



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
Departamento de Química Biológica

**Contribución de la Unidad Neurovascular a la neurodegeneración
en la enfermedad de Alzheimer. Potencial rol terapéutico de
Galectina-1.**

Tesis presentada para optar al título de

Doctora de la Universidad de
Buenos Aires en el área de Química Biológica.

Licenciada Jessica Lorena Presa

Directora de Tesis: Dra. Flavia Eugenia Saravia

Codirector: Dr. Gabriel Adrián Rabinovich

Consejero de Estudios: Dr. Eduardo Tomás Cánepa.

Lugar de trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME) & Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires (UBA).

Buenos Aires, 2024

Agradecimientos

A mi Directora, Flavia, por su inmensa guía. Un honor aprender de una gran científica y persona. Te agradezco por la confianza en mi trabajo y en mi crecimiento. Por ayudarme a capitalizar los errores y los momentos difíciles. Por el acompañamiento y la comprensión.

Al gran equipo de Neurobiología del Envejecimiento. Quienes siempre estuvieron, Charly y Juan. Quien estaba y volvió, Melisa. Quienes llegaron, Nico, Melina y Lucho. Y aquellas que ya no forman parte, pero siempre serán del equipo, Angie y Amal. Gracias a todos ustedes por compartir objetivos, conocimientos, experiencias, risas, mates. Gracias por el apoyo y la enseñanza mutua.

A mi co-Director Gabriel, por su confianza en el proyecto, en mí y en el laboratorio. Por su calidez humana y motivación científica.

A mis colaboradores, y a todas las personas de las que aprendí a raíz de preguntas, experimentos (fallidos) y discusiones científicas durante mi Doctorado, especialmente a la Dra Jessica Filosa que me recibió en su laboratorio.

A toda mi familia, Presa y Rivas, por el amor y por saber atravesar dificultades juntas. Son una gran fuerza para mí. Especialmente agradezco a mis viejos por su crianza: el cariño, las posibilidades, la confianza y la libertad, que me permitieron elegir mi camino siempre.

A mis amigues. Por alentarme, por acompañarme, por tratar de entender qué significaba hacer un doctorado. Y aquellas amigues en la misma, por las alegrías y las angustias compartidas. En especial a Mica, Co, Chris y Andre.

A mí, por la perseverancia, el esfuerzo, y haber podido escucharme a mí misma. Por cuidar mi salud mental y física, para poder hacer mi trabajo contenta. Por haber pedido ayuda cuando la necesitaba.

Realmente agradezco haber podido acceder a herramientas de salud mental. A mi psicóloga, Marianela, por la inmensa ayuda y acompañamiento durante los últimos 5 años, por ayudarme a ganar las herramientas que hoy me permiten no sólo terminar el doctorado, sino entender

mejor lo que me rodea y a mí misma. A mis psiquiatras, por entenderme, guiar me y salvarme de que nunca me quede sin inhibidores de la recaptación de serotonina y reguladores de estimulación nerviosa.

A Agasta, mi gata. Por ser mi animal de compañía durante la pandemia, por bancarse que la traiga al mejor país y el cariño exagerado.

A Gus, mi amor, mi compañero. Desde siempre potenciándome, y también aprendiendo y creciendo juntos. Tu apoyo fue indispensable para mi dedicación a esta Tesis.

A Exactas. A la Universidad de Buenos Aires. A la Universidad Pública. A la Argentina y su aparato científico.

Esta Tesis se la dedico a quienes comparten que hacer Ciencia Argentina debe ser un proyecto de país. A quienes defienden la Educación pública argentina, gratuita y de calidad.

A mis abuelas y a mis hermanas, a quienes amo infinitamente.

A Gus, siempre.

Y a mí.

Índice

Contenido

Agradecimientos	2
Índice	5
Resumen	8
Abstract.....	10
Publicaciones.....	12
Abreviaturas.....	14
Introducción	15
Breve historia de las enfermedades neuropsicológicas	16
Enfermedad de Alzheimer	20
Modelos animales para el estudio de la EA	32
El hipocampo.....	34
Unidad Neurovascular	39
Vías de eliminación de A _β y sus implicaciones en la patogénesis de la EA.....	53
Inflamación y vasculatura en la EA.....	54
Proteostasis.....	56
Galectinas	61
Objetivos.....	68
Resultados	72
Parte 1	73
<i>Memoria espacial y depósitos amiloideos del hipocampo de ratones PDAPPJ20. Efecto del tratamiento con Galectina-1.</i>	73

Parte 2	80
<i>Alteraciones vasculares en hipocampo de ratones PDAPPJ20 y efecto del tratamiento con Galectina-1.</i>	80
Parte 3.	84
<i>Alteraciones gliales y en la comunicación astroglia-endotelio en hipocampo de ratones PDAPPJ20. Efecto del tratamiento con Galectina-1.....</i>	84
Parte 4.	90
<i>Impacto de Aβ 1-40 fibrilar sobre células endoteliales de microvasculatura cerebral humana in vitro. Efecto del tratamiento con Galectina-1.</i>	90
Parte 6.	106
<i>Mecanismos de inflamación y apoptosis en células endoteliales de microvasculatura cerebral humana inducido por Aβ. Efecto del tratamiento con Galectina-1.</i>	106
Parte 7.	112
<i>Análisis de transcriptómica de hipocampo completo de ratones PDAPPJ20 transgénicos y no transgénicos tratados con Galectina-1</i>	112
1. Gal1 mejoró la función cognitiva y neuronal en ratones PDAPPJ20	125
2. Gal1 disminuyó el A β parenquimático y el A β vascular en el hipocampo de ratones PDAPPJ20	129
3. Gal1 moduló la respuesta inflamatoria y metabólica en la EA experimental	133
4. Gal1 contrarrestó alteraciones vasculares y perivasculares en el hipocampo de ratones PDAPPJ20	137
5. Gal1 atenuó las alteraciones endoteliales en la EA experimental.	144
6. Gal1 restauró mecanismos de proteostasis e inflamación en la EA experimental.....	148
Alcances y limitaciones del trabajo	156

Metodología Experimental	164
Experimentos <i>in vivo</i>	165
Experimentos <i>in vitro</i>	176
Análisis estadístico	186
Bibliografía.....	188

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es uno de los mayores desafíos actuales de la salud pública, con una prevalencia en constante aumento y sin cura. La EA se caracteriza por depósitos insolubles del péptido β -amiloide ($A\beta$) tanto de localización parenquimática como vascular, así como la presencia de ovillos neurofibrilares de la proteína tau hiperfosforilada. Esto se acompaña de neuroinflamación, gliosis reactiva y el aumento de permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE). Dichos eventos suelen presentarse en etapas tempranas de la EA y afectan la eliminación de $A\beta$, lo que sugiere una necesidad de explorar los mecanismos subyacentes como posibles blancos terapéuticos de la enfermedad.

Las galectinas, proteínas de tipo lectina que reconocen unidades de N-acetil-lactosamina en glicoconjungados celulares, desempeñan un papel crucial en la regulación de procesos fisiopatológicos como la respuesta inmune, la fibrosis y el cáncer. Se ha descrito la expresión de algunas galectinas en diversos tipos celulares del sistema nervioso central. La galectina 1 (Gal1) ha destacado por sus propiedades protectoras en modelos de enfermedades neurodegenerativas y de lesión cerebral, dadas en gran medida por sus cualidades inmunomodulatorias.

El objetivo de esta Tesis fue estudiar las alteraciones estructurales y funcionales de la microvasculatura cerebral del hipocampo -estructura cerebral implicada en la EA- y evaluar el potencial terapéutico de Gal1 en modelos experimentales. Para ello se utilizaron ratones transgénicos de la cepa PDAPPJ20, que modeliza la EA familiar, los cuales recibieron un tratamiento con Gal1 recombinante a los 12 meses, estadio sintomático de la patología. Se demostró que este tratamiento logró restaurar el desempeño cognitivo de ratones transgénicos, evaluado mediante pruebas conductuales de memoria espacial asociada al hipocampo, y disminuir tanto depósitos amiloideos en el parénquima cerebral como los depósitos vasculares, las marcas histopatológicas más prominentes de la EA en el modelo experimental utilizado. Por otro lado, Gal1, en el hipocampo de ratones transgénicos, fue capaz de restablecer la integridad de la barrera hematoencefálica, evidenciada por un ensayo de permeabilidad con *Evans Blue*, y recuperar las interacciones clave entre los astrocitos y el endotelio en la unidad neurovascular promoviendo la restauración de los contactos físicos y la localización perivascular de la proteína canal de agua astrocítica AQP4. Por otro lado, se observó la presencia de Gal1 endógena sobre la vasculatura del hipocampo en los ratones transgénicos.

A su vez, se evaluó el efecto protector directo de Gal1 sobre células endoteliales de microvasculatura cerebral humana expuestas a $A\beta$ 1-40 *in vitro*. Se determinó la recuperación de la integridad de la monocapa endotelial tras el tratamiento con Gal1, evaluada por el monitoreo de la resistencia eléctrica

transendotelial, lo que se vería acompañado de un recobro de la proteína de unión estrecha ocludina en los contactos célula-célula. Los mecanismos de eliminación de A β podrían encontrarse afectados por alteraciones en la proteostasis celular, por lo que se estudiaron las vías del estrés reticular. Las vías de estrés de retículo endoplásmico PERK e IRE1 α se vieron significativamente activadas en células endoteliales expuestas a A β , así como los niveles proteicos del sensor BIP y el factor XBP1, denotando la implicancia de esta respuesta celular. *In vivo*, se comprobó una disminución de la proteína XBP1 de localización vascular. Además, las células endoteliales expuestas a A β en presencia de Gal1 mostraron inhibición de los mecanismos inflamatorios asociados a la respuesta de estrés reticular, disminuyendo la expresión del componente del inflamasoma NLRP3 y la activación del factor de transcripción proinflamatorio NF κ B. Los cambios fenotípicos descritos en esas células no indujeron muerte celular, lo que se exploró por ensayo de MTT y expresión de inductor de apoptosis CHOP. Estos resultados sugieren que Gal1 rescata la inducción de la respuesta al estrés de retículo endoplásmico en células endoteliales expuestas a péptidos amiloides, promoviendo un efecto antiinflamatorio. Además, el análisis transcriptómico del hipocampo de ratón corroboró los resultados experimentales al demostrar la recuperación de los perfiles de expresión de conjuntos de genes implicados en la función neuronal, la respuesta inmunitaria, la función vascular, la red de proteostasis y los procesos metabólicos en los animales transgénicos tratados con Gal1.

Estos hallazgos indican que Gal1 impacta positivamente sobre las alteraciones más prominentes de la EA experimental y que, a su vez, confiere protección sobre la microvasculatura del hipocampo. Los resultados obtenidos en esta Tesis revisten originalidad aportando conocimiento novedoso sobre el rol de Gal 1 en la enfermedad de Alzheimer experimental. Gal1 emerge como un promisorio rol terapéutico para esta patología y la demencia, vislumbrando un camino hacia la mejora de la calidad de vida de los pacientes afectados por esta devastadora condición neurodegenerativa.

Palabras clave: *Enfermedad de Alzheimer – Unidad Neurovascular – Galectina-1 – Microvasculatura – Neurodegeneración*

Abstract

Contribution of the Neurovascular Unit to neurodegeneration in Alzheimer's disease.

Potential therapeutic role of Galectin1.

Alzheimer's disease (AD) is one of today's greatest public health challenges, with a steadily increasing prevalence and no cure. AD is characterized by insoluble deposits of β -amyloid (A β) peptide of both parenchymal and vascular localization as well as the presence of neurofibrillary tangles of hyperphosphorylated tau protein. This is accompanied by neuroinflammation, reactive gliosis and increased permeability of the blood-brain barrier (BBB). Such events usually occur in early stages of AD and affect A β clearance, suggesting a need to explore the underlying mechanisms as possible therapeutic targets for the disease.

Galectins, lectin-like proteins that recognize N-acetyllactosamine units in cellular glycoconjugates, play a crucial role in the regulation of pathophysiological processes such as immune response, fibrosis, and cancer. The expression of some galectins has been described in various cell types of the central nervous system. Galectin 1 (Gal1) has stood out for its protective properties in models of neurodegenerative diseases and brain injury, largely due to its immunomodulatory qualities.

The aim of this Thesis was to study the structural and functional alterations of the cerebral microvasculature of the hippocampus -a brain structure involved in AD- and to evaluate the therapeutic potential of Gal1 in experimental models. For this purpose, transgenic mice of the PDAPPJ20 strain, which models familial AD, were treated with recombinant Gal1 at 12 months, the symptomatic stage of the pathology. It was demonstrated that this treatment was able to restore the cognitive performance of transgenic mice, assessed by behavioral tests of hippocampal-associated spatial memory, and to decrease both amyloid deposits in the brain parenchyma and vascular deposits, the most prominent histopathological hallmarks of AD in the experimental model used. On the other hand, Gal1, in the hippocampus of transgenic mice, was able to restore the integrity of the blood-brain barrier, evidenced by an Evans Blue permeability assay, and recover key interactions between astrocytes and endothelium in the neurovascular unit by promoting the restoration of physical contacts and perivascular localization of the astrocytic water channel protein AQP4. On the other hand, the presence of endogenous Gal1 was observed on the hippocampal vasculature in transgenic mice.

In turn, the direct protective effect of Gal1 on human cerebral microvasculature endothelial cells exposed to A β 1-40 in vitro was evaluated. Recovery of endothelial monolayer integrity after Gal1 treatment was determined, as assessed by monitoring transendothelial electrical resistance, which would be accompanied by a recovery of the tight junction protein occludin at cell-cell contacts. The

mechanisms of A β clearance could be found to be affected by alterations in cellular proteostasis, so the reticular stress pathways PERK and IRE1 α endoplasmic reticulum stress pathways were significantly activated in endothelial cells exposed to A β , as were the protein levels of the BIP sensor and XBP1 factor, denoting the implication of this cellular response. *In vivo*, a decrease in the vascular localization protein XBP1 was demonstrated. In addition, endothelial cells exposed to A β in the presence of Gal1 showed inhibition of inflammatory mechanisms associated with the reticular stress response, decreasing the expression of the NLRP3 inflammasome component and the activation of the proinflammatory transcription factor NF κ B. The phenotypic changes described in these cells did not induce cell death, which was explored by MTT assay and expression of apoptosis inducer CHOP. These results suggest that Gal1 rescues the induction of endoplasmic reticulum stress response in endothelial cells exposed to amyloid peptides, promoting an anti-inflammatory effect. Furthermore, transcriptomic analysis of mouse hippocampus corroborated the experimental results by demonstrating the recovery of expression profiles of gene sets involved in neuronal function, immune response, vascular function, proteostasis network and metabolic processes in Gal1-treated transgenic animals.

These findings indicate that Gal1 positively impacts the most prominent alterations in experimental AD and, in turn, confers protection on the hippocampal microvasculature. The results obtained in this Thesis are original and provide novel insights into the role of Gal1 in experimental Alzheimer's disease. Gal1 emerges as a promising therapeutic role for this pathology and dementia, envisioning a path towards improving the quality of life of patients affected by this devastating neurodegenerative condition.

Keywords: *Alzheimer's disease – Neurovascular Unit – Galectin-1 – Microvasculature – Neurodegeneration.*

Publicaciones

Trabajos científicos publicados en revistas científicas en el marco de la realización de esta Tesis Doctoral como producto del trabajo realizado en el Laboratorio de Neurobiología del Envejecimiento o de colaboraciones con otros grupos de investigación.

“Loss of Direct Vascular Contact to Astrocytes in the Hippocampus as an Initial Event in Alzheimer’s Disease. Evidence from Patients, In Vivo and In Vitro Experimental Models”
Molecular Neurobiology, 2024

Pomilio, C., Jessica L Presa, C. Oses, A. Vinuesa, M. Bentivegna, A. Gregosa, M. Riudavets, et al.

“Inflammation and Insulin Resistance as Risk Factors and Potential Therapeutic Targets for Alzheimer’s Disease” Front. Neurosci., 23 April 2021
MA Vinuesa, C Pomilio, A Gregosa, M Bentivegna, Jessica Presa, et al.

“Vasculo-Neuronal Coupling and Neurovascular Coupling at the Neurovascular Unit: Impact of Hypertension” Front Physiol. 2020 Sep
Jessica L Presa, Saravia F, Bagi Z, Filosa JA.

“Decreased parenchymal arteriolar tone uncouples vessel-to-neuronal communication in a mouse model of vascular cognitive impairment” Geroscience. 2021
Kim, K.J., Diaz, J.R., Jessica L Presa et al.

“Microglial autophagy is impaired by prolonged exposure to β -amyloid peptides: evidence from experimental models and Alzheimer’s disease patients” Geroscience. 2020
C Pomilio, R Gorjod, M Riudavets, MA Vinuesa, Jessica L Presa, et al.

“Periodic dietary restriction ameliorates amyloid pathology and cognitive impairment in PDAPP-J20 mice: Potential implication of glial autophagy” Neurobiology of Disease. 2019
A. Gregosa, MA Vinuesa, MF Todero, C Pomilio, SP. Rossi, M Bentivegna, Jessica L Presa, S Wenker, F Saravia, J Beauquis.

“Early Exposure to a High-Fat diet impacts on hippocampal plasticity: implication of microglia derived exosome-like extracellular vesicles” Molecular Neurobiology. 2019

MA Vinuesa, M Bentivegna, Gastón Calfa, F Filipello, C Pomilio, MM Bonaventura, V Lux-Lantos, ME Matzkin, A Gregosa, Jessica L Presa, M Matteoli, J Beauquis, F Saravia.

Trabajos científicos en preparación

“Galectin-1 rescues microvascular alterations in experimental Alzheimer’s Disease models involving endoplasmic reticulum stress pathways.”

Jessica Presa, Carlos Pomilio, Angeles Vinuesa, Mariano Soiza Relly, Eugenia Matzkin, Agustina Alaimo, Joaquin Merlo, Juan Beauquis, Gabriel Rabinovich, Flavia Saravia.

“Role of Galectin-1 as a therapeutic strategy and biomarker for Alzheimer’s Disease: evidence from patients and experimental models.”

Carlos Pomilio*, Angeles Vinuesa*, Jessica Presa, Nicolas Torres, Melisa Bentivegna, Juan C Stupirski, Rosa Morales, Montana Manselle Cocco, Joaquin Merlo, Ezequiel Surace, Miguel Riudavets, Gustavo Sevlever, Juan Beauquis, Gabriel Rabinovich*, Flavia Saravia*

Abreviaturas

A β	β -Amiloide
APOE	Apoliproteína-E
APP	Proteína Precursora Amiloide
ARIA	Anormalidades en imágenes relacionadas a A β
ATF6	Factor de transcripción activador 6
BHE	Barrera hematoencefálica
BIP	Proteína de unión a inmunoglobulina
CAA	Angiopatía cerebral amiloide
CHOP	Proteína homóloga a C/EBP
DAMPS	Patrones moleculares asociados a daño
EA	Enfermedad de Alzheimer
EB	Evans Blue
EndMT	Transición endotelio-mesenquimal
ERAD	Degradoación asociada al RE
FDA	Administración de Drogas y Alimentos (EUA)
FITC	Lectina de <i>Lycopersicon Esculentum</i> (tomate) unida a fluoresceína
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GFAP	Proteína ácida fibrilar de la glía
GSEA	Análisis de Enriquecimiento de conjuntos de genes
GSVA	Análisis de Variación de conjuntos de genes
HBMEC	Células endoteliales de microvasculatura humana
IL	Interleuquina
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MMP	Metaloproteasas
NF κ B	Factor nuclear kappa B
NOL	Prueba de posición novedosa de un objeto
RT-PCR	Retrotranscripción-Reacción en cadena de la polimerasa
PERK	Proteína quinasa del retículo endoplasmático similar a las ARN quinasas
RE	Retículo endoplasmático
RNA-seq	Secuenciación de ARN total
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SNC	Sistema nervioso central
TEER	Resistencia eléctrica transendotelial
UNV	Unidad Neurovascular
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas
XBP1	Proteína 1 de unión a X-box

Introducción

Breve historia de las enfermedades neuropsicológicas

Etimología de *demencia*

La palabra "demencia" apareció por primera vez en la historia de la humanidad hacia el año 600 d.C. El arzobispo de Sevilla, San Isidoro (560-636 d.C.), utilizó el término "demencia" por primera vez en su libro "Etimologías". El término tiene su origen en el latín, y está formado por el prefijo "de", que significa privación o pérdida; la raíz "ment", que significa mente; y el sufijo "ia", que indica un estado. En resumen, demencia se refiere a "*un estado de ausencia de la mente*" (H. D. Yang et al. 2016).

Resumen histórico del estudio de enfermedades neurodegenerativas

En la antigua Grecia y Roma, se desarrollaron algunas teorías sobre el funcionamiento del cerebro y la mente. Hipócrates (460 - 370 a. C.) reconoció la importancia del cerebro como el centro de las funciones cognitivas y el comportamiento humano, y es por ello que asociaba a las injurias cerebrales con desórdenes cognitivos. Marcus Tullio Cicero (106 - 43 a. C.) defendió la existencia de distintos procesos de envejecimiento, donde no siempre participaba la pérdida total de habilidades cognitivas (Cicero 150d. C.; Henderson 1923). Sin embargo, estas concepciones se vieron truncadas durante la Edad Media (496-1453), que se caracterizó por un periodo de incomprendión en el que las enfermedades mentales, incluida la demencia, solían considerarse castigos divinos o posesiones demoníacas. Como consecuencia, las referencias a la demencia como una enfermedad con causas biológicas, principalmente asociadas a la edad, resurgieron en la Edad Moderna.

El médico inglés T. Willis (1621–1675) fue el primero en acuñar el término "neurología" e hizo fuertes contribuciones en el campo de la anatomía cerebral, incluyendo la descripción de nervios y de los sistemas vasculares del cerebro, lo que sentó las bases para la posterior comprensión de enfermedades neurológicas. La comprensión de las enfermedades neuropsicológicas y neurodegenerativas experimentó un cambio significativo en el siglo XIX cuando los médicos alienistas, especializados en el estudio de enfermedades mentales,

comenzaron a utilizar un enfoque que consideraba tanto los aspectos anatómicos como los clínicos. Philippe Pinel (1745-1826) fue un médico francés que implementó las conversaciones terapéuticas, siendo pionero en el tratamiento de los trastornos mentales. La demencia como diagnóstico, se empleó como un término médico por Pinel en 1797, haciendo referencia a la pérdida de facultades mentales como consecuencia de enfermedades cerebrales (Román 2003). Desde la segunda mitad del siglo XIX y principios del siglo XX, investigadores como Santiago Ramón y Cajal, Camillo Golgi y Paul Broca realizaron estudios detallados sobre la estructura, la histología y la función del sistema nervioso. Se comenzaron a identificar y clasificar diversos trastornos neuropsiquiátricos, como la epilepsia, la esclerosis múltiple, la esquizofrenia y el trastorno bipolar (Compston y Coles 2002; H. D. Yang et al. 2016). Estos avances se complementaron con observaciones clínicas de pacientes con síntomas de demencia, incluida la pérdida de memoria, desorientación, alteraciones del lenguaje y cambios en la personalidad, proporcionando descripciones detalladas de los síntomas y el curso de la enfermedad. Además, hubo investigaciones neuropatológicas que observaron cambios en el cerebro de pacientes con demencia, realizadas por médicos como Franz Nissl y Oskar Fischer, quienes describieron alteraciones en la estructura y la composición celular del cerebro de personas con demencia (DeTure y Dickson 2019).

