–215.
- Urrutia, P., Aguirre, P., Esparza, A., Tapia, V., Mena, N. P., Arredondo, M., González-Billault, C., & Núñez, M. T. (2013). Inflammation alters the expression of DMT1, FPN1 and hepcidin, and it causes iron accumulation in central nervous system cells. *Journal of neurochemistry*, 126(4), 541–549.
- Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. T. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry*, 12(10), 1161–1208.
- Van Muiswinkel, F. L., Veerhuis, R., & Eikelenboom, P. (1996). Amyloid beta protein primes cultured rat microglial cells for an enhanced phorbol 12-myristate 13-acetate-induced respiratory burst activity. *Journal of neurochemistry*, 66(6), 2468–2476.
- Varadarajan, S., Yatin, S., Kanski, J., Jahanshahi, F., & Butterfield, D.A. (1999). Methionine residue 35 is important in amyloid β-peptide-associated free radical oxidative stress. *Brain Research Bulletin*, 50, 133–141.
- Venneti, S., Wiley, C. A., & Kofler, J. (2009). Imaging microglial activation during neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 4(2), 227–243.
- Viña, J., & Lloret, A. (2010). Why women have more Alzheimer's disease than men: gender and mitochondrial toxicity of amyloid-beta peptide. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(Suppl 2), S527–S533.
- Vicente-Gutierrez, C., Bonora, N., Bobo-Jimenez, V., Jimenez-Blasco, D., Lopez-Fabuel, I., Fernandez, E., Josephine, C., Bonvento, G., Enriquez, J. A., Almeida, A., & Bolaños, J. P. (2019). Astrocytic mitochondrial ROS modulate brain metabolism and mouse behaviour. *Nature metabolism*, 1(2), 201–211.
- Vincent, A. J., Gasperini, R., Foa, L., Small, D. H. (2010). Astrocytes in Alzheimer's disease: Emerging roles in calcium dysregulation and synaptic plasticity. *Journal of Alzheimer's Disease*, 22, 699–714.
- Volles, M. J., Lee, S. J., Rochet, J. C., Shtilerman, M. D., Ding, T. T., Kessler, J. C., & Lansbury, P. T., Jr (2001). Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry*, 40(26), 7812–7819.
- von Rotz, R. C., Kohli, B. M., Bosset, J., Meier, M., Suzuki, T., Nitsch, R. M., & Konietzko, U. (2004). The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *Journal of cell science*, 117(Pt 19), 4435–4448.
- Von Studnitz, W., & Berezin, D. (1958). Studies on serum copper during pregnancy, during the menstrual cycle, and after the administration of oestrogens. *Acta Endocrinologica*, 27, 245–252.
- Walsh, D. M., Hartley, D. M., Condon, M. M., Selkoe, D. J., & Teplow, D. B. (2001). In vitro studies of amyloid beta-protein fibril assembly and toxicity provide clues to the aetiology of Flemish variant (Ala692-->Gly) Alzheimer's disease. *The Biochemical journal*, 355(Pt 3), 869–877.
- Wang, D. D. (2014). New Insights into the Relationship between Cholesterol, Statins, and Alzheimer's Disease. *Journal of Geriatric Cardiology*, 11(2), 137–144.
- Wang, H., Kulas, J. A., Wang, C., Holtzman, D. M., Ferris, H. A., & Hansen, S. B. (2021). Regulation of beta-amyloid production in neurons by astrocyte-derived cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(33), e2102191118.
- Wang, J., Tanila, H., Puoliväli, J., Kadish, I., van Groen, T., & Iivonen, S. (2003). Gender differences in the amount and deposition of amyloid β in APP^{Swe} and PS1 double transgenic mice. *Neurobiology of Disease*, 14(3), 318–327.
- Wang, Y., Cella, M., Mallinson, K., Ulrich, J. D., Young, K. L., Robinette, M. L., ... & Colonna, M. (2015). TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model. *Cell*, 160(6), 1061–1071.
- Wang, Y., Ulland, T. K., Ulrich, J. D., Song, W., Tzaferis, J. A., Hole, J. T., ... & Holtzman, D. M. (2016). TREM2-mediated early microglial response limits diffusion and toxicity of amyloid plaques. *Journal of Experimental Medicine*, 213(5), 667–675.

- Wahrle, S., Das, P., Nyborg, A. C., McLendon, C., Shoji, M., Kawarabayashi, T., Younkin, L. H., Younkin, S. G., & Golde, T. E. (2002). Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains. *Neurobiology of disease*, 9(1), 11–23.