En 1894, los médicos Otto Binswanger y Alois Alzheimer fundaron la visión moderna de la demencia al distinguir y clasificar dos tipos distintos, la demencia vascular y la demencia debida a neurosífilis. Estos médicos describieron por primera vez las evidencias clinicopatológicas y diversas alteraciones de cada una, entre las que se encuentran accidentes cerebrovasculares, presencia de placas ateroscleróticas, atrofia cortical vascular y encefalopatía subcortical (Román 2003).

Alois Alzheimer fue un médico psiquiatra y neuropatólogo alemán que se especializó en el estudio de la demencia y las alteraciones cerebrales asociadas. Mientras Alzheimer trabajaba en el Hospital Mental de Frankfurt en 1901, Auguste Deter, de tan sólo 51 años, fue ingresada por presentar síntomas como el deterioro de la memoria, manía, insomnio y agitación que le impedían trabajar y llevar a cabo tareas diarias. Este cuadro fue diagnosticado por Alzheimer como "demencia presenil". Durante dos años, Alzheimer fue el médico de Auguste, período en el que registró múltiples evaluaciones. Para realizar un seguimiento continuo de la paciente, Alzheimer indicó que Auguste permaneciera en el hospital. La paciente murió 4

años después a la edad de 56 años y, como habían acordado previamente, Alzheimer dispuso del consentimiento para estudiar el cerebro y el historial médico de Auguste (H. D. Yang et al. 2016).

En 1906, Alzheimer presentó su trabajo durante la 37^a reunión de psiquiatras del suroeste alemán en Tübingen, Alemania, que tituló "Una enfermedad seria característica del córtex cerebral" (cabe aclarar que la zona del hipocampo no fue analizada en esta paciente) (Alois Alzheimer 1906). Allí proporcionó la descripción clinicopatológica de la enfermedad de Auguste. Según Alzheimer, la paciente se encontraba en un estado de desorientación espacial y temporal, respecto al año, de dónde provenía, y había llegado a responder incluso haber nacido el año anterior. Por lo general, Auguste estaba ansiosa y reacia a cooperar con el personal de la clínica. La paciente no podía terminar sus oraciones o responder preguntas con coherencia, y también presentaba dificultades para leer y escribir (Dahm 2006). En su informe detalló que, a nivel macroscópico, el cerebro mostraba una atrofia generalizada. Sobre los cortes histológicos, empleando el método de tinción de plata de Bielschowsky, Alzheimer observó neuronas degeneradas con haces de fibrillas (lo que hoy se conoce como ovillos neurofibrilares) y focos miliares de depósitos dispersos por la corteza (actualmente conocidas como placas amiloides). Estos focos miliares (o placas), según explicó, se localizaban en el espacio extracelular y podían encontrarse en toda la corteza cerebral, con mayor densidad en las capas superiores, pudiéndose distinguir incluso sin tinción alguna. Considerando la edad de la paciente, los hallazgos de Alzheimer eran excepcionales (Alois Alzheimer 1906).

En los años subsiguientes, se comunicaron nuevos casos similares. En 1910, el psiquiatra Emil Kraepelin (superior de Alois Alzheimer) empleó el término "enfermedad de Alzheimer" para distinguir la forma presenil de demencia de la variante senil más frecuente (Kraepelin 1915).

En 1911, publicó un trabajo con la descripción de los síntomas y análisis histopatológico de Johan F, su segundo paciente con la patología, donde describió un deterioro de "profunda deficiencia mental" (A. Alzheimer 1911). Además, mencionó el deterioro del reconocimiento, la comprensión y la expresión del lenguaje. Nuevamente, el médico y científico describió los cambios en el cerebro *post mortem* de este paciente anteriormente observados en Auguste Deter. La Figura 1 muestra ilustraciones de Alzheimer donde describió las placas seniles y

los ovillos neurofibrilares como eran observados en el cerebro de sus pacientes (A) y distintos tipos de ovillos encontrados (B). En dicho trabajo, Alzheimer también discutió la distinción entre demencia senil y demencia presenil (en ese momento, la enfermedad de Alzheimer parecía comprender sólo esta última). Allí menciona: “(...) se plantea la cuestión de si los casos que consideré peculiares son lo suficientemente diferentes clínica o histológicamente como para distinguirlos de la demencia senil o si deben incluirse bajo esa rúbrica.” Sin embargo, la demencia senil y presenil continuaron siendo consideradas como trastornos distintos hasta aproximadamente la década de 1970: hoy en día, los estudios clinicopatológicos han aclarado que la enfermedad de Alzheimer y la demencia senil a la que Alzheimer hacía referencia en este trabajo, son parte del mismo espectro de enfermedad.

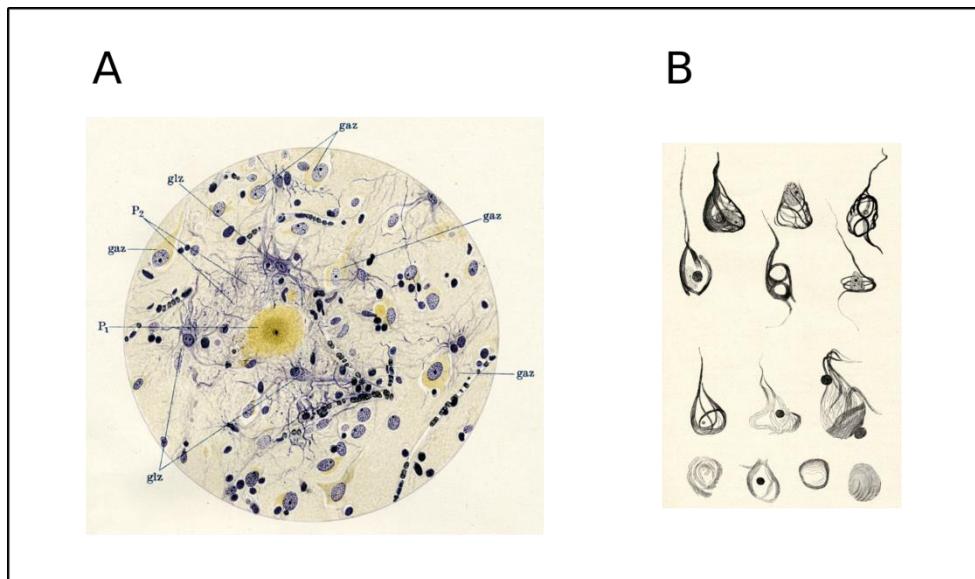


Figura 1. Ilustraciones de Alzheimer que muestran ovillos neurofibrilares y placas amiloides. A) Ilustración de placas y ovillos neurofibrilares. gaz, célula ganglionar (neurona); glz, célula glial, P, parte central de la placa; P2, parte periférica de la placa. B) Distintos tipos de ovillos neurofibrilares reconocidos por Alzheimer. Las imágenes se incluyeron en el artículo de Alois Alzheimer de 1911 en el que se describían los casos de Auguste D. y Johan F. Extraídas de Dahm R. “Alzheimer's discovery”. *Curr Biol.* 2006

Enfermedad de Alzheimer

En la actualidad, la enfermedad de Alzheimer (EA) constituye uno de los mayores desafíos de la salud pública, con una prevalencia en constante aumento y un gran impacto social y económico en todo el mundo. A pesar de décadas de investigación, esta enfermedad neurodegenerativa no tiene cura, remarcando la necesidad de dilucidar los intrincados procesos detrás de esta patología.

La EA se caracteriza por un declive cognitivo severo y fallas de memorias progresivas, lo que conduce a la pérdida de funciones y de la autonomía de los pacientes y, en última instancia, a la muerte. La EA afecta las funciones cerebrales generando síntomas como confusión, desorientación e inhabilidad para generar nuevas memorias y, eventualmente, esto impacta en la capacidad de realizar tareas diarias con normalidad. Se estima que más de 40 millones de personas en todo el mundo padecen demencia, lo que aumenta con la expectativa de vida de la población. La EA es responsable de un 60-80% de los casos de demencia. La segunda forma más prevalente es la demencia vascular, es decir, aquella cuyos pacientes presentan daños en el tejido cerebral asociado a la disfunción de la microvasculatura y pérdida cognitiva como consecuencia de ello. Esta última, representa entre 15-25% de los casos de demencia (Kurt A. Jellinger 2008; W. Liu et al. 2015; “2023 Alzheimer’s Disease Facts and Figures” 2023). La EA no sólo afecta a los pacientes que la padecen, sino también a sus familias, sus cuidadores y los sistemas de salud, y genera una alta carga económica que aumenta con la prevalencia de la enfermedad. Por lo tanto, se evidencia la imperativa necesidad de tratamientos efectivos, ya sean monoterapias o terapias combinadas que detengan la evolución de la EA actuando sobre los distintos procesos biológicos subyacentes e incluso recuperen cierta capacidad de aquellos pacientes en estadios avanzados de la enfermedad. En cuanto a su epidemiología genética, la EA suele clasificarse en función de la edad de presentación de los síntomas clínicos. La mayoría (>90%) de los pacientes diagnosticados con la patología tienen una edad superior a los 65 años, lo que se denomina EA de inicio tardío o EA esporádica. La EA de inicio tardío tiene una etiología multifactorial, no completamente dilucidada, relacionada con múltiples variables genéticas, sociales, de estilo de vida y otras, que se desarrollarán en la sección Factores de Riesgo.

En el resto de los casos, la EA se presenta normalmente a finales de los 40 o principios de los 50 años (la denominada EA de inicio temprano o EA familiar). Esta última categoría se

debe a la portación de mutaciones en la proteína precursora amiloide (APP) o en las enzimas involucradas en su procesamiento, y se discutirá en la siguiente sección.

Marcas histopatológicas

Los cortes de los cerebros de las personas con EA presentan características neuropatológicas en el parénquima cerebral, como placas extracelulares compuestas por fibrillas del péptido β -amiloide ($A\beta$), la presencia de ovillos fibrilares intraneuronales compuestos por tau hiperfosforilada y, en la mayoría de los casos, angiopatía amiloide cerebral (depósitos de $A\beta$ de localización vascular) (Figura 2A). El progreso de la enfermedad se caracteriza por una neurodegeneración implicando pérdida neuronal y sináptica (Figura 2B), y se acompaña de otras alteraciones como la gliosis reactiva y el aumento de permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE; Figura 2C). Esto último se ha observado como infiltraciones de componentes sanguíneos tanto al cerebro como al líquido cefalorraquídeo (LCR) en distintas regiones cerebrales, incluyendo el hipocampo (Kurz et al. 2022; Sweeney, Sagare, y Zlokovic 2018; van de Haar et al. 2016; Bowman, Kaye, y Quinn 2012).

Los péptidos $A\beta$ provienen del procesamiento proteolítico de la proteína transmembrana APP, compuesta por 770 aminoácidos, que se expresa mayoritariamente en neuronas y se localiza preferentemente en la membrana plasmática del axón. La secuencia de APP se encuentra altamente conservada, especialmente en sus dominios extracelulares, sugiriendo una conservación de su función a lo largo de diversas especies incluyendo *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* y ratones (Cho et al. 2022). La función fisiológica de la APP se ha vinculado con un correcto desarrollo, plasticidad y sobrevida neuronales, neurogénesis, memoria y mantenimiento sináptico a partir de la investigación de modelos animales *knock out* para dicho gen. No obstante, la función de la APP todavía se encuentra en cuestionamiento y muestra diferencias según la isoforma de estudio (van der Kant y Goldstein 2015; Müller, Deller, y Korte 2017).

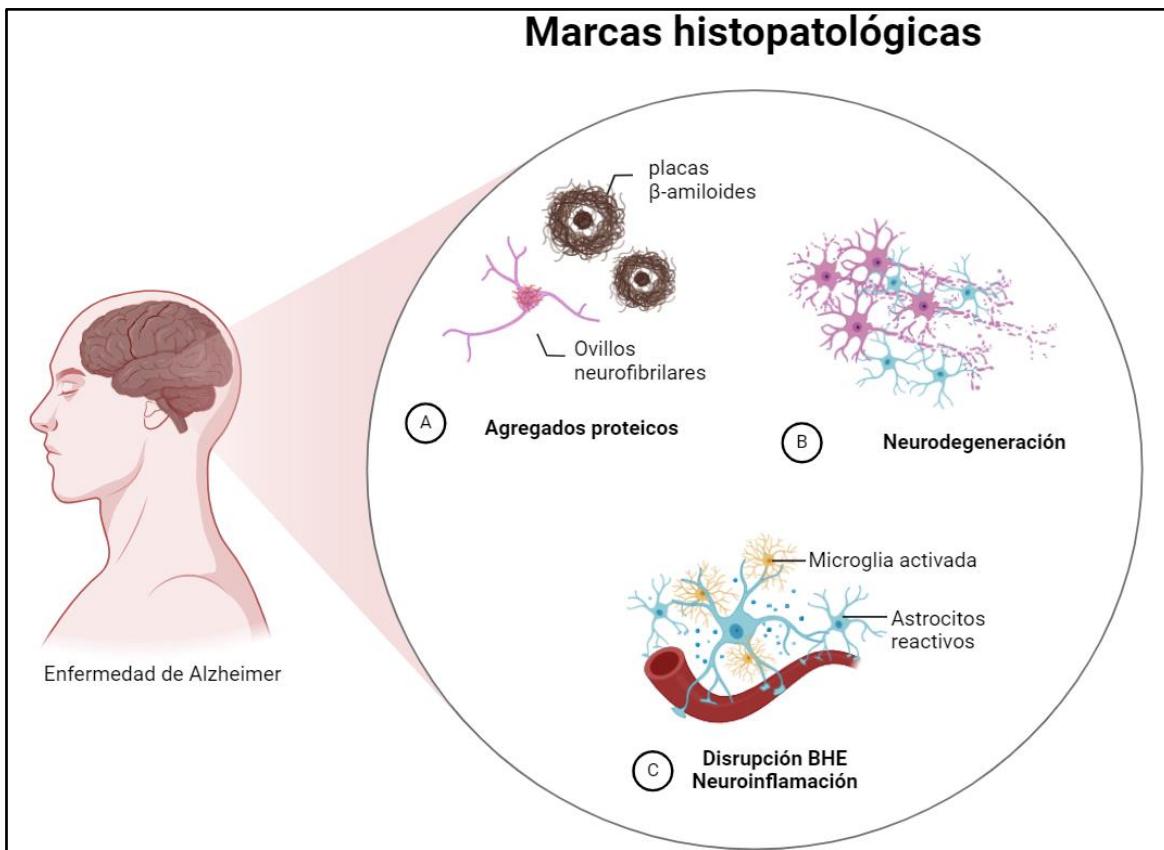


Figura 2. Eventos histopatológicos de la EA. A) Las regiones cerebrales afectadas por la patología presentan en el parénquima cerebral placas extracelulares conformadas principalmente por el péptido A β 1-42, ovillos neurofibrilares por agregación citoplasmática de la proteína tau hiperfosforilada. B) La EA se caracteriza por una marcada pérdida neuronal. C) La disrupción de la BHE y la gliosis reactiva son características que acompañan el progreso de la patología. Imagen creada con Biorender.

La APP es una proteína transmembrana que es sustrato de distintas enzimas secretasas que implican dos caminos alternativos que coexisten, y pueden ser preponderantes en alguna condición: la vía no-amiloidogénica y la amiloidogénica. Esta última es la que genera al péptido A β como producto final. Como se muestra en la Figura 3, ambos procesamientos ocurren sobre APP cuando se encuentra alojada en la membrana plasmática. En la vía amiloidogénica, esquematizada a la derecha de la Figura 3, primero actúa la β -secretasa, liberando un péptido del dominio N-terminal hacia el espacio extracelular sAPP β . Posteriormente, el péptido es sustrato de la γ -secretasa generando fragmentos que pueden tener entre 30 y 51 aminoácidos de longitud, denominados péptidos A β , como se observa en la Figura 3. En la membrana, queda el péptido de C-terminal, el cual se denomina C99, de dicha longitud de aminoácidos. Sin embargo, las formas predominantes, compuestas por 40 o 42 aminoácidos, son conocidas como A β 1-40 y A β 1-42, respectivamente (Olsson et al.

2014). Todas las variantes de los péptidos A β presentan un dominio de agregación priónica que facilita su interacción con otros péptidos A β , lo que genera oligómeros de peso molecular cada vez mayor, eventualmente conformando las placas amiloides que se depositan en el parénquima cerebral. En la vía no amiloidogénica actúa primero la enzima α -secretasa, que reconoce un sitio de clivaje que evita la formación de C99, dando en su lugar al péptido más corto p3, de 3 aminoácidos. Esto causa que el clivaje subsecuente mediado por γ -secretasa no genere el péptido A β de alta toxicidad.

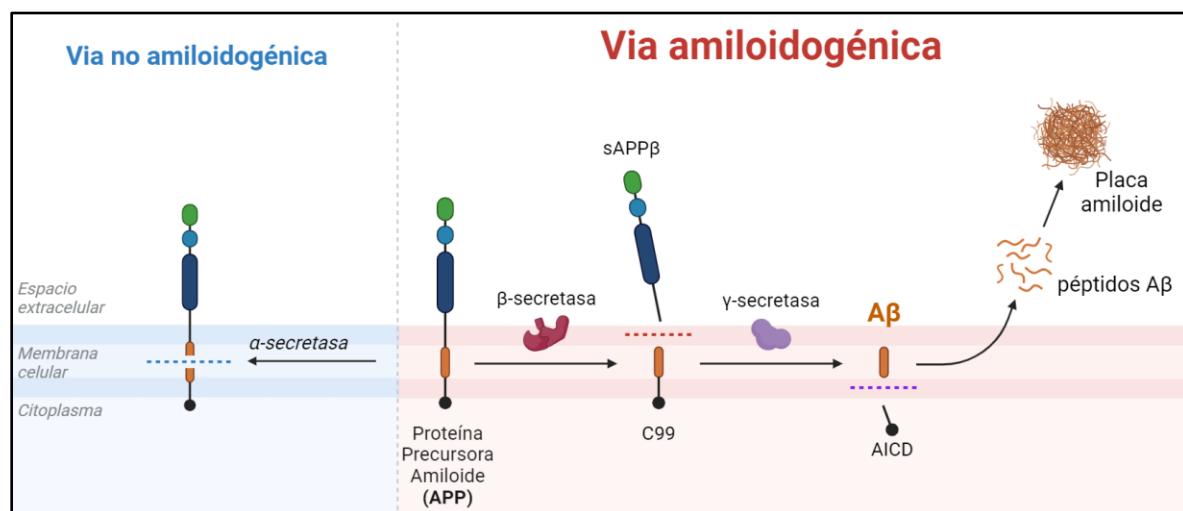


Figura 3. Procesamiento enzimático de APP. APP puede ser reconocida como sustrato para el clivaje proteolítico por diferentes enzimas. Al ser sustrato de la β -secretasa, APP ingresa a la vía amiloidogénica, de la cual se generan los intermediarios sAPP β y el fragmento de membrana C99. Este último es sustrato de la γ -secretasa y da como productos el AICD y los péptidos A β . Estos péptidos A β pueden tener mayormente 40 o 42 aminoácidos de longitud según cuál sea la unión peptídica hidrolizada por la γ -secretasa. El APP puede también ser sustrato de la α -secretasa, por lo que ingresa a la vía no amiloidogénica, que no genera péptidos A β . Imagen creada con Biorender.

Las isoformas mayoritarias, A β 1-40 y A β 1-42, difieren en dos residuos adicionales isoleucina y alanina en el extremo C-terminal de A β 1-42, que le confieren a este último mayor capacidad de agregación por su hidrofobicidad. Esto hace que sea el componente más representado en los depósitos del parénquima cerebral. De todos modos, se ha demostrado que ambos péptidos en concentraciones suprafisiológicas evolucionan rápidamente a una forma oligomérica (Olsson et al. 2014; Morel et al. 2018; Cho et al. 2022). Los oligómeros continúan agregándose hacia la formación de protofibrillas de conformación dinámica, y luego, fibrillas

estables de estructura mayoritaria de hoja β plegada, denominado “amiloide”. Los depósitos amiloides atraen a diversas proteínas y iones metálicos que quedan retenidos formando parte de estos (Abelein 2023).

En caso de encontrarse en concentraciones por encima de los niveles fisiológicos, el A β induce un aumento del estrés oxidativo de las células y cambios epigenéticos que desregulan los procesos de transcripción (Karisetty et al. 2020). En el intersticio extracelular, el A β puede intervenir en la comunicación sináptica entre neuronas, inducir procesos inflamatorios y oxidativos tanto en neuronas como en otras células del sistema nervioso central (SNC), alterando procesos de señalización celular y llevando a la neurodegeneración (Tang et al. 2018).

Tau es una proteína que se encuentra principalmente presente en neuronas formando parte del citoesqueleto de actina e involucrada en la estabilización de microtúbulos, el mantenimiento axonal y el transporte intracelular. Sin embargo, en la EA, tau experimenta una hiperfosforilación patológica, que lleva a un mal plegamiento y agregación. Este proceso conduce a la formación de ovillos neurofibrilares de localización intraneuronal, constituidos por depósitos insolubles en el citoplasma neuronal. Los ovillos neurofibrilares de tau son considerados un marcador patológico clave en la EA y su acumulación se correlaciona estrechamente con la progresión de la enfermedad y la pérdida de la función cognitiva (Braak y Braak 1991). Existe una serie de mecanismos implicados en la patogénesis de la EA relacionados con la proteína tau, incluida la propagación de tau patológica a través del cerebro, la disrupción de la homeostasis del calcio, la activación de procesos inflamatorios gliales y la interacción con otras proteínas patogénicas como A β (Laurent, Buée, y Blum 2018). Dentro de las neuronas, los ovillos de tau bloquean el transporte de nutrientes y moléculas impactando en la función y la sobrevida neuronal. Además, se ha sugerido que la tau hiperfosforilada puede contribuir a la neurodegeneración al interferir con múltiples procesos celulares, como el transporte axonal, la regulación del citoesqueleto y la función sináptica (Kfouri et al. 2012; Laurent, Buée, y Blum 2018).

En cuanto al orden cronológico de aparición de estas marcas histopatológicas, un seguimiento de pacientes con EA de inicio temprano encontró que los niveles de tau y tau fosforilado en LCR comenzaron a aumentar al momento de la detección de placas amiloides formadas. Dicho trabajo también estimó que los aumentos de tau pueden comenzar décadas

antes de evidenciarse la presencia de ovillos neurofibrilares (Barthélemy et al. 2020). Sin embargo, aún es necesaria evidencia adicional para conocer la causa que subyace a estas alteraciones y su posible interrelación.

El cerebro de pacientes suele presentar atrofia en las zonas de la corteza relacionadas con el aprendizaje asociativo y en el lóbulo temporal (incluyendo el sistema límbico, giro parahipocampal, el giro dentado, entre ellos). Típicamente, la zona temporal media (especialmente la amígdala y el hipocampo) presentan disminución de su volumen en la EA. Las cortezas frontal y temporal, por lo general, presentan atrofia de los giros, mientras que las cortezas motora primaria y somatosensorial no suelen verse afectadas.

En la EA, los depósitos amiloïdes y los ovillos neurofibrilares se forman según un patrón estereotipado durante el desarrollo de la patología, lo que llevó a la división en etapas de la progresión de la enfermedad. Heiko y Eva Braak propusieron un esquema de tres etapas según las zonas afectadas por la patología amiloïde. En la etapa A, los lóbulos frontales y temporales basales se ven afectados, mientras que la etapa B se asocia a la extensión de la presencia de placas amiloïdes al neocórtex de asociación y al hipocampo. Finalmente, la etapa C se determina por la presencia de la patología en las cortezas primarias, los núcleos subcorticales y el cerebelo (Braak y Braak 1997).

Los mismos autores también propusieron una división de la EA en etapas según la extensión de las zonas afectadas por ovillos neurofibrilares. El estadio I de Braak se asocia con la presencia de ovillos en la corteza transentorrinal y, ocasionalmente, en la subregión CA1 del hipocampo. La descripción de la progresión continúa hasta el estadio V, donde ya se encuentran afectadas varias capas de la corteza entorrinal, el hipocampo propiamente dicho, el tálamo, el subículo del hipocampo, el prosencéfalo, y se observan también en la amígdala y el núcleo accumbens (Goutagny et al. 2013; Kuhn, Toda, y Gage 2018). La presencia de componentes neuronales en las placas amiloïdes, como axones y dendritas degeneradas, correlaciona con el estado de pérdida cognitiva. Además de las clásicas placas parenquimáticas, se ha descrito que al menos el 80% de los pacientes con EA presenta depósitos vasculares, lo que se conoce como angiopatía cerebral amiloïde (Arvanitakis et al. 2011; Parodi-Rullán, Sone, y Fossati 2019). Los depósitos vasculares de A β muestran efectos tóxicos sobre la vasculatura, contribuyendo a la desregulación del tono, induciendo la inflamación vascular y debilitando la BHE (Parodi-Rullán et al. 2020; Gireud-Goss et al. 2021),

promoviendo la patología vascular y exacerbando la neurodegeneración. Además, la EA se presenta en un marcado contexto inflamatorio. Investigaciones recientes han puesto el foco en las células gliales en la EA, reflejando el creciente interés en su función fisiopatológica en el cerebro. Más adelante, se describe en detalle el rol de estas células gliales y su contribución en un contexto neuroinflamatorio.

Evolución del Diagnóstico de la Enfermedad de Alzheimer

Desde 1906 hasta 1950-1970, el diagnóstico de la EA se limitaba a individuos menores de 65 años con demencia para quienes no se identificaban otras causas conocidas para la deficiencia cognitiva y de memoria, por ejemplo, que no hayan contraído sífilis, sufrido accidentes cerebrovasculares o traumatismo craneal. Por otro lado, aquellas personas mayores de 65 años que no presentaran antecedentes de haber sufrido algún accidente o patología que origine la demencia como las previamente mencionadas, eran diagnosticadas con demencia senil, concebida entonces como de origen vascular (Reitz, Brayne, y Mayeux 2011).

En los años posteriores, la creciente evidencia obtenida del estudio de pacientes *post mortem* con demencia demostró que la EA de aparición tardía era patológicamente indistinguible de la forma de aparición temprana de esta enfermedad. En consecuencia, se suprimió el criterio de edad para la EA y, en gran medida, se abandonó la explicación vascular de la demencia asociada a la edad.

Desde 1980 hasta la actualidad, la evidencia ha demostrado un fuerte componente vascular en la EA de inicio tardío y, nuevamente, la comunidad científico-médica reconoce el relevante vínculo de las alteraciones vasculares con el progreso de la EA (Govindpani et al. 2019). Las causas de la degeneración cognitiva y física son más complejas de lo que se pensaba anteriormente: cambios patológicos, como alteraciones cerebrovasculares e inflamación, podrían preceder o coexistir con los clásicos marcadores de la EA (Iturria-Medina et al. 2016). En las últimas décadas, esto ha llevado a reconsiderar los criterios diagnósticos y a reconocer la importancia de utilizar biomarcadores para aumentar la especificidad de diagnóstico de la EA.

Detección y tratamiento

El Instituto Nacional sobre la Enfermedad de Alzheimer y el Envejecimiento (Estados Unidos) ha establecido una serie de pautas para el diagnóstico de la EA (Hyman et al. 2012). En primer lugar, se distinguen dos categorías entre las personas que presentan demencia y aquellas con deterioro cognitivo moderado, ambas causadas por la EA.

Para el diagnóstico de demencia, el o la paciente debe mostrar menor capacidad para realizar tareas diarias o trabajo, presentar un declive de funciones cognitivas previas y motoras, y que aquellos cambios no puedan ser explicados por una condición psiquiátrica.

Las demencias por causa de EA presentan un deterioro progresivo y un momento claro de comienzo de síntomas graves y por lo general, estas personas presentan incapacidad de incorporar nuevos conocimientos. Una determinación más certera de la EA requiere un diagnóstico biológico del proceso patofisiológico subyacente mediante el análisis de neuroimágenes y medición de biomarcadores como el beta-amiloide 1-42 (A β 1-42), tau total (tTau) y tau fosforilado (pTau) en el LCR. El biomarcador más prominente resulta A β 1-42 y puede ser cuantificado en el cerebro mediante la inyección de un marcador de baja radiactividad que es afín al péptido y su posterior escaneo en tomografía de emisión de positrones (PET). Otros biomarcadores ampliamente usados también son: una disminución de la incorporación de glucosa en la corteza temporal-parietal medida también por PET, y atrofia cerebral observada por resonancia magnética (McKhann et al. 2011). Si la o el paciente presenta dicha evidencia patofisiológica, en conjunto con el análisis neuropsicológico, se determina una demencia a causa de la EA (McKhann et al. 2011). En el caso de que la persona muestre cierto compromiso cognitivo pero que mantenga su capacidad de realizar tareas de manera independiente, acompañado por un resultado positivo de los biomarcadores, el diagnóstico más probable es deterioro cognitivo moderado a causa de la EA (Albert et al. 2011). Es importante resaltar que muchos pacientes presentan demencia o deterioro cognitivo por causas mixtas. Especialmente, puede presentarse concomitantemente con enfermedad cerebrovascular, evidenciada por eventos previos de accidentes cerebrovasculares o ser diagnosticada mediante neuroimágenes por la presencia de daños en la sustancia blanca o infartos lacunares (W. Liu et al. 2015).

Hasta el momento, la Administración de drogas y alimentos de los Estados Unidos (FDA) ha aprobado siete tratamientos farmacológicos para el tratamiento de la EA. Cinco de ellos,

donepezil, rivastigmina, galantamina, memantina y memantina combinada con donepezil, sólo apuntan a disminuir temporalmente los síntomas modificando los niveles de neurotransmisión en el cerebro, sin alterar el curso de la enfermedad (“2023 Alzheimer’s Disease Facts and Figures” 2023). Los primeros tres fármacos se encuentran dirigidos a aumentar los niveles de transmisión colinérgica, y el otro, memantina, tiene como efecto inhibir los receptores glutamatérgicos NMDA. Estos medicamentos tienen como objetivo contrarrestar las alteraciones sinápticas características de la EA, pero no impiden la continua muerte neuronal ni modifican el curso de la enfermedad.

Las dos restantes, aducanumab y lecanemab, son inmunoterapias en fase III de estudios clínicos que emplean anticuerpos monoclonales anti-A β . La hipótesis de funcionamiento es que estos anticuerpos atraviesan la BHE e inician respuestas inmunes en el SNC, neutralizando agregados amiloideos y facilitando la eliminación del péptido (Sevigny et al. 2016; van Dyck et al. 2023). Sin embargo, sólo se aprobó su uso en pacientes con deterioro cognitivo moderado sin evidencia patofisiológica de depósitos de A β , que debe ser determinado por neuroimágenes o niveles en LCR. A su vez, el uso de anticuerpos anti-A β se asoció a efectos secundarios como cefaleas e inflamación cerebral, e incluso efectos secundarios severos, que se han denominado “anormalidades en imágenes relacionadas al amiloide”, o ARIA por sus siglas en inglés *amyloid related imaging abnormalities* (Sperling et al. 2011). Las ARIA fueron detectadas en los ensayos preclínicos y clínicos de estas dos inmunoterapias a través de la visualización de la aparición de edemas y microhemorragias en imágenes de resonancia magnética. Estos efectos secundarios han sido vinculados al daño vascular y a la presencia de depósitos amiloideos vasculares (Sevigny et al. 2016). Recientemente, Taylor y colaboradores han descrito en distintos modelos murinos de la EA con patología vascular amiloide, que la inmunoterapia contra A β genera un aumento de la permeabilidad vascular, la presencia de microhemorragias y el extravasado de plasma al compartimiento cerebral (Taylor et al. 2023). El anticuerpo utilizado fue 3D6, cuyo equivalente en humanos, bapineuzumab, logró reducir niveles de A β en pacientes, pero el ensayo clínico fue detenido en fase II por insuficiente mejora cognitiva de los pacientes que recibieron esta terapia, por lo que más evidencia es necesaria para determinar la causa de los efectos secundarios de las distintas inmunoterapias. También pueden recomendarse intervenciones no farmacológicas para mantener o incluso mejorar la función cognitiva y condición

psicológica de la o el paciente, como la reducción de síntomas de depresión, agresión o apatía. Estos tratamientos incluyen la actividad física, ejercicios de memoria y orientación, músico- o arteterapia. Resulta relevante notar que muchas de estas intervenciones tienden a mejorar la función vascular, como la actividad física, una dieta saludable e incluso medicamentos antihipertensivos y estatinas (Y. Wang et al. 2018; Shi et al. 2023)

Factores de Riesgo

La comprensión de los factores de riesgo asociados con la EA es esencial para abordar su etiología multifactorial y las estrategias terapéuticas se beneficiarían de un conocimiento más profundo de los mismos. Estos múltiples factores de riesgo pueden influir en la progresión de la patología y han sido clasificados en dos categorías principales: no modificables y modificables.

Factores de Riesgo No Modificables:

La edad es el factor de riesgo más significativo para el desarrollo de la EA. A medida que la población envejece, la prevalencia e incidencia de la enfermedad aumenta exponencialmente, destacando la importancia de la edad como predictor clave. El incremento más notable se produce en la séptima y octava décadas de la vida (Reitz, Brayne, y Mayeux 2011). Además, se espera que la población adulta mayor siga aumentando en relación con la población de 64 años o menos, contribuyendo a un incremento de los casos de EA ("2023 Alzheimer's Disease Facts and Figures" 2023). Se anticipa que más de 131 millones de personas se verán afectadas en 2050 a medida que la población envejezca, lo que causará un impacto agobiante en la economía y los sistemas de salud (DeTure y Dickson 2019).

La edad de inicio de la enfermedad de Alzheimer puede variar, y se encuentra ligada al tipo de EA: de inicio temprano o tardío, como ya se mencionó. La EA de inicio temprano se asocia a mutaciones autosómicas dominantes, haciendo a la enfermedad prácticamente inevitable para quienes portan dichas alteraciones genéticas.

La gran mayoría de los casos de EA (>90%) son de aparición tardía, con una etiología multicausal y múltiples factores de riesgo. Los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) han identificado más de 20 *loci* que confieren un mayor riesgo de desarrollar EA

esporádica, incluidos genes implicados en la inmunidad innata, el metabolismo del colesterol y la función de la membrana sináptica/neuronal, lo que sugiere una patogénesis heterogénea (Cuyvers y Sleegers 2016; Drummond y Wisniewski 2017). El mayor riesgo lo aporta el gen que codifica para la apolipoproteína E (APOE) (DeTure y Dickson 2019). El gen ApoE se encuentra en el cromosoma 19 y presenta tres alelos principales: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$, para el cual diversos estudios epidemiológicos han establecido su asociación significativa con el riesgo de desarrollar esta patología neurodegenerativa. Los individuos portadores de una sola copia del polimorfismo del gen ApoE $\epsilon 4$ tienen una posibilidad 3 veces mayor de desarrollar EA en comparación con los no portadores, este riesgo aumenta a 12 veces para personas que portan dos copias (Lane, Hardy, y Schott 2018). La función principal de APOE es transportar colesterol, aunque se ha descrito su rol en inmunomodulación, regulación de la proteostasis y plasticidad sináptica (Williams, Borchelt, y Chakrabarty 2020). APOE4 parece ser deficiente en el transporte de lípidos, encontrándose en forma hipolipidada y con menores niveles en LCR en comparación con otras isoformas (Hanson et al. 2013). A su vez, se observa que APOE4 se asocia a una mayor acumulación de placas amiloides en el cerebro, especialmente en la cercanía a vasos, en las cuales se detecta su presencia (Hudry et al. 2013).

Otro gen que se ha asociado al riesgo de desarrollar EA esporádica es el receptor TREM2 (por *Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2*), una proteína transmembrana expresada principalmente en células de la microglía, macrófagos y células dendríticas. La expresión de TREM2 en microglía está vinculada a la respuesta a daños celulares y a la fagocitosis de residuos celulares y patógenos. Variantes genéticas raras y mutaciones de TREM2 están asociadas con un mayor riesgo de desarrollar la EA (Korvatska et al. 2015), lo que se vincula con una menor capacidad microglial para realizar una fagocitosis eficiente y participar en respuestas inmunológicas (B. Kim et al. 2022).

Otros factores como antecedentes familiares y el sexo también se han vinculado al desarrollo de la patología. La EA es más frecuente en mujeres (Zhu, Montagne, y Zhao 2021). Sin embargo, las observaciones de la incidencia de demencia entre hombres y mujeres de la misma edad han sido dispares. Algunos de los estudios de incidencia de Alzheimer u otras demencias en Estados Unidos no han encontrado diferencias significativas entre hombres y mujeres de la misma franja etaria (Hebert et al. 2001; Zahodne et al. 2014), mientras que estudios europeos han informado tanto una mayor incidencia entre las mujeres a edades más

avanzadas, como entre los hombres (Letenneur et al. 1999; Matthews et al. 2016). Por lo tanto, las diferencias en el riesgo de demencia entre hombres y mujeres pueden depender, en parte, de la edad y/o de la región geográfica. Otros estudios han sugerido que las diferencias de mayor incidencia en mujeres se deben a un "sesgo de supervivencia", ya que los hombres mayores a 65 años presentaban menor riesgo de demencia que las mujeres debido a un perfil cardiovascular más saludable. Esto se vincula a que las enfermedades cardiovasculares son un alto factor de riesgo para la EA, y son la principal causa de muerte entre hombres (Seshadri et al. 1997).

Por otro lado, las discrepancias pueden estar basadas en la biología, como las diferencias cromosómicas u hormonales (Gilsanz et al. 2019), o en cómo los factores sociales y culturales son experimentados (diferencias de género), o una combinación de ambos (Mielke et al. 2022). De todos modos, se requiere una comprensión más profunda de los mecanismos subyacentes para explicar estas diferencias.

Factores de Riesgo Modificables:

La dieta, el ejercicio y la actividad mental, entre otros, desempeñan un papel importante. Hábitos como el tabaquismo, la inactividad física y una dieta poco saludable se han identificado como factores de riesgo modificables, siendo el blanco de terapias no farmacológicas (Gregosa et al. 2019; Vinuesa et al. 2019; Shi et al. 2023).

A su vez, el nivel educativo alcanzado se vincula inversamente con la prevalencia de la enfermedad (Wilson et al. 2019). Por otro lado, menos años de educación formal se asocian con un estatus socioeconómico más bajo (McDowell et al. 2007), que a su vez determina diversos factores, lo que dificulta la comprensión de las causas subyacentes en la mayoría de los casos.

Condiciones como la hipertensión, la diabetes tipo 2, la aterosclerosis e hipercolesterolemia han sido asociadas con un mayor riesgo de EA (Biessels y Reagan 2015; Arvanitakis et al. 2016; Lennon et al. 2019; Presa et al. 2020). Otras afecciones de la vasculatura, en particular de la vasculatura cerebral, como la presencia de daños y remodelaciones vasculares como infartos lacunares, daños en la sustancia blanca, entre otras, se asocian a un mayor riesgo de desarrollar la EA. En particular, se ha observado que el número de eventos microhemorrágicos en pacientes se correlaciona positivamente con el deterioro cognitivo,

especialmente en asociación con niveles alterados de A β 1-42 en LCR (Goos et al. 2009; Wu et al. 2014). Además, las microhemorragias se presentan en concomitancia con señales de daño vascular, lo que podría deberse a la presencia de amiloide vascular (Vázquez-Justes et al. 2022).

Se estimó que el 50% de los pacientes con EA presentan daño vascular, lo que aumenta con la edad de diagnóstico (Gireud-Goss et al. 2021). A su vez, la evidencia sugiere que la mayoría (>80%) de los pacientes con demencia relacionada a la edad presentan tanto las características clásicas de la EA como patología cerebrovascular (K. A. Jellinger 2002; Attems y Jellinger 2014).

Modelos animales para el estudio de la EA

Los modelos animales transgénicos suelen recapitular aspectos clave de la enfermedad familiar en humanos y han aportado a la generación de conocimiento esencial para investigar la EA. Esta relevancia clínica, junto con la estabilidad genética y la disponibilidad de herramientas y recursos, permiten estudiar los mecanismos de la enfermedad y desarrollar nuevas terapias.

El sitio de corte en la secuencia de APP para generar A β se encuentra presente sólo en la secuencia aminoacídica correspondiente al humano y no en homólogos de otras especies (O'Brien y Wong 2011). Para replicar la patología de la EA familiar, los modelos experimentales consisten en su mayoría en animales transgénicos que expresan los genes humanos de APP, presenilina-1 y/o presenilina-2 mutados. Sin embargo, es importante destacar que estos modelos a menudo carecen de la presencia generalizada de otras características patológicas que definen a la EA, como el desarrollo de ovillos neurofibrilares y, en ciertos modelos, la pérdida neuronal.

El ratón (*Mus musculus*) es la especie más utilizada en este tipo de modelos por su facilidad de cría y manipulación genética. Otras especies de vertebrados que se han utilizado en la modelización de la EA son la rata (*Rattus norvegicus*), la lamprea marina (*Petromyzon marinus*) y el pez cebra (*Danio rerio*); entre las especies de invertebrados utilizadas en este tipo de modelización se encuentran la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) y el gusano redondo (*Caenorhabditis elegans*). Sin embargo, dada la mayor distancia de estos

modelos respecto a la fisiología humana, su uso está menos extendido (Sharma, Khurana, y Muthuraman 2017; Z.-Y. Chen y Zhang 2022). Por otro lado, la forma esporádica de la EA no cuenta aún con un modelo animal que haya logrado recapitular las marcas histopatológicas de la enfermedad. En los trabajos previos a los ensayos clínicos, también se han adoptado primates no humanos (como *Macaca mulatta*) para modelizar la EA; sin embargo, aunque sus cerebros envejecidos presentan amiloidosis cerebral, la tauopatía es prácticamente inexistente en estos animales (Heuer et al. 2012).

En 1995, se describió por primera vez un modelo amiloidogénico que desarrollaba placas de A β (Games et al. 1995). El llamado ratón PDAPP se generó expresando la mutación familiar de APP V717F (Indiana) bajo el promotor del factor de crecimiento- β derivado de plaquetas dirigido por neuronas (PDGF β). Otro de los primeros modelos desarrollados portaba la mutación de origen sueco de APP (APPswe) K670N/M671L, comúnmente estudiada, se expresó en el modelo de ratón APP23 bajo el control del promotor murino Thy130 (Götz, Bodea, y Goedert 2018). Luego, surgieron modelos de ratón con más de un transgen mutado, como el APP/PS1 que porta la mutación APPswe y el gen de presenilina-1 con la delección del exón 9. La cepa 5 \times FAD es un modelo muy agresivo, combina la mutación APPswe con las mutaciones Florida (I716V) y London (V717I) de APP, así como las mutaciones M146L y L286V de PSEN1 (Scearce-Levie, Sanchez, y Lewcock 2020). Nuevas tecnologías de edición genética, como CRISPR, han permitido la expansión de modelos de EA basados en la recombinación dirigida por homología. Al diferir sólo en tres residuos de aminoácidos la secuencia murina de A β puede humanizarse fácilmente mediante un *knock in* empleando esta técnica, dejando la mayor parte de la secuencia de APP murina, lo que codificará para una proteína híbrida que no existe en humanos ni en ratones. Sin embargo, las primeras modificaciones empleadas en el gen APP (sueca, Indiana, holandesa, londinense), incluso combinadas, no indujeron la formación de depósitos de A β , por lo que requieren combinaciones específicas, y demostrando que la sobreexpresión es importante para el desarrollo de esta patología en roedores. Sin embargo, la posibilidad de combinar variaciones genéticas específicas, estos ratones basados en recombinación dirigida por homología tienen el potencial de dar lugar a una nueva generación de modelos transgénicos en la investigación de la EA (Drummond y Wisniewski 2017).

Para la realización de esta Tesis, se empleó el modelo murino de EA PDAPPJ20. Este ratón expresa la proteína APP humana con las mutaciones sueca (K670N/M671L) e Indiana (V717F) que afectan a la secuencia de la APP (Mucke et al. 2000). Ambas mutaciones aumentan la producción de A β 1-42, y al estar bajo un promotor de expresión constitutiva PDGF β , el transgén se sobreexpresa. Se conoce el mecanismo de la mutación sueca, la cual aumenta la susceptibilidad de la APP a ser procesada por la β -secretasa, lo que conduce a una mayor producción de A β 1-42. Estos cambios causan altos niveles del péptido de alta toxicidad y promueven la agregación del péptido en forma de placas amiloides en el cerebro. La producción de A β 1-40 también se ve acelerada, aunque en menor proporción. Los ratones PDAPPJ20 muestran déficits cognitivos progresivos desde los 3 meses, especialmente en tareas relacionadas con el aprendizaje espacial y la memoria, que son características de la EA en humanos (Ameen-Ali et al. 2019). Nuestro grupo ha descrito cambios comportamentales y alteraciones tempranas en la neurogénesis (Pomilio et al. 2016). También se observan depósitos amiloides en los vasos sanguíneos cerebrales, característicos de la angiopatía amiloide cerebral, los cuales resultan positivos para la marca de A β desde los 3 meses, y continúan depositándose progresivamente. Los depósitos vasculares se presentan concomitantemente al aumento del extravasado de proteínas de sangre al parénquima cerebral, lo que evidencia daño a la BHE (Shibly et al. 2023). Además, estos ratones exhiben una respuesta inflamatoria crónica en el cerebro, caracterizada por la activación de células gliales y la liberación de mediadores proinflamatorios. Las placas amiloides en el parénquima cerebral se observan a partir de los 6 meses, con colocalización de microglía activada y astrocitos reactivos (Ameen-Ali et al. 2019).