- Wei, H., Zhang, W. J., Leboeuf, R., & Frei, B. (2014). Copper induces--and copper chelation by tetrathiomolybdate inhibits--endothelial activation in vitro. *Redox Report*, 19(1), 40–48.
- Weidemann, A., Eggert, S., Reinhard, F. B., Vogel, M., Paliga, K., Baier, G., Masters, C. L., Beyreuther, K., & Evin, G. (2002). A novel epsilon-cleavage within the transmembrane domain of the Alzheimer amyloid precursor protein demonstrates homology with Notch processing. *Biochemistry*, 41(8), 2825–2835.
- Werstuck, G. H., Lentz, S. R., Dayal, S., Hossain, G. S., Sood, S. K., Shi, Y. Y., Zhou, J., Maeda, N., Krisans, S. K., Malinow, M. R., & Austin, R. C. (2001). Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *The Journal of clinical investigation*, 107(10), 1263–1273.
- Werther, G. A., Cheesman, H., & Russo, V. (1993). Olfactory bulb organ culture is supported by combined insulin-like growth factor-I and basic fibroblast growth factor. *Brain research*, 617(2), 339–342.
- Westwood, A. J., Beiser, A., Decarli, C., Harris, T. B., Chen, T. C., He, X. M., Roubenoff, R., Pikula, A., Au, R., Braverman, L. E., Wolf, P. A., Vasan, R. S., & Seshadri, S. (2014). Insulin-like growth factor-1 and risk of Alzheimer dementia and brain atrophy. *Neurology*, 82(18), 1613–1619.
- Wheeler, M. A., & Quintana, F. J. (2019). Regulation of Astrocyte Functions in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 9(1), a029009.
- Wolozin B. (2001). A fluid connection: cholesterol and Abeta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(10), 5371–5373.
- Wolozin B. (2004). Cholesterol, statins and dementia. *Current opinion in lipidology*, 15(6), 667–672.
- Wu, P. J., Hung, Y. F., Liu, H. Y., & Hsueh, Y. P. (2017). Deletion of the Inflammasome Sensor Aim2 Mitigates A β Deposition and Microglial Activation but Increases Inflammatory Cytokine Expression in an Alzheimer Disease Mouse Model. *Neuroimmunomodulation*, 24(1), 29–39.
- Wu, W. H., Leung, P. O., Ma, D. L., Yan, S. C., Zhu, N., Abagyan, R., & Wong, K. Y. (2008). Sequestration of copper from beta-amyloid promotes selective lysis by cyclen-hybrid cleavage agents. *Journal of Biological Chemistry*, 283(46), 31657–31664.
- Wüstner, D., & Solanko, L. M. (2005). Cholesterol esterification and lipolysis in hippocampal neurons. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1736(2), 177–189.
- Wyss-Coray, T., & Rogers, J. (2012). Inflammation in Alzheimer disease—a brief review of the basic science and clinical literature. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(1), a006346.
- Xia, C. Y., Zhang, S., Gao, Y., Wang, Z. Z., & Chen, N. H. (2015). Selective modulation of microglia polarization to M2 phenotype for stroke treatment. *International immunopharmacology*, 25(2), 377–382.
- Xiao, H., Lu, M., Lin, T. Y., Chen, Z., Chen, G., Wang, W. C., Marin, T., Shentu, T. P., Wen, L., Gongol, B., Sun, W., Liang, X., Chen, J., Huang, H. D., Pedra, J. H., Johnson, D. A., & Shyy, J. Y. (2013). Sterol regulatory element binding protein 2 activation of NLRP3 inflammasome in endothelium mediates hemodynamic-induced atherosclerosis susceptibility. *Circulation*, 128(6), 632–642.
- Xiong, H., Callaghan, D., Jones, A., Walker, D. G., Lue, L.-F., Beach, T. G., ... Zhang, W. (2008). Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high β - and γ -secretase activities and A β production. *Neurobiology of Disease*, 29, 422–437.
- Xu, P., Qu, J. M., Xu, J. F., Zhang, J., Jiang, H. N., & Zhang, H. J. (2009). NAC is associated with additional alleviation of lung injury induced by invasive pulmonary aspergillosis in a neutropenic model. *Acta pharmacologica Sinica*, 30(7), 980–986.
- Xu, R., Greening, D. W., Zhu, H. J., Takahashi, N., & Simpson, R. J. (2016). Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application. *The Journal of clinical investigation*, 126(4), 1152–1162.