La fisiopatología de este modelo refleja muchos aspectos de la enfermedad en humanos, lo que ofrece una plataforma robusta y relevante para estudiar los mecanismos subyacentes y estudiar posibles tratamientos. En la Parte 10.1 de la Discusión se discutirá con más detalle las consideraciones respecto a modelos experimentales de la EA, en particular el PDAPPJ20.

El hipocampo

La corteza del lóbulo temporal medial incluye subdivisiones importantes, como el hipocampo y la corteza entorinal. El hipocampo constituye una estructura cerebral bilateral situada hacia el interior de los lóbulos temporales en los humanos, o en la porción caudal del cerebro

anterior de los roedores (Figura 4). El hipocampo es una región crucial para la consolidación de la memoria declarativa, episódica y espacial, siendo determinante en la capacidad de un individuo de orientarse en el espacio y también participa de la formación de memorias a largo plazo. En los roedores, el hipocampo parece ser especialmente importante para recordar la configuración espacial de los lugares. La anatomía particular del hipocampo se encuentra en íntima relación con los procesos y funciones que desempeña (Spencer y Bland 2019).

El giro o formación hipocampal (el hipocampo “completo”), que se detalla en la Figura 4B y C, está formada por el pliegue del giro dentado, el hipocampo propiamente dicho o *cornu ammonis* (Cuerno de Ammon; CA) y hacia la parte inferior, el subiculum. El giro dentado y el hipocampo propiamente dicho forman 2 anillos en forma de C que se entrelazan. El hipocampo propiamente dicho, es una estructura laminar y se encuentra organizado en 3 capas horizontales, que a su vez se dividen en subregiones verticales, CA1, CA2 y CA3, ubicadas desde la región más externa del hipocampo hacia lo más cercano al giro dentado, respectivamente, y desempeñan roles específicos en la codificación y recuperación de información espacial y contextual.

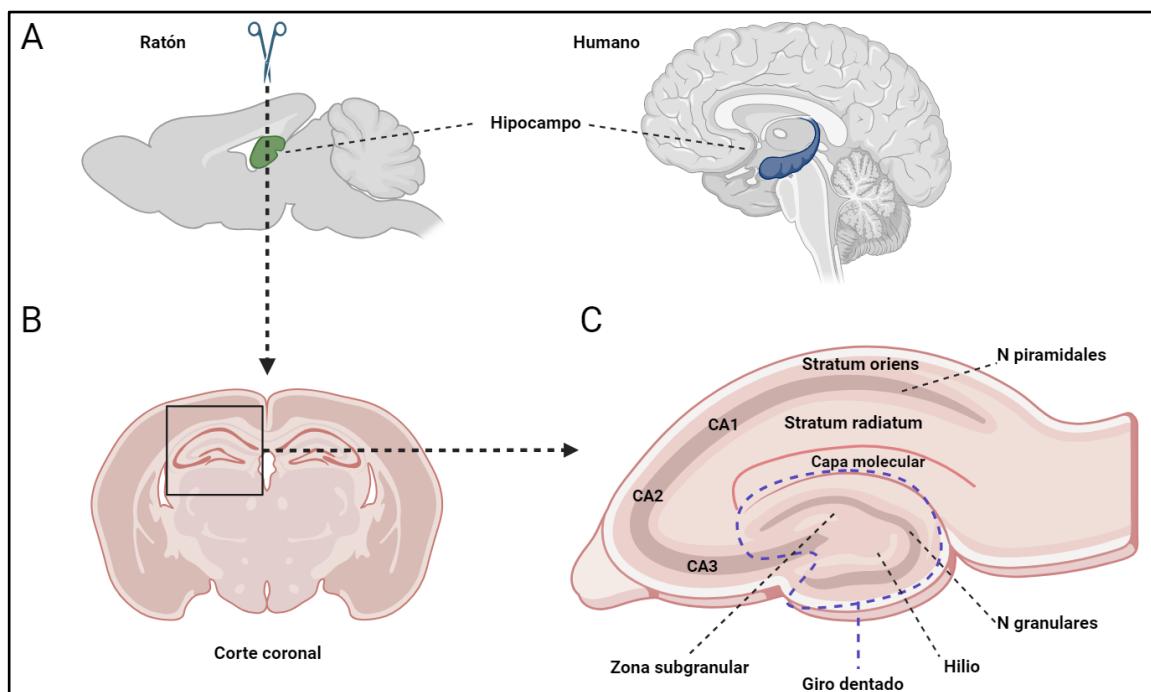


Figura 4. Estructura y organización del hipocampo. A) Se muestra la comparación (sin seguir escala) en forma y localización dentro del cerebro entre el hipocampo de ratón (izquierda, color verde) y el hipocampo humano (color azul). B) Esquema que ilustra la estructura del hipocampo de ratón tal como se observa en un corte coronal de cerebro. La sección del hipocampo se amplía en C). En el giro dentado (delimitado por la línea de puntos en azul)

se indican algunas de sus subregiones: la capa de neuronas granulares (*N. granulares*), la zona subgranular y el hilio. En el hipocampo propiamente dicho se señalan las capas: *Stratum oriens*, la capa de neuronas piramidales (*N. pyramidales*), *Stratum radiatum*, capa molecular. Imagen creada con Biorender.

La formación hipocampal contiene principalmente dos tipos de células neuronales: las células piramidales y las células granulares, que son del tipo glutamatérgicas, por lo que las sinapsis del hipocampo son mayormente excitatorias, aunque también hay presencia de interneuronas GABAérgicas, esenciales para modular la excitación y evitar la sobreexcitación neuronal, contribuyendo así al procesamiento adecuado de la información y la regulación de la actividad en el sistema nervioso.

Las neuronas piramidales constituyen la capa medial del hipocampo propiamente dicho y se encuentran alineadas en la misma orientación, haciendo de esta una capa compacta, con árboles dendríticos hacia el *stratum radiatum* y el *stratum oriens* (Figura 4C). En el giro dentado se encuentran las neuronas granulares, de una morfología relativamente uniforme con cuerpos celulares pequeños, esféricos u ovoides. El espacio entre las dos láminas del giro dentado se denomina hilio o región polimórfica del giro dentado.

El hipocampo se encuentra altamente conectado a otras regiones cerebrales. La corteza entorrinal proporciona entradas directas a las regiones CA1 y CA3, donde las neuronas son capaces de integrar o comparar la información directa y procesada procedente de la región entorrinal. También existen amplias conexiones recíprocas entre la región CA1 del hipocampo y la amígdala, otras regiones del neocórtex, como también una proyección de CA1 al subículo y otras estructuras subcorticales. A partir de sus conexiones, se cree que el hipocampo es capaz de recibir un amplio contenido sensorial multimodal procedente de las experiencias en curso. Las fibras nerviosas que se extienden desde el giro dentado cumplen un rol muy relevante en la integración de información, estableciendo conexiones salientes con otras regiones del cerebro como la corteza entorrinal y además proyectando hacia diferentes áreas del propio hipocampo, permitiendo la comunicación entre el giro dentado y otras subregiones. En particular, el hilio del giro dentado desempeña un papel importante en la modulación de la excitabilidad y la conectividad entre regiones. La región subgranular adyacente al hilio (Figura 4C) alberga células proliferativas, oligodendrocitos, glía y células endoteliales de las cuales depende la neurogénesis hipocampal (García-Martínez, Sánchez-Huerta, y Pacheco-Rosado 2020). La neuroplasticidad en el cerebro adulto de los mamíferos implica cambios dinámicos

en la arborización neuronal, la densidad de espinas y la formación de sinapsis. Se han detectado signos de neurogénesis hipocampal adulta en casi todos los mamíferos (Kempermann et al. 2018). Este proceso disminuye en pacientes con EA y modelos animales de la enfermedad, lo que se ha asociado al impedimento de la formación de nuevas memorias y al déficit cognitivo (Tiwari et al. 2023). En general, al comparar el hipocampo de humanos y ratones, se mantiene la ubicación relativa de las distintas partes.

Estudios recientes se han enfocado en mapear la microvasculatura hipocampal, región menos estudiada que otras regiones de la corteza por su localización más profunda. El suministro sanguíneo del hipocampo ocurre por bifurcaciones de la arteria cerebral posterior y, en menor medida, de la arteria coroidea anterior. Sin embargo, en humanos, la variabilidad entre individuos es alta y en mamíferos más pequeños, las vías anteriores parecen tener mayor preponderancia en el suministro, lo que podría generar diferencias de la vasculatura hipocampal entre humanos y roedores. En ambas especies, la vascularización del hipocampo es significativamente menos densa que otras regiones, siendo la segunda más baja luego del cuerpo caloso. Pocas arterias penetran el hipocampo y lo hacen de manera tangencial a la superficie, a diferencia de la penetración perpendicular de la corteza, mientras que los capilares se encuentran más espaciados que en otras regiones, lo que podría dificultar la difusión del oxígeno (X. Zhang et al. 2019; Ji et al. 2021; Spallazzi et al. 2019). Estas particularidades llevaron a considerar al hipocampo como una zona vulnerable a la hipoxia, ya que deficiencias en el suministro sanguíneo podrían tener un impacto más fuerte en esta región que en otras mejor abastecidas y con una red más amplia.

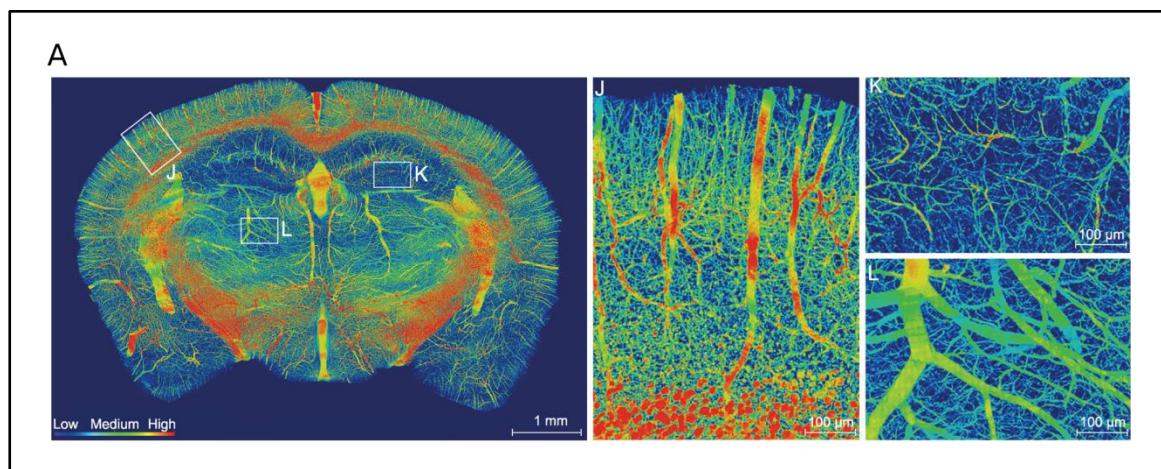


Figura 5. La compleja red vascular en un ratón C57BL/6. Zhang y colaboradores utilizaron un método de optimización de imágenes para analizar los datos de la tomografía de seccionamiento micro-óptico, abarcando todo el sistema vascular, desde los grandes vasos hasta los capilares más pequeños, con una resolución de submicrones. A) Proyección de máxima intensidad (MIP) de la sección coronal de 400 μm de grosor con la densidad volumétrica vascular codificada en color (baja (Low), media (Medium) y alta (High). Las zonas recuadradas muestran la corteza (J), el hipocampo (K) y el tálamo (L) en mayor aumento. Imágenes de Zhang et al, National Science Review 2019.

Recientemente, Zhang y colaboradores mostraron patrones específicos de la red vascular en las diferentes regiones cerebrales de ratones mediante el análisis de una reconstrucción 3D de muy alta resolución de cerebros completos (X. Zhang et al. 2019). En este trabajo determinaron que el hipocampo de ratones C57BL/J (*wild type*) presentaba una menor capacidad volumétrica de los vasos, lo cual se observa en la Figura 5, así como el diámetro y la longitud de los vasos. En particular, el giro dentado presentaba particularidades como cambios abruptos de diámetro de los vasos y ángulos de las ramificaciones, generando un patrón único en esta región. Además, compararon con los ratones modelos de la EA APP/PS1, observando una disminución del diámetro de los vasos, densidad vascular y ángulo de las ramificaciones en comparaciones con ratones control, siendo el giro dentado la región más comprometida. La Figura 6 muestra imágenes obtenidas de este trabajo donde es posible visualizar la disminución de la densidad y cambios en la estructura vascular, incluyendo alteraciones en la organización especialmente en el giro dentado, del hipocampo en ratones con EA.

Estudios recientes han podido corroborar una atrofia temprana en esta región en pacientes con daño vascular (X. Li et al. 2016) y una vulnerabilidad mayor de esta región a condiciones hipóxicas e isquémicas en ratas (Sugawara et al. 2002). La reducción de la perfusión hipocampal es un evento fisiológico del envejecimiento que contribuye a la pérdida cognitiva y en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la EA (Perosa et al. 2020; Heo et al. 2010; Nikonenko et al. 2009).

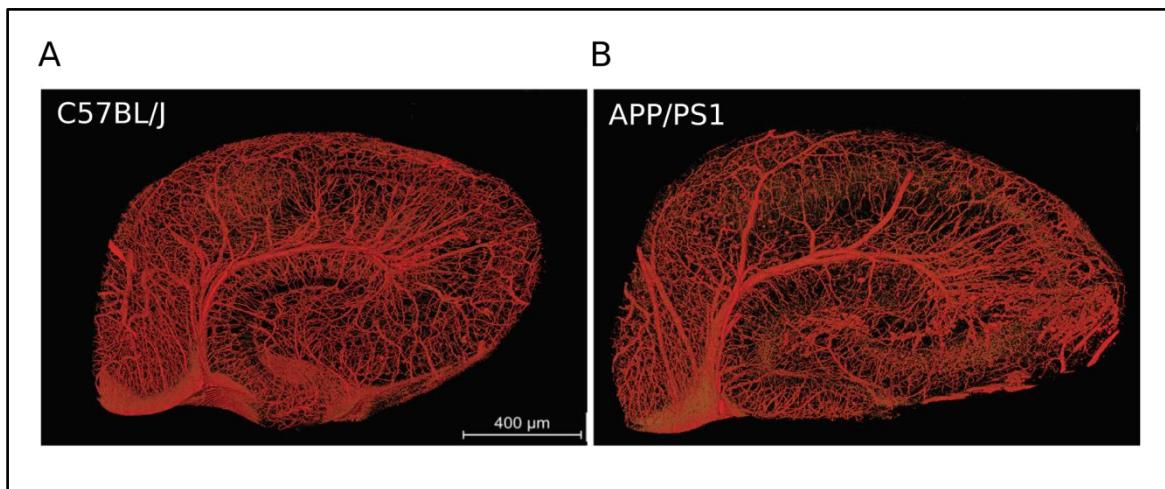


Figura 6. A-B) Comparación de la vasculatura del hipocampo entre ratones C57BL/J (wild type) y APP/PS1 (EA). Imágenes de cortes coronales representativos de la vasculatura del hipocampo. Imágenes de Zhang et al, National Science Review 2019.

La BHE del hipocampo también muestra mayores alteraciones en etapas tempranas del envejecimiento y la pérdida cognitiva que en otras regiones del cerebro. Se ha descrito que la permeabilidad de la vasculatura hipocampal es la primera en alterarse en pacientes con déficit cognitivo temprano, incluso previamente a la presencia de alteraciones en la corteza. Se ha sugerido que dicha alteración podría deberse a la pérdida de capilares funcionales (Nation et al. 2019). Además, Montagne y colaboradores demostraron que la disrupción de la integridad de la BHE del hipocampo se asocia al proceso de envejecimiento (Montagne et al. 2015).

La bibliografía sugiere entonces que los cambios vasculares del cerebro ocurren tempranamente en el hipocampo en la EA, lo cual razonablemente afectará la función neuronal, la memoria y los procesos cerebrales superiores. El hilio, a su vez, es una zona esencial para la transmisión de información del hipocampo. Por lo tanto, los cambios que sucedan en esta región pueden ser cruciales en el desarrollo de una neuropatología.

Unidad Neurovascular

La Unidad Neurovascular (UNV) es un complejo funcional altamente especializado que desempeña un papel fundamental en la regulación y protección del microentorno del SNC (Iadecola 2017). Esta unidad está compuesta por distintos tipos celulares, incluyendo células

endoteliales, células gliales, pericitos, neuronas, células de músculo liso vascular y la matriz extracelular. El correcto funcionamiento del cerebro depende de manera crucial de la comunicación y coordinación de los distintos componentes de la UNV (Presa et al. 2020).

El núcleo de la UNV es la BHE, que se compone de células endoteliales altamente especializadas situadas en la interfaz entre el torrente sanguíneo y el parénquima cerebral. Estas células endoteliales (ECs) forman una barrera dinámica y selectiva cuya característica principal es su baja permeabilidad gracias a la presencia de proteínas de unión y moléculas de adhesión estrecha, sellando los espacios de contacto célula-célula, lo que evita casi todo transporte paracelular. Estas uniones estrechas presentan proteínas de unión como ocludina y claudina, entre otras. A su vez, se anclan al citoesqueleto por medio de adaptadores como la proteína *Zonula occludens-1* (Figura 8). Estas uniones están reforzadas por proteínas cadherinas y cateninas que establecen uniones adherentes entre las células endoteliales. Las ECs presentan canales iónicos, receptores y transportadores específicos y carecen de fenestraciones (Xiao et al. 2020) Estos elementos permiten el transporte selectivo de nutrientes esenciales y la eliminación de productos de desecho del cerebro, contribuyendo a mantener la homeostasis cerebral.

La UNV desempeña un papel crítico en la regulación de la perfusión sanguínea cerebral y asegura que el cerebro reciba el suministro de sangre y nutrientes necesarios para su funcionamiento. La comunicación neurona-astrocito-vaso es requerida para adaptar el flujo sanguíneo según las necesidades energéticas de las neuronas durante la actividad metabólica en las distintas regiones del cerebro (Hariharan et al. 2022). A su vez, el intercambio de señales es bidireccional, lo que significa que los distintos tipos celulares residentes en el parénquima cerebral son capaces de recibir señales de la vasculatura y responder en consecuencia.

El intercambio de señales y la coordinación de los componentes de la UNV son vitales para el mantenimiento de la homeostasis cerebral, incluyendo la protección del ambiente cerebral, el correcto intercambio de metabolitos y sustancias de desecho a través de la BHE, como también para garantizar el correcto funcionamiento de la actividad neuronal.

Las neuronas son las células principales del sistema nervioso responsables de la transmisión de señales eléctricas y químicas, que permiten la comunicación dentro del cerebro y entre el cerebro y el resto del cuerpo. Estas células especializadas procesan y transmiten información

a través de sinapsis, donde se liberan neurotransmisores que activan receptores en células blanco, ya sean otras neuronas, células musculares o glándulas.

Para que las neuronas funcionen de manera óptima, necesitan un suministro constante de oxígeno y nutrientes, así como la eliminación eficiente de productos de desecho. Aquí es donde la UNV juega un papel crucial.

Estructura del árbol vascular

La evidencia, aunque lejos de ser suficiente, sugiere que la función vascular cambia gradualmente a través de la red vascular, y que no habría límites claros entre las funciones que mayormente ejercen las arterias, arteriolas, precapilares y capilares. Esto se relaciona con que diferentes tipos celulares y sus respectivos marcadores funcionales muestran ventanas temporales de aparición. Estos cambios paulatinos de función y composición de la vasculatura forman parte de un conocimiento reciente y se conoce como zonalidad (*zonation*) (Vanlandewijck et al. 2018). Sin embargo, los distintos niveles del árbol vascular pueden ser caracterizados por el tamaño de los vasos, las células presentes y sus funciones más típicas. La sangre se transporta a través de los vasos de más calibre que se extienden sobre la superficie cortical, llamadas arterias piales. De estas arterias surgen ramificaciones que penetran el cerebro, que a su vez tienen distintos niveles de ramificación, variando tanto en tamaño como en la composición celular.

La capacidad contráctil se concentra en arterias y arteriolas y, por ende, éstas contribuyen de manera relevante al control de la perfusión. Allí, la regulación del flujo sanguíneo cerebral depende en gran proporción del papel de las células musculares lisas vasculares (VSMCs por sus siglas en inglés *vascular smooth muscle cells*) en la regulación del diámetro arteriolar y arterial, gracias a la presencia de mecanismos y proteínas contráctiles.

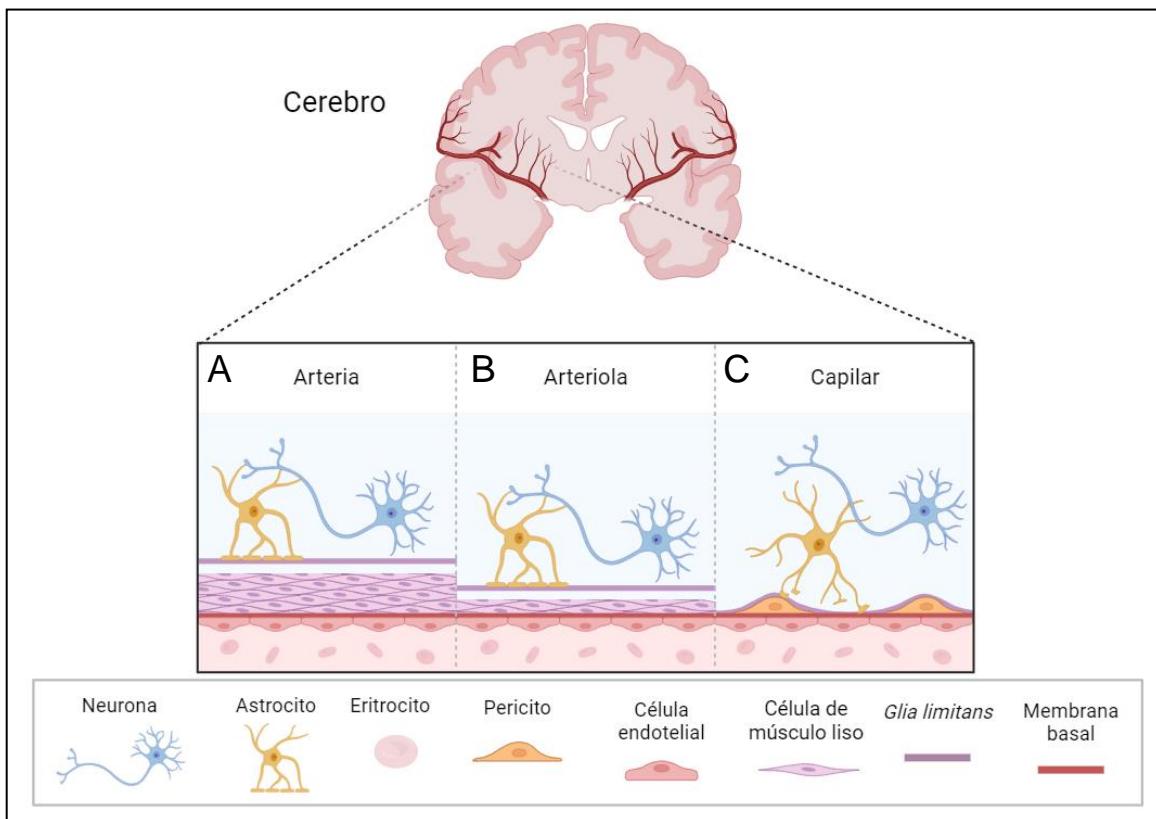


Figura 7. Componentes y organización de la vasculatura de la UNV. Esquema representando algunos segmentos del árbol vascular. A) En las arterias, una monocapa de células endoteliales reviste el lumen de los vasos sanguíneos, envuelta por varias capas de células de músculo liso, que comparte la membrana basal con el endotelio. Tanto los pies astrocíticos, que conforman la glia limitans como proyecciones neuronales, pueden contactar la vasculatura. B) Las ramificaciones arteriales dan lugar a las arteriolas, que se diferencian principalmente por presentar una sola capa de células de músculo liso. En ambos niveles, se encuentra el espacio de Virchow-Robin o espacio perivascular entre los vasos y la glia limitans. C) A nivel de los capilares, no se encuentran células de músculo liso, en cambio, los pericitos rodean el endotelio. El contacto con los pericitos mantiene el grado de diferenciación de las células endoteliales, y el contacto con los pies astrocíticos directo regula la expresión de proteínas de unión estrecha, integridad de la BHE e intercambio de fluidos de manera directa con el torrente sanguíneo. Imagen creada con Biorender.

En el nivel de las arterias penetrantes, de diámetro mayor a 25 µm, la UNV está compuesta por ECs que forman la capa interna hacia el lumen y que se encuentran envueltas en una membrana basal extracelular. La membrana basal se encuentra rodeada por una o tres capas de VSMCs, y recubiertas por pía (Figura 7A). Como se desarrollará en detalle más adelante, toda o gran parte de la vasculatura se encuentra envuelta por proyecciones del citoplasma de la astrogelia. Las arterias que penetran el cerebro se ramifican en arteriolas, de un diámetro de entre 10 y 25 µm, que cuentan con una capa de VSMCs (Figura 7B). Tanto la envoltura

vascular de los astrocitos como la capa endotelial son continuas desde las arterias penetrantes y río abajo hacia los capilares (Kisler et al. 2017). Además, las neuronas extienden sus procesos contactando las VSMCs y los astrocitos (Filosa et al. 2016). Sin embargo, en los vasos de menor calibre que se ramifican de las arteriolas, los precapilares y los capilares carecen de VSMCs y presentan otro tipo celular, los pericitos. Por lo general, los capilares murinos presentan un diámetro de entre 2 y 5 μm (Figura 7C) (X. Zhang et al. 2019).

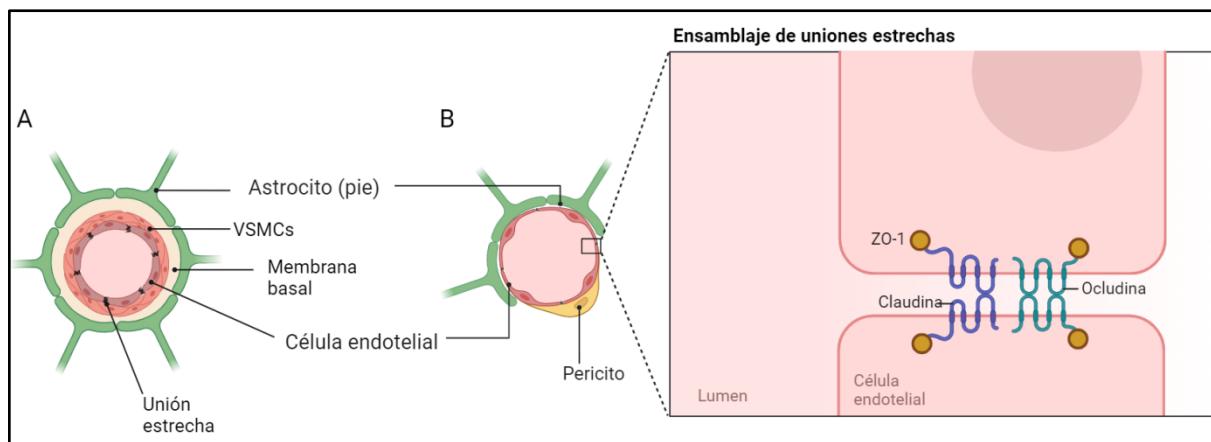


Figura 8. La BHE y uniones estrechas en los vasos sanguíneos del cerebro. Cortes transversales de A) arteriola y B) capilar, y sus componentes. La llamada con el rectángulo exemplifica cómo se establecen las uniones estrechas entre células endoteliales, uno de los complejos de uniones que sellan el espacio célula-célula, impidiendo el transporte paracelular. Se muestran las proteínas transmembrana claudina y ocludina, y la proteína adaptadora entre éstas y el citoesqueleto, Zonula occludens 1 (ZO-1). Imagen creada con Biorender.

Toda actividad biológica produce sustancias de desecho potencialmente tóxicas que deben ser eliminadas. Los tejidos periféricos son penetrados por los vasos linfáticos que desempeñan una función crucial en la eliminación del exceso de líquido y de residuos metabólicos. El cerebro carece de sistema linfático, aunque existen vasos linfáticos que recorren la superficie cerebral embebidos en la duramadre, la capa más externa de las meninges, que no entra en contacto con el tejido cerebral (Yankova, Bogomyakova, y Tulupov 2021). Otra diferencia que presenta la microvasculatura cerebral con otros órganos es que las venas, también encargadas de la eliminación, entran en contacto directo con el tejido. Sin embargo, al igual que las arterias, arteriolas y capilares, en el SNC prácticamente toda la vasculatura parece estar revestida por proyecciones astrocíticas formando lo que se conoce como *glia limitans*. Esta región de los astrocitos tiene características morfológicas y

bioquímicas particulares, y reciben el nombre de pies astrocíticos o podocitos. En consecuencia, la *glia limitans* forma un espacio entre el parénquima cerebral y la vasculatura por donde circula el LCR y donde se encuentran las arteriolas penetrantes y las venas del tejido. Esta cavidad es llamada espacio perivascular o espacio de Virchow-Robin, que puede ser de naturaleza periarterial o perivenosa.

En los últimos años, gracias al estudio *in vivo* de ratones, se ha identificado un sistema de transporte para la eliminación intersticial de sustancias de desecho del cerebro que utiliza este espacio perivascular para el transporte rápido de fluidos, que se denominó "sistema glinfático" (Figura 9) (Lohela, Lilius, y Nedergaard 2022; Iliff et al. 2012). En el trabajo pionero de Iliff y coautores, publicado en 2012, demostraron mediante el empleo de rastreadores moleculares el circuito por el cual transitan los fluidos. El movimiento de fluidos mediante el sistema glinfático se muestra en el esquema de la Figura 9. En este sistema, el movimiento vascular, impulsado por la pulsatilidad de arterias y arteriolas, los cambios de presión inspiratoria-espiratoria y la producción de LCR, facilitan el flujo del LCR desde el espacio perivascular de las arterias hacia el cerebro, donde se verifica una dirección de flujo. En el intersticio cerebral, el LCR se mezcla con el líquido extracelular cerebral, péptidos y metabolitos de desecho, y continúan en dirección al espacio perivascular donde se encuentran las venas. Dentro de este espacio, las sustancias de desecho pueden atravesar la BHE para ser eliminados. El fluido puede llegar a la duramadre donde también puede ser eliminado por los vasos linfáticos de las meninges, que luego convergen en la circulación sistémica (Carlstrom et al. 2022).

Sistema glinfático

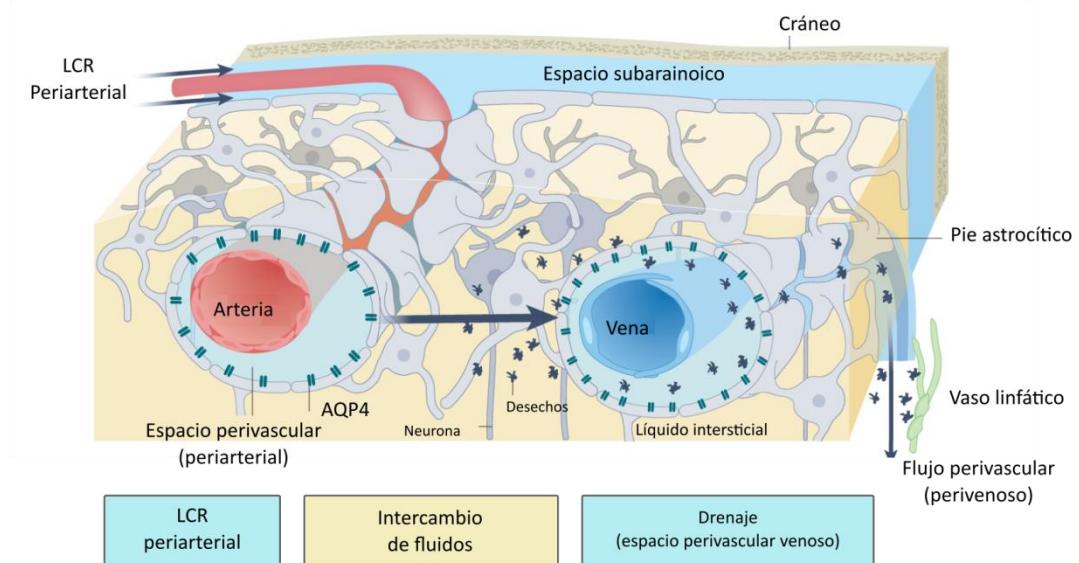


Figura 9. Esquema del sistema glinfático y el movimiento de fluidos a través del mismo. El LCR presente en el espacio perivascular de arterias continúa por el espacio perivascular de arterias y arteriolas penetrantes al cerebro. Dicho fluido entra al parénquima cerebral, donde ocurre un intercambio/mezcla con el líquido intersticial, lo que sirve para limpiar sustancias de desecho. El drenaje ocurre a través de los canales perivasculares que rodean las venas. La pulsosidad arterial y arteriolar, la producción de LCR y los canales de agua en los pies astrocíticos son mecanismos que contribuyen a la formación de este circuito. Imagen modificada de Lohela, Lilius & Nedergaard, *Nature Rev Drug Disc* 2022.

Se ha observado que los pies astrocíticos son fundamentales en este sistema, y que su función depende de la presencia de la proteína canal de agua acuaporina-4 (AQP4) en la interfaz cerebro-vascular (Mestre et al. 2018; Gomolka et al. 2023). La proteína AQP4 juega un doble papel, facilitando la entrada del flujo al compartimento intersticial del cerebro, y la posterior salida hacia el espacio perivascular venoso, gracias al direccionamiento que proporciona por el pasaje de agua. La conexión entre las neuronas, los astrocitos y la vasculatura para regular el flujo según la necesidad energética se denomina acoplamiento neurovascular (Gastfriend et al. 2024). Durante un incremento de la actividad neuronal, las arteriolas se dilatan y la respuesta se propaga de manera retrógrada hacia arterias penetrantes y arterias piales. Tanto en respuesta a la actividad neuronal como durante el reposo, el O₂ que consumen las neuronas y demás células proviene de los glóbulos rojos que son transportados por el sistema vascular, por lo que la correcta comunicación y coordinación desde las neuronas hacia los vasos, proceso que requiere la señalización astrocítica, es

crucial durante la actividad neuronal. Río abajo, las arteriolas y precapilares presentan pericitos contráctiles, que contribuyen al control hemodinámico. Estos vasos dan lugar a una intrincada red de capilares cubiertos por pericitos con escasa capacidad contráctil. Los pericitos comparten la membrana basal con las ECs, estableciendo contactos directos interdigitados con estas células, presentes en toda la extensión capilar. También a este nivel, tanto las ECs como los pericitos son cubiertas por los pies astrocíticos. Los capilares también se encuentran inervados por las neuronas locales, que se contactan tanto astrocitos como pericitos (Kisler et al. 2017).

Múltiples factores determinan tanto la integridad vascular estructural y funcional, como el estado de las células endoteliales, VSMCs o pericitos, como de aquellas que contactan la vasculatura mediante contactos físicos, como la astroglia, o enviando señales extracelulares, como la microglía residente en el SNC o los macrófagos circulantes en el torrente sanguíneo.

Células endoteliales

Las ECs de la microvasculatura cerebral son las únicas células en contacto con el torrente sanguíneo y, como se mencionó anteriormente, constituyen un continuo de células altamente selladas estableciendo la BHE, gracias a la presencia de uniones estrechas en los contactos célula-célula (Xiao et al. 2020) (Figura 10D). Las ECs conforman la primera línea protectora contra señales proinflamatorias, patógenos y otros componentes potencialmente neurotóxicos presentes en la periferia (Ahmad et al. 2020). Las ECs regulan el transporte de metabolitos, eliminación de sustancias de desecho y el pasaje de células inmunes. A la baja permeabilidad y ausencia de transporte inespecífico a través de la BHE, se le suma una particularidad de las ECs de microvasculatura cerebral, que es la escasa expresión de proteínas de adhesión para células inmunes y la elevada regulación de la migración de leucocitos, lo que impide la infiltración de células inmunes al cerebro, más frecuente en otros tejidos (Xiao et al. 2020). La correcta función vascular requiere el intercambio bidireccional de señales entre las ECs y los astrocitos, pericitos y células de músculo liso. La BHE permite la difusión de O₂ hacia el cerebro y recibe CO₂ de acuerdo con los gradientes de concentración. El endotelio es capaz de detectar y responder a cambios en el flujo sanguíneo a través de la detección mecánica de cambios en el *shear stress*, señales de células cercanas y acoplamiento eléctrico con VSMCs, lo que tiene por efecto controlar los procesos de

contracción y dilatación vascular (Iadecola 2013). La evidencia también respalda el envío de señales desde la vasculatura en respuesta a cambios de flujo y presión a los astrocitos, lo cual tiene por efecto modular la actividad neuronal, mecanismo llamado acoplamiento vascúlo-neuronal (Presa et al. 2020; K. J. Kim et al. 2016).

La cara basal de las ECs se encuentra adherida mediante integrinas a una matriz extracelular especializada llamada membrana basal, o lámina basal (Figura 10C). La misma se compone principalmente por proteoglicanos, incluyendo proteínas de la familia de los perlecanos, colágeno, laminina y fibronectina que son secretados por las ECs, los pericitos y los astrocitos (Thomsen, Routhe, y Moos 2017). La membrana basal otorga soporte estructural, colabora con el proceso de regulación del flujo, sirve de sustrato para la adhesión y resulta necesaria para la estabilidad y organización de la pared vascular. A su vez, contiene proteínas de señalización de procesos moleculares que modulan las respuestas celulares y ayuda a la detección mecánica de cambios en el flujo y la presión sanguíneos (Baeten y Akassoglou 2011).

La membrana basal cumple un rol importante en el mantenimiento de la homeostasis vascular y alteraciones en la misma llevan a pérdida de la integridad de la BHE (Mortensen et al. 2019; Roberts, Kahle, y Bix 2012). La presencia de moléculas de adhesión y otras proteínas de matriz extracelular modula el proceso de angiogénesis y ayudan a coordinar la comunicación entre los componentes de la UNV (Obermeier, Daneman, y Ransohoff 2013).

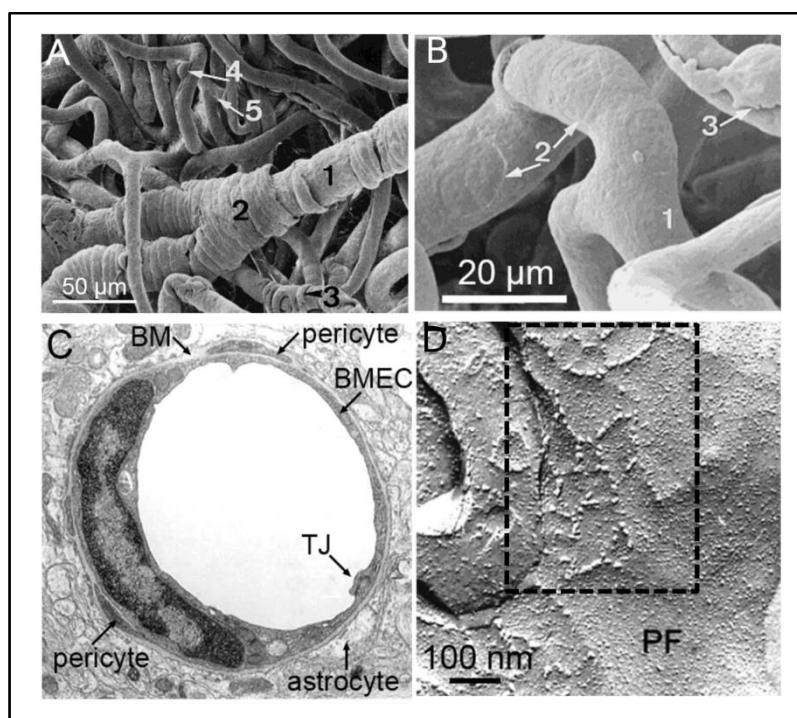


Figura 10. A) Micrografía electrónica de barrido de médula espinal humana que muestra: (1) arteriola con (2) células de músculo liso envueltas circunferencialmente; un pericito capilar (4), capilares (5). B) Capilares (1), donde se observa la marca del núcleo del endotelio (2), y pericitos (3). C) Corte transversal de capilar, mostrando la estructura y contacto entre células endoteliales (BMEC), pericitos, membrana basal (BM). Se observa la estructura de la unión estrecha (TJ) que implica un intrincado contacto de dos células endoteliales. D) Preparado de capilar de la cara basal donde se observa la apariencia de las uniones estrechas (delimitadas con línea punteada). Imágenes de micrografía electrónica obtenidas de Destefano et al 2018 y Rodriguez-Baeza 1998.

Células de músculo liso vasculares (VSMCs)

En las arteriolas penetrantes, una sola capa de VSMCs envuelve la membrana basal, que a su vez cubre toda la capa de células endoteliales (Figuras 7B y 10A) (Rodriguez-Baeza et al. 1998). Las VSMCs desempeñan un papel esencial en la regulación del tono vascular en virtud de la capacidad contráctil que le otorgan la expresión de proteínas contráctiles como la actina de músculo liso, cadena pesada y liviana de miosina (B. Kim et al. 2022; Poittevin et al. 2014), y también contribuyen a la elasticidad arterial mediante la secreción de proteínas extracelulares (Wight 2008). Las VSMCs además participan en el acoplamiento neurovascular, recibiendo señales que se traducen en cambios de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} , lo que activa canales de potasio y, en consecuencia, modifica el estado contráctil de las proteínas miosina (Hayes et al. 2022). A su vez, se ha visto que las VSMCs son capaces de responder a estímulos mecánicos, contribuyendo a la regulación del tono vascular ante cambios en la presión (Y. Z. Liu et al. 2022). La presencia de uniones gap entre VSMCs permite la propagación intramural de señales vasoactivas y una rápida respuesta vascular (Gastfriend et al. 2024; Presa et al. 2020).

En ciertas condiciones y patologías neurodegenerativas las VSMCs pueden volverse hipercontráctiles, impidiendo una correcta dilatación vascular (Hayes et al. 2022). En pacientes con la EA y en modelos experimentales se ha reportado evidencia de un fenotipo de VSMCs hipercontráctil asociado a una disminución en la expresión de receptores involucrados en la eliminación de $\text{A}\beta$ a través de la vía vascular (Chow et al. 2007; Bell et al. 2009). La evidencia también muestra que el sistema inmune podría estar involucrado en la degeneración de las VSMCs en pacientes con EA, a través de un aumento de anticuerpos anti-músculo liso que detectan la proteína miosina, actina y troponina (Giulia et al. 2016). El cambio fenotípico de las VSMCs podría, por lo tanto, afectar la capacidad del sistema vascular

cerebral para adaptarse a cambios en la demanda metabólica, comprometiendo la oxigenación cerebral. Esta hipótesis se respalda en estudios que demuestran que pacientes con déficit cognitivo moderado y pacientes con EA presentan disminución en la reactividad cerebrovascular, un indicador de la habilidad intrínseca de los vasos sanguíneos cerebrales para contraerse o dilatarse en respuesta a estímulos vasoactivos y el flujo sanguíneo cerebral (Richiardi et al. 2015; Cantin et al. 2011; Vicenzini et al. 2007).

Pericitos

Los pericitos son células que conforman la pared vascular de vasos de bajo calibre y capilares necesarios para la conformación de la membrana basal y la regulación del flujo sanguíneo (Figuras 7C y 10B-C) (DeStefano et al. 2018). Los pericitos se entrelazan con las ECs y forman uniones con estas células mediante cadherinas y conexinas (Winkler, Bell, y Zlokovic 2011). También se ha mostrado que los pericitos son capaces de fagocitar moléculas tóxicas (Winkler, Bell, y Zlokovic 2011; Bell et al. 2010). Los pericitos regulan múltiples procesos celulares en homeostasis cerebral y durante el desarrollo patológico, incluyendo la formación y el mantenimiento de la BHE, la modulación de la expresión génica en ECs y contribución a procesos neuroinflamatorios. Su capacidad para responder al glutamato sugiere que durante la actividad neuronal colaboran con el aumento del diámetro vascular mediante la secreción de moléculas vasoactivas (Hall et al. 2014). En distintas enfermedades neurodegenerativas, como la EA, los pericitos muestran alteraciones morfológicas y funcionales (Montagne et al. 2020).