- Xue, L., Qi, H., Zhang, H., Ding, L., Huang, Q., Zhao, D., ... & Li, B. (2020). Targeting SREBP-2-Regulated Mevalonate Metabolism for Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology*, 10, 1510.
- Yagi K (1976). A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med*15:212–6.

- Yan, H., Mitschelen, M., Bixler, G. V., Brucklacher, R. M., Farley, J. A., Han, S., Freeman, W. M., & Sonntag, W. E. (2011). Circulating IGF-1 regulates hippocampal IGF-1 levels and brain gene expression during adolescence. *The Journal of endocrinology*, 211(1), 27–37.
- Yang, J., Cheng, D., & Tu, Y. (2016). Cholesterol in the metabolism of tumors and immune cells. *Progress in lipid research*, 61, 73–87.
- Yang, S., Yang, Y., Wang, F., Luo, Q., Zhang, Y., Zheng, F., Shu, Q., Chen, Q., & Fang, X. (2021). TREM2 Dictates Antibacterial Defense and Viability of Bone Marrow-derived Macrophages during Bacterial Infection. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 65(2), 176–188.
- Yang, Y., & Rosenberg, G. A. (2015). Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for stroke. *Brain Research*, 1623, 30–38.
- Ye, P., Lee, K. H., & D'Ercole, A. J. (2000). Insulin-like growth factor-I (IGF-I) protects myelination from undernutritional insult: studies of transgenic mice overexpressing IGF-I in brain. *Journal of neuroscience research*, 62(5), 700–708.
- Ye, P., Hu, Q., Liu, H., Yan, Y., & D'Ercole, A. J. (2010). beta-catenin mediates insulin-like growth factor-I actions to promote cyclin D1 mRNA expression, cell proliferation and survival in oligodendroglial cultures. *Glia*, 58(9), 1031–1041.
- Yeh, F. L., Wang, Y., Tom, I., Gonzalez, L. C., Sheng, M., & TREM2, M. (2016). Microglial enhancing receptor 2 (TREM2) binds to apolipoproteins, including APOE and CLU/APOJ, and thereby facilitates uptake of amyloid- β by microglia. *Neuron*, 91(2), 328–340.
- Yu, F., Gong, P., Hu, Z., Qiu, Y., Cui, Y., Gao, X., Chen, H., & Li, J. (2015). Cu(II) enhances the effect of Alzheimer's amyloid- β peptide on microglial activation. *Journal of neuroinflammation*, 12, 122.
- Yu, Y., Ye, R. D. (2015). Microglial A β Receptors in Alzheimer's Disease. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 35, 71–83.
- Yuan, P., Condello, C., Keene, C. D., Wang, Y., Bird, T. D., Paul, S. M., Luo, W., Colonna, M., Baddeley, D., & Grutzendler, J. (2016). TREM2 Haplodeficiency in Mice and Humans Impairs the Microglia Barrier Function Leading to Decreased Amyloid Compaction and Severe Axonal Dystrophy. *Neuron*, 90(4), 724–739.
- Zafar, A., Singh, S., & Naseem, I. (2016). Cu(II)-coumestrol interaction leads to ROS-mediated DNA damage and cell death: a putative mechanism for anticancer activity. *The Journal of nutritional biochemistry*, 33, 15–27.
- Zemva, J., & Schubert, M. (2014). The role of neuronal insulin/insulin-like growth factor-1 signaling for the pathogenesis of Alzheimer's disease: possible therapeutic implications. *CNS & neurological disorders drug targets*, 13(2), 322–337.
- Zhao, J., O'Connor, T., Vassar, R., & Lamanna, J. C. (2011). The structure and function of the amyloid precursor protein: Like father like son. *Current Alzheimer Research*, 8(8), 807–818.
- Zheng, D., Liwinski, T., & Elinav, E. (2020). Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms. *Cell discovery*, 6, 36.
- Zhou, L., & Keane, R. W. (2011a). Transforming growth factor-beta inhibits microglial induction of VCAM-1 and inflammatory responses: a signal transduction pathway mediated by ADAM17. *Journal of Biological Chemistry*, 286(44), 37460–37470.
- Zhou, R., Yazdi, A. S., Menu, P., & Tschopp, J. (2011b). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*, 469(7329).
- Zubillaga, M., Rosa, D., Astiz, M., Triccerri, M. A., & Arnal, N. (2022). Effect of Sublethal Copper Overload on Cholesterol De Novo Synthesis in Undifferentiated Neuronal Cells. *ACS omega*, 7(29), 25022–25030.