Astrocitos

Los astrocitos son las células gliales más abundantes del SNC (Z. Liu y Chopp 2016) y derivan de células progenitoras neurales de la zona ventricular durante el desarrollo temprano, por lo que tienen un origen común con las neuronas (Kriegstein y Alvarez-Buylla 2009). Los astrocitos están integrados en todos los procesos que ocurren en la UNV, incluido su desarrollo, mantenimiento de procesos y su adaptabilidad (Verkhratsky y Nedergaard 2018). Cada astrocito posee múltiples proyecciones que entran en contacto con las neuronas, otras células gliales y vasculares necesarias para su funcionamiento. Además, presentan una alta heterogeneidad respecto los receptores, canales y transportadores de membrana que

expresan, contribuyendo a su plasticidad adaptativa (Batista et al. 2024; Magni, Riboldi, y Ceruti 2024; Guizzetti et al. 2008). Una de las funciones primordiales de la astroglia es mantener la homeostasis del SNC transportando los principales iones y protones, eliminando y catabolizando neurotransmisores, liberando precursores de neurotransmisores y eliminando especies reactivas del oxígeno (Dringen, Pfeiffer, y Hamprecht 1999; Simard y Nedergaard 2004; Ashour y Deuchars 2004; Hertz, Peng, y Dienel 2007). También son capaces de percibir cambios en el microambiente a partir de estas moléculas, que activan diversos procesos de señalización astrocítica.

Los astrocitos han mostrado la capacidad de expresar prácticamente todos los receptores encontrados en el CNS (Verkhratsky y Nedergaard 2018). incluidos los receptores de neurotransmisores, los cuales coinciden con las neuronas vecinas, por lo que es probable que esté controlada por el entorno neurotransmisor local (Kofuji y Araque 2021; Verkhratsky y Chvátal 2020). Esto sugiere que pueden captar los neurotransmisores liberados por aferentes neuronales accesibles por contacto, en lo que se denomina sinapsis tripartita (Halassa et al. 2007). Los astrocitos cumplen una función esencial en el soporte metabólico de las neuronas, siendo capaces de sintetizar glucógeno y suministrar sustratos energéticos a las neuronas, como el lactato.

El secretoma de los astrocitos comprende un repertorio de al menos 180 proteínas, interviniendo en diferentes procesos como moduladores de transmisión sináptica, reactividad vascular, entre muchos otros (Dowell, Johnson, y Li 2009). En situaciones de daño o patológicas, los astrocitos pueden liberar también señales proinflamatorias, como TNF α , IL1 β y complemento 3 (C3).

Por otro lado, los numerosos pies astrocíticos que contactan la cara abluminal de la superficie vascular establecen la interfaz gliovascular (Simard y Nedergaard 2004). Estos contactos, como previamente se mencionó, forman la *glia limitans* del sistema glinfático, aislando el parénquima cerebral de los compartimentos vascular y subaracnoideo (Xiaofeng Liu et al. 2013). Su contacto con la vasculatura les permite estimular tanto la vasoconstricción como la vasodilatación (Zonta et al. 2003; Mulligan y MacVicar 2004) y también regular el tono vascular en reposo (MacVicar y Newman 2015), lo que se ha vinculado a la activación del canal TRPV4, expresado en procesos astrocíticos de la corteza e hipocampo (K. J. Kim et al. 2016; Butenko et al. 2012).

Los astrocitos expresan tres tipos de proteínas de la familia de acuaporina, AQP1, AQP4, and AQP9 (Satoh et al. 2007), aunque la de mayor presencia es AQP4 (Nagelhus y Ottersen 2013), especialmente en los pies astrocíticos, donde su densidad es 10 veces más alta que en otra parte de la célula. La delección genética de AQP4 causa anomalías tanto en el transporte de fluidos y metabolitos del cerebro, como en la estructura cerebral (Gomolka et al. 2023) e induce un incremento del volumen del fluido intersticial. Esto puede conducir a un déficit en la eliminación o *clearance* de moléculas tóxicas y sustancias de desecho del cerebro. De manera relevante, se ha demostrado *in vivo* que el péptido A β soluble es transportado a través de esta ruta y de manera dependiente de AQP4, dado que la ausencia de este canal impide su correcta eliminación (Gomolka et al. 2023; Iliff et al. 2012). Además, la ausencia de AQP4 acelera la acumulación de proteínas neurotóxicas en la enfermedad de Parkinson (H. Cui et al. 2021). Respecto a la función hipocampal, los ratones AQP4 -/- exhiben una memoria espacial alterada (Skucas et al. 2011; Zhang et al. 2019) lo que se asoció a cambios en las corrientes eléctricas LTP y LTD.

En cuanto al mantenimiento de la integridad de la BHE, los astrocitos secretan factores que son cruciales para la regulación del fenotipo endotelial, como *sonic hedgehog*, ácido retinoico y angiopoyetina-1 (Gurnik et al. 2016; Alvarez et al. 2011). A su vez, como parte de la comunicación bidireccional, las ECs secretan proteínas morfogénicas que inducen la diferenciación de progenitores astrocíticos (Imura et al. 2008). Los astrocitos además regulan la matriz extracelular mediante la secreción de metaloproteininas (MMP). En particular, los astrocitos reactivos cercanos a vasos con depósitos amiloides aumentan la expresión de la MMP-2 en humanos (Greenberg y Vonsattel 1997). En modelos animales de la EA, también se comprobó la expresión de MMP2 y MMP9, lo que se asoció a una disminución de proteínas de unión estrecha, en particular claudinas, y aumento de la permeabilidad de la BHE (Zhao et al. 2015; Hartz et al. 2012).

Por último, los astrocitos, junto con la microglía, participan activamente en la respuesta inmunitaria, expresando diversos receptores y secretando mediadores solubles (Farina, Aloisi, y Meini 2007). En ambientes oxidativos o patológicos, pueden volverse reactivos, y actuar liberando citocinas y quimiocinas, modulando la BHE y formando cicatrices gliales (Jensen, Massie, y De Keyser 2013). Sin embargo, los astrocitos también tienen funciones

neuroprotectoras, incluida la resolución de la inflamación y la secreción de citoquinas antiinflamatorias (Klegeris 2021).

Microglía

La microglía, las células inmunes residentes en el cerebro (Bilbo y Stevens 2017), derivan de células progenitoras mieloides y entran al SNC temprano en el desarrollo, donde sufren procesos de diferenciación hasta convertirse a un fenotipo maduro ramificado en el momento del nacimiento (Brioschi, Zhou, y Colonna 2020). Entre sus funciones, se destacan el mantenimiento de la integridad y reparación de los tejidos y la eliminación de los desechos celulares (Luo et al. 2021). La microglía se encuentra constantemente en vigilancia del SNC (Nayak, Roth, y McGavern 2014), y su capacidad fagocítica dinámica y la liberación activa de señales inmunitarias, desempeñan funciones críticas en la homeostasis cerebral y en los procesos de reparación (Grassivaro et al. 2020; Hanisch y Kettenmann 2007)

La capacidad de estas células para captar y recibir estímulos del microambiente es esencial para mantener un estado no activado de la microglía y la homeostasis cerebral (Ransohoff y Perry 2009). Diversos mecanismos, o “puntos de chequeo” frenan la activación inmunitaria microglial al mismo tiempo que promueven las funciones homeostáticas (Deczkowska, Amit, y Schwartz 2018). Entre estos están las barreras físicas funcionales, como la BHE y la *glia limitans*, protegiendo el microambiente cerebral. Por otro lado, la inmunorreactividad microglial se ve limitada por diversos factores solubles que reciben de astrocitos y neuronas (Butovsky et al. 2014; Neumann et al. 1998). El tercer punto de chequeo inmune microglial que ha sido propuesto está comprendido por las señales generadas en los contactos célula-célula.

En condiciones patológicas, uno o más de los mecanismos de homeostasis fallan, y la microglía adopta un fenotipo reactivo proinflamatorio, que suele denominarse M1. Por ejemplo, mientras que en el desarrollo y la homeostasis la microglía participa en la sinaptogénesis y en la plasticidad sináptica (Casali y Reed-Geaghan 2021), en estado reactivo, ésta pierde su capacidad neuroprotectora, y puede liberar especies reactivas de oxígeno, llevando a la muerte neuronal (Block, Zecca, y Hong 2007).

La microglía desempeña un papel complejo en la patogénesis de la EA. En etapas tempranas, la fagocitosis mediada por estas células colabora en el proceso de eliminación de A β y de

restos de neuronas dañadas, y también liberan factores tróficos que ayudan a la reparación de tejidos (Vinuesa et al. 2019; Sarlus y Heneka 2017). Con la progresión de la enfermedad, las señales proinflamatorias microgliales, como interleuquina (IL)-1 β , IL-6, y el factor de necrosis tumoral α (TNF α), entre otras, contribuyen al proceso patológico y neurodegenerativo (Merighi et al. 2022; Sugama et al. 2009).

La literatura no ha sido determinante respecto de la influencia microglial en la función microvascular. Se ha observado que la microglía podría estar involucrada en la angiogénesis del cerebro embrionario (Fantin et al. 2010) y en la correcta formación de la red vascular (Foulquier et al. 2019; Rymo et al. 2011). En un escenario patológico, se ha visto que, tras un ictus cortical, la microglía es reclutada hacia los vasos, donde puede fagocitar células endoteliales y contribuir así a la mayor pérdida de integridad de la BHE (Jolivel et al. 2015). Sin embargo, aún se desconoce si la fagocitosis de las células endoteliales por parte de la microglía forma parte de un proceso fisiológico normal, ya que su ausencia no parece alterar la integralidad de la BHE (Halder y Milner 2019).

Vías de eliminación de A β y sus implicaciones en la patogénesis de la EA

Durante el envejecimiento, los mecanismos de eliminación de A β disminuyen progresivamente en su eficiencia (Bakker et al. 2016). Al encontrarse en mayores concentraciones, se generan agregados del péptido tanto en el parénquima cerebral como en la vasculatura. Se hipotetiza que la acumulación de A β es el resultado del desequilibrio entre la producción y su eliminación, dado por una producción excesiva de A β , disminución de la capacidad de las vías de eliminación, o ambas (Zuroff et al. 2017). Debido a que la EA se caracteriza por la acumulación de péptidos A β en el cerebro, el conocimiento de las complejas vías implicadas en la eliminación de A β es esencial para desentrañar los mecanismos subyacentes a la patogénesis de la EA.

Los monómeros y oligómeros de A β solubles son eliminados a través de los sistemas vasculares. Una eliminación deficiente de A β genera su deposición en placas parenquimáticas, donde abunda la especie A β 1-42, y depósitos vasculares, mayormente

compuestos por A β 1-40 y ubicados mayormente entre la membrana basal del endotelio y los pericitos (Bakker et al. 2016).

La eliminación defectuosa de A β a través de los sistemas vasculares ha sido sugerida como una de las causas de la forma esporádica de la EA (Shibly et al. 2023). APOE4 se asoció a una disminución de la eliminación de A β a través de los sistemas vasculares (J. Kim, Basak, y Holtzman 2009). Se sugiere que APOE es capaz de inhibir la elongación de fibrillas de amiloide, facilitando su eliminación a través tanto de la fagocitosis microglial como a través de los sistemas vasculares (Islam et al. 2020). El mecanismo de eliminación a través del espacio perivascular es crucial, y cualquier alteración, como el aumento de la carga de A β o las variantes de ApoE, podrían conducir a la deposición de A β en las paredes de los vasos (Folin et al. 2005).

A medida que avanza la patología de la EA, las alteraciones en la integridad de la BHE incrementan y pueden provocar una permeabilidad acelerada, impidiendo la eliminación de A β e incluso permitiendo el reingreso de los péptidos desde el lumen de los sistemas vasculares y, en consecuencia, provocando mayor acumulación de A β en el parénquima y los vasos cerebrales. Otro mecanismo de eliminación de A β es mediante la incorporación y degradación enzimática de células presentes en el SNC, como la fagocitosis mediada por microglía, la cual se ve comprometida en contextos patológicos. Los agregados persistentes de A β , a su vez, inducen neuroinflamación, disfunción sináptica y daño neuronal que son características de la EA.

En conclusión, restablecer las vías de eliminación de A β para mitigar su acumulación podría ser esencial en el desarrollo de terapias en el contexto de la EA y de la enfermedad cerebrovascular.

Inflamación y vasculatura en la EA

La vasculatura capta señales del microambiente, por lo que es susceptible en un contexto neuroinflamatorio como la EA. La microglía activada es el principal contribuyente de citoquinas proinflamatorias (S. Li et al. 2022; Y.-Y. Fan y Huo 2021; Liddelow et al. 2017). Entre ellas, TNF α aumenta la permeabilidad de la BHE vía la regulación negativa y degradación de proteínas de unión estrecha, que son las encargadas de limitar todo transporte paracelular (Johnson 2023; Alves et al. 2020; Rochfort et al. 2014). La disrupción

de la integridad de la BHE provoca una respuesta inflamatoria sostenida de la microglía reactiva por la entrada de componentes del plasma e infiltración de células del sistema inmune, exacerbando el fenotipo inflamatorio (Y.-M. Yang et al. 2013). Esto causaría una retroalimentación entre las señales proinflamatorias provenientes de la microglía y el aumento de la permeabilidad de la BHE, exacerbando el contexto patológico.

En respuesta a citoquinas proinflamatorias, hipoxia, *shear stress* o angiotensina-1, las células endoteliales expresan endotelina-1, lo que desregula la expresión de los transportadores selectivos sobre la membrana luminal de las células endoteliales y, por lo tanto, del transporte a través de la BHE (Bauer, Hartz, y Miller 2007). De manera relevante, la inhibición de la vía de TNF α produce mejoras cognitivas y disminución de la reactividad microglial en el hipocampo de ratones modelo de la EA (Gabbita et al. 2012). Esto podría estar vinculado al bloqueo de los mecanismos que provocan las alteraciones de los niveles de transportadores y el aumento del transporte paracelular en las células endoteliales.

Durante patologías e injurias, los astrocitos responden mediante una serie de cambios en la expresión génica, asociados con alteraciones en su morfología, la secreción de moléculas y de sus funciones. Estos astrocitos reactivos suelen caracterizarse por el aumento de la expresión de la proteína GFAP, que forma parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto (Zamanian et al. 2012). Además, tienen un efecto detrimental sobre la integridad de la BHE, a través de la liberación de las metaloproteinasas (Abdullah y Bayraktutan 2014; Spampinato et al. 2017), óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno (Muñoz, Paula-Lima, y Núñez 2018), que causan remodelación de la membrana basal y la disminución de proteínas de unión estrecha (Yue et al. 2022).

La reactividad astroglial y la activación de la microglía no son eventos independientes (Liddelow et al. 2017). En un contexto inflamatorio, la microglía es capaz de inducir un fenotipo inflamatorio astroglial A1, caracterizado por el aumento de la expresión de la proteína de complemento 3. Estos astrocitos inducen neurotoxicidad y se han detectado en patologías como la EA. En un trabajo reciente, Taylor y colaboradores describen un nuevo subtipo A1 de astrocitos inducidos por células endoteliales activadas mediante un estímulo proinflamatorio, que también resulta neurotóxico. Allí detectaron que el perfil de expresión de los astrocitos A1 inducidos por endotelio activado difiere del dependiente de microglía y se caracteriza por una fuerte expresión de genes asociados a la remodelación de la matriz

extracelular. De manera muy relevante, este fenotipo específico de A1 inducido por células endoteliales se observó en la cercanía de depósitos vasculares de A β tanto en pacientes como en modelos murinos de EA (Taylor et al. 2022). Esto podría indicar una señalización proinflamatoria desde el endotelio hacia estas células gliales durante la patología.

Proteostasis

El retículo endoplasmático (RE) desempeña un papel fundamental en la fisiología y la bioquímica de las células. El RE es una organela crucial en el metabolismo proteico que actúa controlando la calidad de la mayoría de las proteínas que la célula sintetiza, orquestando el plegamiento, la secreción y la translocación de las proteínas (Ren et al. 2021). El RE también cumple roles esenciales para la incorporación, liberación, almacenamiento y señalización de Ca²⁺ y participa en el metabolismo de lípidos (Paschen y Mengesdorf 2005; Verkhratsky 2005). La red del RE también se encuentra conectada con otras organelas, como endosomas, lisosomas, fagosomas, mitocondrias y la membrana plasmática, con quienes intercambia señales y iones (Ren et al. 2021). Independientemente del tamaño del RE, que varía según el tipo celular, el mismo opera cercano a sus límites de capacidad de procesamiento proteico. En consecuencia, la maquinaria de proteostasis del RE frecuentemente satura la carga disponible para continuar realizando sus funciones de manera correcta (Vásquez et al. 2022), lo que se denomina estrés de RE. Para contrarrestar dicho estrés, se activan mecanismos de señalización con el objetivo de recuperar la homeostasis, lo que se denomina Respuesta a Proteínas Mal Plegadas (UPR por sus siglas en inglés *unfolded protein response*) (Figura 11). También pueden activarse los mecanismos adaptativos de la degradación asociada a RE y la reticulofagia. La degradación asociada a RE se encarga de eliminar proteínas sin plegar o mal plegadas del lumen del retículo, transfiriéndolas al citoplasma para su degradación en proteasomas. Por su parte, la reticulofagia es una degradación selectiva por autofagia de regiones del RE para aliviar el estrés (Loi y Molinari 2020).

El bloqueo de las reacciones de plegamiento y procesamiento de proteínas constituye una forma grave de estrés celular y desencadena una respuesta de estrés específica. La eficiencia de los mecanismos que mantienen la homeostasis celular, incluyendo la proteostasis,

disminuye con el envejecimiento (Martínez et al. 2017). Como consecuencia, los organismos acumulan gradualmente agregados intracelulares compuestos por proteínas mal plegadas.

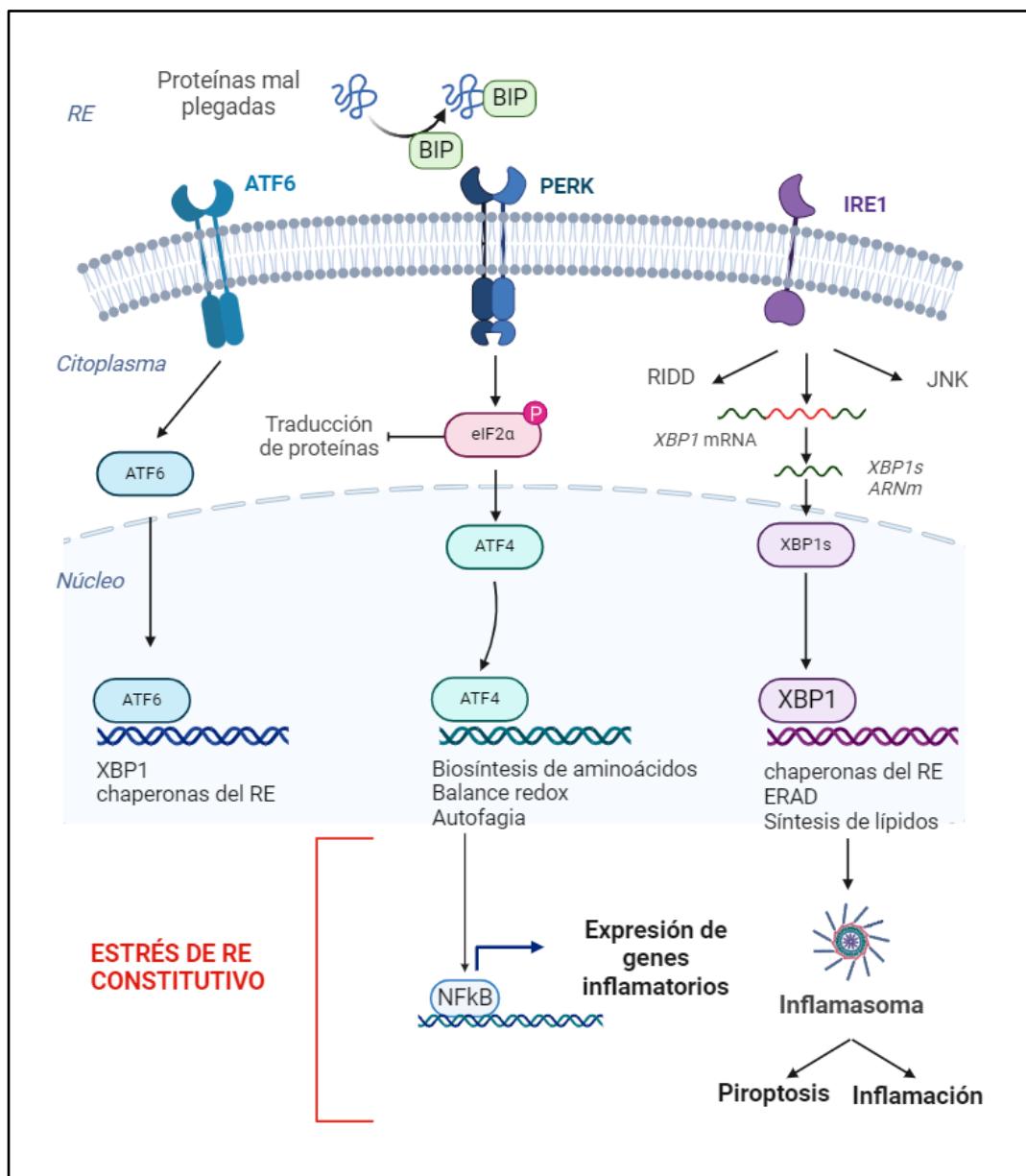


Figura 11. Estrés de RE: Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). La acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE entra en contacto con la chaperona BIP, causando su separación de los efectores de la UPR: ATF6, PERK e IRE1a. Esto da comienzo a la activación de vías de señalización dirigidas a la resolución del estrés de RE, como la síntesis de chaperonas, moléculas que participan del transporte de proteínas, detener procesos de traducción y transcripción globales y mecanismos de degradación, entre otros. Un estrés sostenido o de gran carga que no puede ser resuelto, lleva a mecanismos moleculares detallados para la célula, cuyo punto final son procesos inflamatorios e incluso la muerte celular (se ejemplifican algunos). Imagen creada con Biorender.

La UPR puede actuar mediante tres vías de señalización de proteínas efectoras residentes en el RE: la proteína 1 dependiente de inositol (IRE1), la quinasa de RE similar a la proteína kinasa tipo R (PERK) y el factor de transcripción activador 6 (ATF6). Dichas proteínas se mantienen inactivas por la unión en sus dominios luminales del RE a la proteína chaperona residente de RE, BIP (por proteína de unión a la inmunoglobulina, también llamada GRP78). La Figura 11 ilustra la activación de esta respuesta iniciada por BIP, y las vías de señalización posibles tras la activación de los tres efectores río abajo. En homeostasis, BIP es el principal sensor de la UPR y se encuentra unido a IRE1, PERK y ATF6. En situaciones de estrés, la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE provoca que BIP se escinda y se activen los sensores de UPR, iniciando cascadas de señalización para recobrar la homeostasis (Ajoolabady et al. 2022; Kopp et al. 2019).

La separación de BIP de PERK e IRE1 permite la dimerización de estos efectores y su autofosforilación. Como consecuencia, las tres vías causan la activación de factores de transcripción que inducen genes específicos, como se puede ver en la Figura 11. Al quedar libre IRE1, se activa su actividad de endorribonucleasa que cataliza el corte y empalme del ARNm que codifica para el factor de transcripción XBP1 (por *X-box-binding protein 1*). XBP1 es crucial para iniciar la transcripción de ARNm que codifican para proteínas chaperonas (incluyendo BIP), de control de calidad, y proteínas involcadas en el transporte de proteínas del RE al citosol y degradación de proteínas asociadas al RE (ERAD) (Yücel et al. 2019). Además, XBP1 contribuye a la degradación de ARNm y ARNmi mediante el proceso de decaimiento regulado dependiente de IRE1 (Maurel et al. 2014). PERK, luego de dimerizarse y autofosforilarse, inhibe la traducción general de proteínas al disminuir la forma unida a GTP del factor de iniciación eIF2 α y aumenta la traducción del factor de transcripción ATF4. Esta vía induce la transcripción de genes relacionados con el control de la UPR y detención del ciclo celular y proliferación (Fusakio et al. 2016). La disociación entre BIP y ATF6 permite la translocación de ATF6 al aparato de Golgi, donde es clivado, lo que permite su translocación nuclear y activación de su función de represor de la transcripción (Tam et al. 2018). También se ha observado que ATF6 puede actuar como factor de transcripción, induciendo genes involucrados con la capacidad de plegamiento y degradación de proteínas y genes involucrados en la angiogénesis y la autofagia (Bhardwaj et al. 2020).

Si la célula no logra recobrar el equilibrio del RE, la activación persistente de la UPR puede inducir una respuesta maladaptativa o sostenida, responsable de procesos inflamatorios e incluso la muerte celular (Figura 11). Una de las vías secundarias que se inducen es NF κ B, que en esta respuesta culmina en la activación del inflamasoma NLRP3 (Ajoobabady et al. 2022). NF κ B ha sido implicada en numerosas patologías, incluyendo la EA, donde juega un papel clave en la promoción de la neuroinflamación en células gliales y endoteliales (Clark et al. 2021; Mussbacher et al. 2019).

Además, la activación continua de XBP1 causa una degradación masiva de ARNm, incrementa la transcripción de genes proinflamatorios y promueve la formación del inflamasoma NLRP3 (Ajoobabady et al. 2022). En células endoteliales de aorta humana, se demostró que el estrés de RE induce la expresión de los factores proinflamatorios IL-6 e IL-8, la proteína quimioatractante de monocitos-1 (MCP1) y CXCL3 (Gargalovic et al. 2006). Por su parte, ATF6 puede inducir mecanismos que llevan a la muerte celular apoptótica causada por una represión general de la transcripción. Por otro lado, una activación exacerbada de la UPR puede por distintos mecanismos (principalmente la vía de PERK) inducir la expresión de proteína homóloga a C/EBP (CHOP). CHOP bloquea la transición de las células de la fase G1 a la fase S durante la progresión del ciclo celular y modula negativamente a Bcl-2, regulador de la permeabilidad mitocondrial. Esto permite la entrada de la proteína BAX a las mitocondrias y la subsiguiente liberación de Citocromo c, desencadenando la apoptosis mediante la activación de caspasa-3 (Qureshi et al. 2023). También se ha vinculado la inducción de CHOP a la activación sostenida XBP1. Otra manera por la cual el estrés de RE puede causar la apoptosis celular es mediante la liberación de Ca²⁺ que es captado por las mitocondrias y desencadena la señalización anteriormente mencionada involucrando al citocromo c (Pinton et al. 2008).

Varios estudios han vinculado a la patología de la EA con el estrés de RE. En cerebros de pacientes con EA temprana, se han detectado marcadores de estrés de RE en la corteza temporal y el hipocampo (J. J. M. Hoozemans et al. 2005). Trabajos previos demostraron un aumento de la presencia de las formas activadas (fosforiladas) de los efectores de UPR pPERK, pI κ B α , pIRE1 α en neuronas hipocampales (Duran-Aniotz et al. 2017; J. J. M. Hoozemans et al. 2005). Niveles incrementados de los efectores activados también son detectables en modelos murinos de la EA (Duran-Aniotz et al. 2017; Devi y Ohno 2014), y

han llevado a evaluar distintas intervenciones terapéuticas sobre esta vía, aunque los resultados no han resultado siempre consistentes (Hoshino et al. 2007). En contextos de estrés de RE constitutivo, la activación excesiva de las vías de UPR lleva la señalización de vías proinflamatorias como NF_κB y NLRP3, que se han detectado en el hipocampo de pacientes con EA (Ismael et al. 2021). *In vitro*, la señalización de NF_κB puede aumentar la expresión de BACE1, lo que podría contribuir al incremento de la amiloidogénesis (Roßner et al. 2006).

En cuanto a la UPR y sus marcadores en la vasculatura cerebral, la información con la que se cuenta es limitada. Un estudio reciente de traumatismo cerebral observó que la vasculatura respondía preponderantemente induciendo la expresión de la proteína XBP1 en la zona de la lesión (Zeng et al. 2009). *In vitro*, se ha demostrado que la alteración en el flujo sanguíneo genera una activación sostenida de XBP1, causando la desdiferenciación y apoptosis de células endoteliales. Esta expresión también se asoció a la pérdida de células endoteliales en la vasculatura y generación de placas ateroscleróticas en la aorta (Zeng et al. 2009).

Las células de microvasculatura cerebral en un microambiente inflamatorio son a la vez participantes activos y reguladores de los procesos inflamatorios. Se ha observado que diversos contextos patológicos como el estrés de RE, el estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y activación inmune, tienen en común la activación del inflamasoma NLRP3 en células endoteliales, lo cual contribuye a la disfunción vascular (Bai et al. 2020). Las injurias mediadas por NLRP3 se han vinculado a la expresión de moléculas de adhesión celular y quimiocinas, disfunción mitocondrial, internalización de proteínas cadherinas en los contactos célula-célula, disminución de la proteína de unión estrecha *zona occludens-1* y el remodelamiento del citoesqueleto, contribuyendo a la disfunción endotelial tanto *in vitro* como *in vivo* (X.-X. Li et al. 2019; Lv et al. 2017). Esto tiene por efecto un aumento de la permeabilidad endotelial, la infiltración exacerbada de células del sistema inmune y la hipercontractilidad en células endoteliales.

Además, en el contexto patológico, la señalización de NLRP3 puede llevar a la muerte celular de células endoteliales mediante un proceso de formación de poros en la membrana plasmática denominado piroptosis (Jiang et al. 2018). La piroptosis es un mecanismo de muerte celular programada causada por inflamación en la cual se encuentra involucrada la producción de IL-1 β y el subsecuente clivaje y activación de caspasa-1. Este proceso se ha

vinculado en modelos murinos de sepsis e intoxicación por cadmio con la disrupción de la BHE y la muerte de células endoteliales (Q. Chen et al. 2019; Haiyan Chen et al. 2016). También se ha asociado a la activación de NLRP3 en células endoteliales con la ruptura de la BHE y microhemorragias cerebrales (Andjelkovic et al. 2023; H. Wang et al. 2015). Sin embargo, estos mecanismos no han sido explorados respecto a potencial rol en la disfunción vascular durante la patogénesis de la EA, y la bibliografía sobre la activación de mecanismos de estrés de RE en microvasculatura cerebral es muy escasa. Fonseca y colaboradores demostraron que un insulto agudo de altas concentraciones de A β 1-40 causa apoptosis mediante la activación de mecanismos de estrés de RE en células RBE4, línea endotelial obtenida de cerebro de ratón (Fonseca et al. 2013). Sin embargo, en una patología progresiva como la EA, resulta muy relevante estudiar la disfunción vascular previa a la muerte endotelial y los mecanismos que pueden subyacer a dichas alteraciones, donde lo que predomina son los cambios fenotípicos como la pérdida de integridad de la BHE y cambios en la expresión de las células endoteliales.

Galectinas

Las proteínas, pueden ser modificadas durante y luego de su traducción. La glicosilación, que consiste en la adición de glicanos en determinados residuos, es la modificación post-traduccional más común, presente en más del 50% de las proteínas (Haukedal y Freude 2021). La unión de carbohidratos tanto a proteínas como lípidos depende de la acción de enzimas modificadoras de glicosilación, como las glicosil-transferasas y las glicosilhidrolasas, que se encuentran asociadas al retículo endoplasmático (RE) y al aparato de Golgi (Mariño et al. 2023). En humanos, se han descrito 10 monosacáridos principales presentes en estos glicoconjungados: glucosa, galactosa, N-acetilglucosamina, N-acetilgalactosamina, fucosa, xilosa, ácido siálico, ácido glucurónico, manosa y ácido idurónico. Los glicoconjungados son dinámicos y pueden variar en respuesta a diversos estímulos intracelulares y del entorno, como el estrés metabólico, disponibilidad de glucosa y oxígeno, citoquinas, entre otros (Pinho et al. 2023). Las diversas estructuras posibles de los glicanos y glicoconjungados dan lugar a una amplia variedad de funciones. Los glicanos cumplen roles importantes en las interacciones con otras células y moléculas, metabolismo energético y su

estructura (Haukedal y Freude 2021). La glicobiología estudia el complejo repertorio de las estructuras glicosídicas presentes en todas las células y tejidos, las cuales tienen un enorme impacto en las funciones biológicas y el destino celular (Mariño et al. 2023).

En las células, la glicosilación de proteínas desempeña tres funciones esenciales. En primer lugar, algunos glicanos conforman estructuras con propiedades físicas singulares, por ejemplo, otorgándoles propiedades hidrofóbicas o hidrofílicas, que son relevantes en la fisiología de la proteína a la que se unen. En segundo lugar, los glicanos tienen la capacidad de regular la función o las características de la entidad a la que se adhieren, ya sea controlando la estabilidad de proteínas o la formación de dímeros en receptores. Por último, ciertos glicanos funcionan como ligandos para lectinas, que son receptores especializados con sitios de reconocimiento de carbohidratos (Smith y Bertozzi 2021). Especialmente, las proteínas de superficie presentan vías de iniciación de mecanismos de señalización dependientes del tipo de lectina y del sitio de unión de éstas, lo que le permite la comunicación de la célula con el microambiente en el que se encuentre.

Diversas condiciones patológicas se han asociado a glicosilación aberrante. Por ejemplo, en tumores las células inmunes y endoteliales presentan cambios en su glicoma, lo que tiene impacto sobre procesos de adhesión celular, transición epitelio-mesenquimal, angiogénesis, señalización inmune y metástasis (Mariño et al. 2023). Por lo tanto, las lectinas son las encargadas de traducir el complejo lenguaje de los glicoconjungados en eventos biológicos. Estas proteínas capaces de reconocer patrones de glicosilación específicos suelen dividirse en tres grandes familias: lectinas tipo C, siglecs y galectinas (Rabinovich y Toscano 2009).

Las galectinas son una familia de proteínas de unión a glicanos conservadas evolutivamente que reconocen múltiples unidades de N-acetilactosamina (LacNAc, Gal β 1,4GlcNAc) presentes en los N- y O-glicanos de los glicoconjungados de la superficie celular (Troncoso et al. 2023). Las galectinas regulan diversos procesos entre los que se encuentran la diferenciación, proliferación, migración y muerte celular (Toscano et al. 2018). Se ha observado que las galectinas pueden inducir la reprogramación del fenotipo celular, participando en una variedad de procesos fisiopatológicos relacionados con la respuesta inmune, la fibrosis y la respuesta tumoral (Pinho et al. 2023). Las galectinas han sido clasificadas en tres subfamilias según su estructura. Las galectinas prototípicas cuentan con un sitio idéntico de unión a carbohidratos y funcionan como monómeros o homodímeros, entre

las que se encuentran galectina-1 (Gal1), galectina-2, galectina-5, entre otras (Figura 12A). En segundo lugar, tipo quimera, que contienen solo un sitio de unión a carbohidratos y pueden oligomerizar a través del extremo N-terminal que no cumple función de lectina. De este grupo sólo se ha identificado galectina-3 hasta el momento (Figura 12B). Por último, la subfamilia de “repeticiones en tandem” se caracteriza por dos sitios de reconocimiento de carbohidratos, cada uno con una especificidad distinta, unidos por un péptido enlazante flexible, como son galectina-4 y galectina-8 (Figura 12C). Dependiendo de las distintas especificidades de unión a carbohidratos y del estado de oligomerización, estas proteínas pueden formar entramados interactuando con múltiples ligandos glicosilados en la superficie celular y/o con glicoproteínas de la matriz extracelular (Figura 12). De esta manera, pueden asociarse a diferentes respuestas biológicas y modular los eventos de señalización transmembrana mediante la segregación selectiva de receptores, la retención y la endocitosis (Mariño et al. 2023).

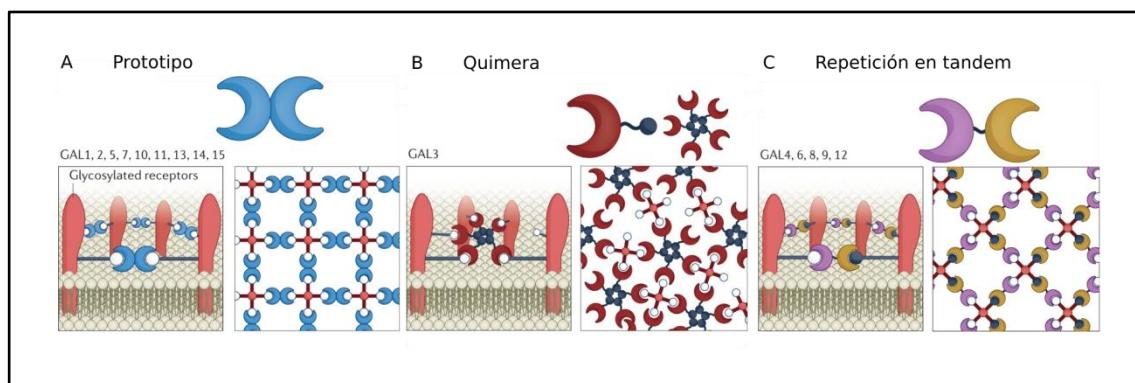


Figura 12. Clasificación de las galectinas en tres subfamilias según su estructura. A) Prototipo (Gal1, Gal2, Gal5, Gal7, Gal10, Gal11, Gal13, Gal14 y Gal15): funcionan como monómeros u homodímeros no covalentes con dominios de reconocimiento de carbohidratos idénticos. B) Quimera (Gal3): contienen un solo sitio de reconocimiento de carbohidratos y pueden oligomerizar por un dominio en su sitio N-terminal. C) Repetición en tandem (Gal4, Gal8, Gal9 y Gal12): presentan dos dominios de reconocimiento de carbohidratos, cada uno con una especificidad distinta unidos por un péptido enlazante flexible. Las galectinas pueden formar entrelazamientos característicos de cada subfamilia. Imagen modificada de Mariño et. al 2023 Nat. Rev. Drug. Disc.

Las galectinas han sido fuertemente asociadas con la regulación de la respuesta inmune. Mientras que algunos miembros de esta familia, como la galectina-3, se comportan predominantemente como amplificadores de la cascada inflamatoria, otros, como Gal1, desencadenan señales inmunosupresoras. Estas proteínas de unión a carbohidratos,

identificadas por compartir secuencias consenso de aminoácidos y afinidad por azúcares que contienen beta-galactósidos, participan en la homeostasis de la respuesta inflamatoria. En gran parte por su capacidad de modular la respuesta inmune, las galectinas desempeñan un papel significativo en múltiples aspectos distintivos de la progresión tumoral (Mariño et al. 2023). La regulación del sistema inmunológico puede, a su vez, afectar la resistencia a diversas modalidades de tratamiento contra el cáncer. Sin embargo, el rol de las galectinas depende del estado de oligomerización, el estado de oxidación que presente el microambiente, y la remodelación de glicanos en forma de glicoproteínas o glicolípidos en células blanco (Cutine et al. 2021; Rabinovich y Croci 2012; Rabinovich y Toscano 2009). Otra acción descrita para las galectinas es la facultad de participar en circuitos reguladores que amplifican, mantienen o reducen la fibrosis y la inflamación tisular al interactuar selectivamente con distintos tipos celulares y sus microambientes (Mariño et al. 2023; Toscano et al. 2018). Como consecuencia, se ha propuesto a las galectinas y los circuitos que modulan (ya sea mediante la amplificación o la inhibición de los mismos) como potenciales blancos terapéuticos en diversas condiciones patológicas.

En particular, Gal1 reconoce preferentemente residuos N-acetil lactosaminas (LacNAc) terminales tanto en N- como en O-glicanos (Figura 13). Modificaciones en las estructuras glicosídicas pueden alterar las interacciones galectina-glicano. En este sentido, Gal1 mantiene su afinidad de la secuencia LacNAc tras la incorporación de un ácido siálico terminal en α 2-3, pero la unión de ácido siálico ligado a α 2-6 a los glicoconjungados impide su unión (Rabinovich y Toscano 2009).

Esta galectina se expresa en distintos tipos celulares incluyendo células inmunes, endoteliales, epiteliales y de origen neuronal. Se ha descrito la unión de Gal1 a receptores en diversos tipos celulares que presentan glicosilaciones permisivas, algunos de los cuales se ejemplifican en la Figura 13 (Troncoso et al. 2023). Uno de éstos es CD146, una proteína presente en las uniones de adhesión celular, que se puede encontrar presente en células de músculo liso vascular, células endoteliales, y varios tipos de cáncer. *In vitro*, se observó mediante ensayos de coimmunoprecipitación, que Gal1 se une a este receptor en la línea de células endoteliales umbilicales HUVECs (Jouve et al. 2013). Además, Gal1 es capaz de reconocer azúcares presentes en proteínas integrinas, proteínas de membrana que se unen a la matriz extracelular y tienen la capacidad de señalizar de manera bidireccional hacia

dentro y fuera de la célula. El reconocimiento de Gal1 por ciertas integrinas se ha comprobado en células de músculo liso vascular y trofoblastos, entre otras (Bojić-Trbojević et al. 2018; Moiseeva et al. 2003). Otro receptor de adhesión que puede interactuar con Gal1 es CD44, involucrado en el anclaje de células a la matriz extracelular. Los receptores para el factor de crecimiento de vasculatura endotelial (VEGFR) 1 y 2 también ofrecen sitios de reconocimiento para Gal1, constituyendo otra vía por la cual Gal1 puede interactuar con células endoteliales (D'Haene et al. 2013; Croci et al. 2014). Como se observa en la Figura 13, los receptores de membrana asociados al lisosoma también pueden ser modificados con N- y O-glicanos y ser reconocidos por Gal1 (Clemente et al. 2017). Estas proteínas son encargadas de transportar moléculas exógenas de la membrana plasmática al lisosoma y protegen la membrana lisosomal de la degradación, por lo que se encuentran involucradas en múltiples procesos, que incluyen la autofagia, la fagocitosis y el transporte intracelular. Además, se ha demostrado que Gal1 puede unirse a los receptores CD45 y al glicotípico TF/CD176. CD45 se encuentra ampliamente expresado en células mieloides, como la microglía. De esta manera, Gal1 es potencialmente capaz de unirse a múltiples receptores y tipos celulares, induciendo una gran variedad de mecanismos biológicos. Respecto a la respuesta inducida por Gal1, hasta el momento, la bibliografía demuestra que Gal1 promueve la tolerancia inmunológica (Thijssen et al. 2015). Se ha descrito su rol en la resolución de la respuesta inmune tanto a través de la modulación de respuestas adaptativas como innatas (Cutine et al. 2021). También se ha detectado la expresión aumentada de esta galectina en múltiples tipos de cáncer. En el microambiente tumoral, Gal1 promueve la diferenciación de células dendríticas tolerogénicas, la proliferación de linfocitos T regulatorios CD4+ y CD8+ e induce la apoptosis de células T efectoras *helper 1* (TH1), TH17 y CD8+ (Cagnoni et al. 2021).

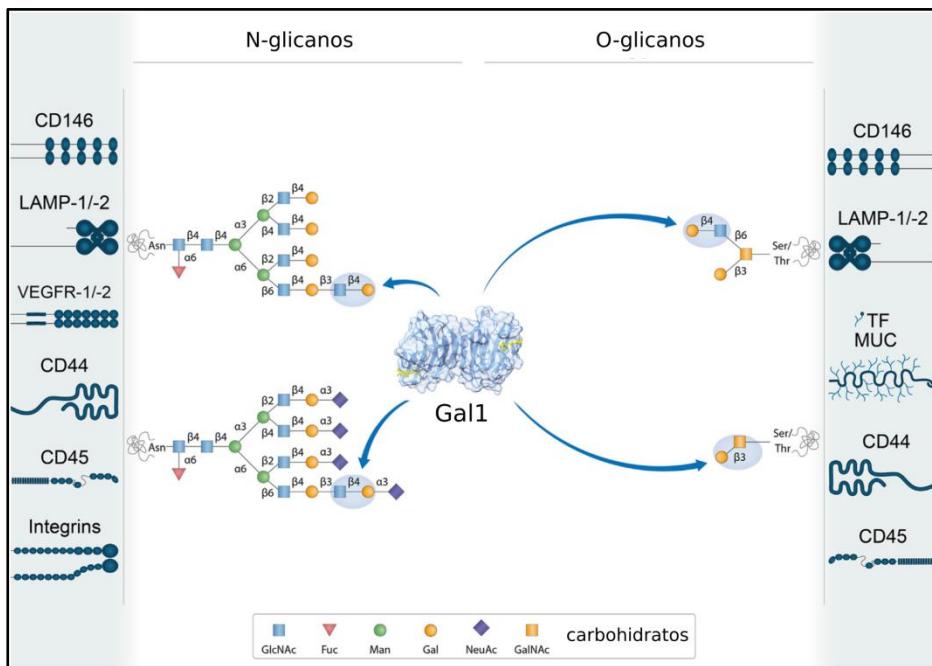


Figura 13. Diversos receptores con sitios de unión para Gal1. Gal1 reconoce preferentemente residuos LacNAc terminales tanto en N- como en O-glicanos. Puede unirse al ácido siálico terminal α 2-3 de la secuencia LacNAc, pero el ácido siálico α 2-6 impide la unión de esta lectina. LacNAc: N-[β -D-Galactopiranosil-(1 \rightarrow 4)-(2-deoxi-D-glucos-2-il)]acetamida (Gal β 1-4GlcNAc). Imagen modificada de Troncoso et. al 2023 JBC Reviews.

Además, Gal1 desencadena el reclutamiento y diferenciación de macrófagos inmunosupresores (tipo M2) al sitio tumoral y la síntesis de citoquinas antiinflamatorias como IL-10 e IL-27 (Mariño et al. 2023). Por ello, en el microambiente tumoral, la actividad inmunosupresora de esta lectina se asocia a un peor pronóstico (D. Liu, Zhu, y Li 2023). También se ha descrito un rol proangiogénico para Gal1 a partir de la interacción con los N-glicanos del receptor VEGF-R2, preservando su activación y promoviendo la resistencia tumoral en terapias anti-VEGF (Croci et al. 2014). En este sentido, se han desarrollado anticuerpos anti-Gal1 con el fin de disminuir la inmunotolerancia tumoral y la angiogénesis, disminuyendo la resistencia a terapias contra el cáncer (Bannoud et al. 2023; Pérez Sáez et al. 2021; Croci et al. 2012).

Al contrario, se ha propuesto que, en enfermedades de carácter inflamatorio, la naturaleza antiinflamatoria de Gal1 puede resultar beneficiosa. En el SNC, se comprobó la capacidad de Gal1 de modular la diferenciación y el fenotipo de los astrocitos y la microglia (Sasaki et al. 2004). Como se mencionó previamente, Gal1 es capaz de unirse a la microglía y detener el proceso proinflamatorio en un contexto de neurodegeneración. Starossom y colaboradores estudiaron los efectos de Gal1 en un modelo experimental de la enfermedad

neurodegenerativa esclerosis múltiple, determinando que los astrocitos modulan la activación microglial hacia un fenotipo M2 antiinflamatorio secretando Gal1 (Starosom et al. 2012). En un estudio *in vivo* en ratones, se ha demostrado que Gal1 colabora con la regeneración neuronal después de una lesión de la médula espinal mediante la modulación de células inmunes (Kurihara et al. 2010). Quintá y colaboradores luego demostraron que el tratamiento con Gal1 recombinante contribuyó a la regeneración axonal y la recuperación locomotora tras una lesión medular mediante el reconocimiento de carbohidratos en el complejo de receptores formado Neuropilina-1 y PlexinA4 en neuronas lesionadas (Quintá et al. 2014).

La evidencia también vincula a Gal1 positivamente con la neurogénesis del hipocampo, así como el aprendizaje y las funciones cognitivas (Sakaguchi et al. 2011). En un modelo de isquemia cerebral se determinó que Gal1 interviene en la recuperación de la zona lesionada y es capaz de disminuir la muerte neuronal mediante la modulación astrocítica hacia un fenotipo neuroprotector que induce la neurogénesis (Qu et al. 2010; Ishibashi et al. 2007).

Por otro lado, también ha comenzado a ser estudiada la acción protectora de Gal1, tanto endógena como recombinante, sobre la vasculatura. A nivel sistémico se ha observado que en un modelo de aterosclerosis, Gal1 fue capaz de disminuir el tamaño de la placa aterosclerótica y a su vez, preservó las células de músculo liso vascular (Roldán-Montero et al. 2022). En el SNC, Cheng y colaboradores indujeron isquemia fotoquímica en el cerebro de ratones y detectaron un aumento de Gal1 que correlacionó con un aumento de la expresión de VEGF y MMP9, los cuales demostraron *in vitro*, ser secretados por células endoteliales, requeridos para el remodelamiento vascular post-isquémico. A su vez, demostraron que la administración de Gal1 mejoró la recuperación del flujo sanguíneo y la remodelación vascular. Dicho trabajo también reportó que Gal1 es capaz de potenciar la proliferación celular, la capacidad de migración y de formación tubular de células endoteliales (Roldán-Montero et al. 2022).

Como consecuencia del potencial rol neuroprotector de Gal1, esta Tesis se propuso estudiar sus efectos en la EA. Además, por la preponderancia de las alteraciones vasculares durante la patología, y la implicancia de Gal1 en la modulación vascular, el enfoque se dirigió a la microvasculatura cerebral.

Objetivos

Objetivo General

Esta Tesis se propone estudiar las alteraciones estructurales y funcionales en la microvasculatura cerebral en la Enfermedad de Alzheimer (EA) y evaluar la capacidad de Galectina-1 (Gal1) de modular la EA experimental y su potencial terapéutico. Se estudiarán parámetros estructurales e indicadores de la funcionalidad de la microvasculatura, como también otros componentes que actúan en conjunto para un correcto funcionamiento cerebral. Especialmente, se analizará como posible blanco de la acción de Gal1 a las células endoteliales de la vasculatura cerebral.

La hipótesis general de esta Tesis propone que Gal1 modula la vasculatura cerebral y su capacidad de comunicación con los astrocitos que, junto con las propiedades neuroregenerativas y la promoción de una glia neuroprotectora, esta lectina disminuiría el tono inflamatorio cerebral y recuperaría alteraciones cognitivas en la EA. La microvasculatura es un blanco temprano de la enfermedad y se hipotetiza que Gal1 ejerce acciones concertadas sobre el endotelio cerebral, reduciendo su activación y recobrando su fundamental capacidad de barrera, posiblemente a través de la regulación del estrés de retículo endoplásmico, entre otros mecanismos.

Objetivos específicos

1- Abordar el efecto del tratamiento con Gal1 recombinante sobre un modelo murino de la EA experimental en etapa sintomática, en particular sobre la memoria espacial y los depósitos amiloides de localización parenquimática y perivasicular.

Hipótesis: El tratamiento con Gal1 proporciona una mejora cognitiva que está acompañada de cambios en los eventos histopatológicos en la UNV que tienen lugar en el desarrollo de la EA.

Se propone explorar la capacidad neuroprotectora del tratamiento con Gal1 recombinante en la EA experimental, a través de la modulación de los componentes de la UNV. Este objetivo se abordó en las partes 1 y 2 de la sección de Resultados.

2- Evaluar el efecto del tratamiento con Gal1 recombinante sobre la EA experimental, con énfasis en las propiedades y características de la microvasculatura del hipocampo incluyendo la interacción astrocito-endotelio.

Hipótesis: Las alteraciones vasculares contribuirían al desarrollo de la EA, impidiendo la correcta comunicación de los componentes de la UNV y Gal1 protegería la vasculatura cerebral, la integridad de la BHE y lograría recuperar la comunicación glial-vascular, en el contexto de la EA experimental.

Se propone evaluar las alteraciones morfológicas de la vasculatura cerebral y su microentorno en la EA experimental en etapa sintomática, y el impacto del tratamiento con Gal1. Los resultados correspondientes a la evaluación de este objetivo se muestran en las partes 3 y 4 de la sección de Resultados.

3- Evaluar la potencialidad protectora de Gal 1 sobre propiedades de las células endoteliales *in vitro* expuestas a péptidos amiloideos, en términos de resistencia transendotelial, presencia de proteínas de unión estrecha e involucramiento de las vías del estrés de retículo endoplásmico.

Hipótesis I: Durante la EA se experimentaría pérdida de integridad de la BHE y el tratamiento con Gal1 induciría su recuperación.

Hipótesis II: La patología amiloide induce pérdida de la capacidad de proteostasis celular, causando activación endotelial y promoviendo las vías de estrés de retículo endoplasmático maladaptativo, y el tratamiento con Gal1 restauraría estas vías.

Se propone estudiar el impacto del tratamiento con Gal1 sobre células endoteliales de la microvasculatura cerebral en un modelo *in vitro* de la EA. Además, se buscará explorar la contribución de las vías de estrés reticular e inflamación a la disfunción endotelial como posibles blancos asociados a los efectos protectores de Gal1 en un modelo *in vitro* de la EA.

Se expone lo explorado en relación con este objetivo en las partes 5 y 6 de la sección de Resultados.

4- Estudiar el impacto del tratamiento con Gal 1 recombinante en ratones del modelo experimental de EA en edad sintomática sobre el transcriptoma del hipocampo, en particular, estudiando procesos biológicos y celulares alterados por la patología.

Hipótesis: Gal1 ejercería efectos reguladores sobre la expresión génica en el hipocampo, influyendo en vías clave asociadas con la neuroinflamación, función vascular, el estrés oxidativo, la plasticidad sináptica y otros procesos relevantes para la fisiopatología de la EA.

Se propone explorar los cambios transcripcionales a partir de muestra de ARN total de hipocampo de ratones en el contexto de la EA experimental en etapa sintomática y los efectos del tratamiento con Gal1 recombinante. Los resultados obtenidos se proporcionan en la parte 7 de la sección de Resultados.

Resultados

Parte 1.

Memoria espacial y depósitos amiloideos del hipocampo de ratones PDAPPJ20. Efecto del tratamiento con Galectina-1.

Evaluación de la memoria espacial de los ratones

Para evaluar el impacto de Gal1 se conformaron 4 grupos experimentales que incluyeron ratones transgénicos (Tg) o no transgénicos (NTg) de 12 meses tratados con Gal1 recombinante (100 µg/dosis) o con vehículo durante tres semanas NTg-Gal1, NTg-Veh, Tg-Gal1 y Tg-Veh. El protocolo del tratamiento se indica en el esquema de la Figura 39 de Metodología Experimental, donde se detalla que los ratones recibieron tres inyecciones intraperitoneales por semana, llegando a un total de 9 inyecciones.

En primer lugar, se evaluó la memoria dependiente del hipocampo a corto y mediano plazo con el fin de estudiar la esfera cognitiva de estos ratones. Primero, se realizó una prueba específica que evalúa la capacidad de reconocimiento de un objeto en una nueva locación en comparación a un objeto no relocalizado (prueba de locación novedosa de un objeto, o NOL por sus siglas en inglés *Novel Object Location recognition test*). Esta evaluación consiste en dos fases de exploración de 10 minutos de duración separadas por un intervalo, como se muestra en el esquema de la Figura 14B. En la primera fase, de entrenamiento o T1, los ratones son colocados en una caja, con la que previamente fueron familiarizados, con dos objetos idénticos que se ubican en una determinada configuración espacial por 10 minutos. Durante el intervalo, de 60 min de duración, los ratones vuelven a sus jaulas. En la siguiente fase, de evaluación o T2, se cambia la posición de uno de los objetos y se analiza la exploración de los dos objetos, uno en una posición conocida y otro en una novedosa. Esta prueba se basa en la amplia bibliografía que indica que los roedores exploran en mayor proporción el estímulo desconocido o que ofrece novedad, y esta capacidad es dependiente de la integridad del hipocampo (Kharkongor, Nambi, y Radhakrishnan 2024; Tan et al. 2024; Y. Chen et al. 2024).

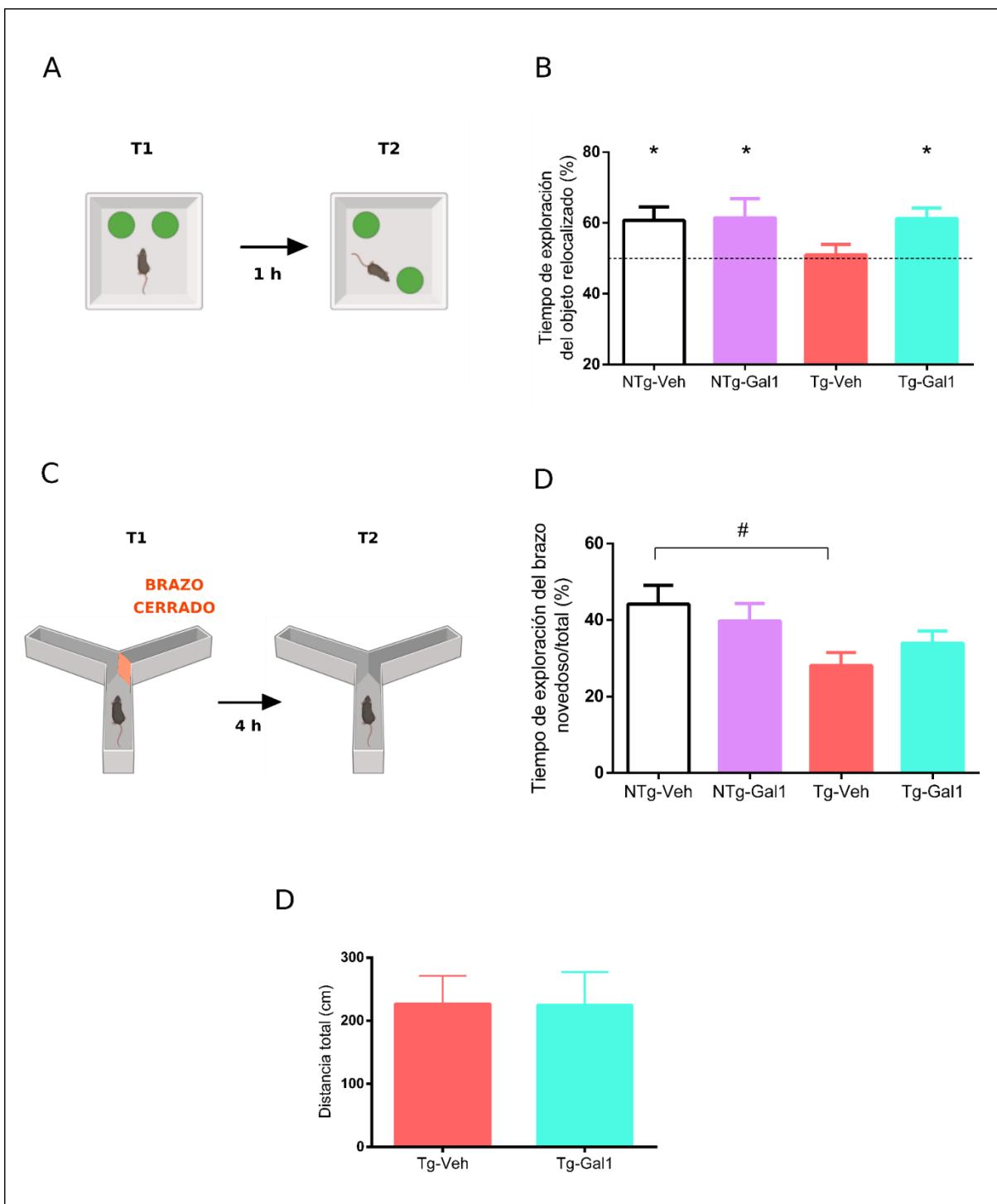


Figura 14. El tratamiento con Gal1 mejora la memoria espacial en ratones PDAPPJ20 de 12 meses. (A) El esquema muestra las etapas de la prueba de locación novedosa de un objeto (NOL) para evaluar la memoria espacial. (B) El desempeño se indica según el tiempo explorando el objeto relocalizado respecto al tiempo de exploración total $p^{**}p<0.01$ (prueba t de una cola comparando vs exploración al azar de ambos objetos, 50%). (C) Esquema de la prueba de laberinto en Y (laberinto en Y). (D) El desempeño se indica según el tiempo

explorando el brazo novedoso respecto al tiempo de exploración total $p<0.05$ por contraste ortogonal. (E) Distancia total recorrida (cm) en la prueba de campo abierto. Ningún animal participó de ambas pruebas cognitivas (Por grupo: NOL: $n>4$; Laberinto en Y: $n>5$; Campo abierto: $n=7$).

Para evaluar el desempeño cognitivo de los ratones, se cuantificó el tiempo de exploración del objeto relocalizado y se lo relativizó al tiempo de exploración total de la segunda fase. Como era de esperar, los ratones NTg-Veh exploran mayormente el objeto relocalizado, como se indica en la cuantificación en la Figura 14B. Los ratones Tg-Veh, en cambio, no mostraron dicha preferencia, lo que significa un peor desempeño en esta prueba. Los animales Tg-Gal1 recuperaron la capacidad de realizar esta tarea correctamente, lo que se asocia a una mejora de la memoria espacial a corto plazo que depende especialmente del hipocampo.

En segundo lugar, en otro grupo de animales, se realizó la prueba comportamental del laberinto en Y, que presenta una configuración espacial de tres brazos. La prueba comportamental consistió en una primera exposición al laberinto en Y (T1) donde el animal exploró durante 10 minutos. En esta fase, el ratón tiene acceso a dos brazos del laberinto, ya que uno se encuentra cerrado. Luego de un intervalo de 4 h donde permanece en su jaula, el animal vuelve al laberinto (T2) pero esta vez los tres brazos se encuentran disponibles. Se midió el tiempo de exploración de cada brazo y, para su cuantificación, se calculó el tiempo que el animal explora el brazo novedoso respecto a la suma del tiempo de exploración total entre los tres brazos. Se evidenció mediante un contraste ortogonal que los animales Tg-Veh exploraron el brazo novedoso un tiempo menor que el grupo NTg-Veh, indicando menor reconocimiento del brazo familiar. Sin embargo, esta disminución no se observa en el grupo Tg-Gal1, lo que evidencia una recuperación del desempeño esperado para esta prueba asociada a la memoria espacial a mediano plazo. Por lo tanto, ambas pruebas de memoria espacial contribuyen a la hipótesis que el tratamiento con Gal1 es beneficioso para la función cognitiva de los ratones modelo de la EA. Complementariamente, se evaluó la actividad locomotora de los ratones transgénicos. Nuestro grupo ha publicado anteriormente que los ratones PDAPPJ20 muestran hiperactividad y comportamiento de tipo ansioso en las pruebas de campo abierto (Beauquis et al. 2014). El tratamiento con Gal1 no modificó la distancia recorrida de los ratones transgénicos, lo que permite inferir que los cambios observados en el NOL y laberinto en Y son independientes de la capacidad locomotora de los ratones (Figura 14E).

Depósitos amiloides en el hipocampo

Empleando los cortes histológicos del cerebro de los ratones, se procedió a la evaluación de depósitos de A β en el parénquima del hipocampo mediante la tinción de rojo Congo. El rojo Congo es un colorante aniónico que tiene afinidad por los agregados proteicos insolubles, lo que permite la visualización de depósitos amiloides en el parénquima cerebral bajo el microscopio. Luego, las placas amiloides pueden ser cuantificadas por su tamaño y número en las imágenes tomadas. Los detalles metodológicos se describen en la sección de Metodología Experimental. La Figura 15 muestra imágenes representativas de la tinción sobre cortes coronales de cerebro de los grupos Tg-Veh y Tg-Gal1. Se observó que la presencia de placas rojo Congo+ en la región del hipocampo resultó evidentemente menor en los animales Tg-Gal1. En primer lugar, se realizó una evaluación cuantitativa del área total de los depósitos amiloides respecto al área hipocampal. Dicho análisis reveló que el tratamiento con Gal1 se asoció a una disminución del 46% de los depósitos parenquimáticos rojo Congo+ en comparación a los ratones Tg-Veh (Figura 15B). También se exploró la densidad de placas, según el número de depósitos por área del hipocampo. La cuantificación mostró que este parámetro también se encontraba disminuido, lo que demuestra que la caída de la carga amiloide podría estar reflejando una menor cantidad de depósitos. Para profundizar dicha observación, se emplearon los datos del número y área de las placas y se realizó el gráfico de frecuencias que se muestra en la Figura 15. Allí se observa el número de depósitos según su área para los animales Tg-Veh y Tg-Gal1. Este análisis permitió identificar que las diferencias en la carga amiloide observadas en la Figura 15 se debieron a una disminución en las placas de menor tamaño en los animales tratados con Gal1, específicamente aquellas con un área de hasta 50 μm^2 . También se observó una disminución no significativa del número de placas entre 50-100 μm^2 en los animales Tg-Gal1, respecto a los que recibieron vehículo ($p=0.07$). Esto permite inferir un aumento de los procesos de degradación de las placas pequeñas o una menor generación de nuevos depósitos en el grupo Tg-Gal1, siendo los mecanismos más relevantes para la eliminación de A β la fagocitosis mediada por la microglía o el *clearance* a través de la vasculatura.

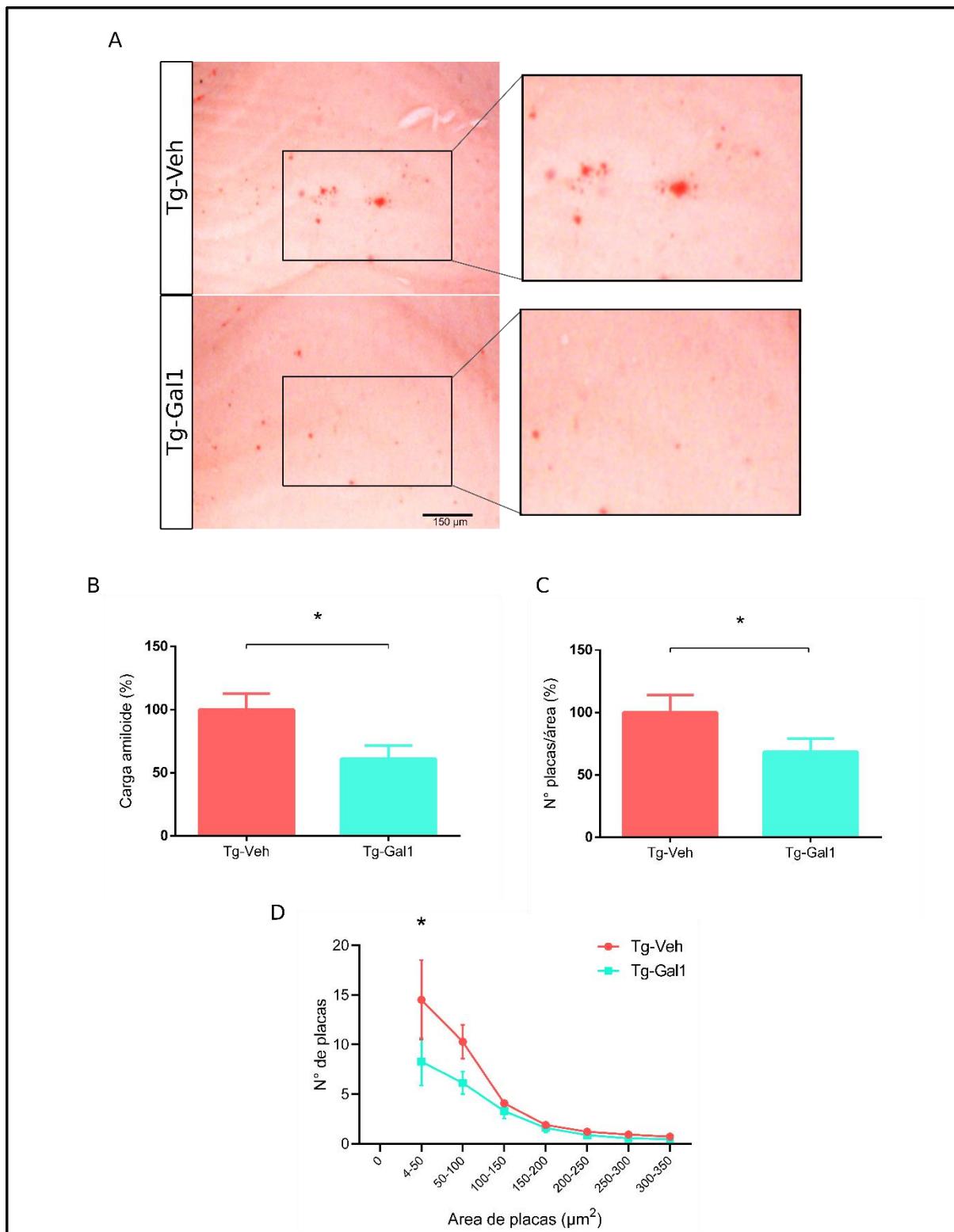


Figura 15. El tratamiento con Gal1 disminuyó las placas en el parénquima del hipocampo de ratones PDAPPJ20 de 12 meses. (A) Imágenes representativas de hipocampo en cortes coronales de 60 μ m con tinción de rojo Congo para visualizar las placas amiloideas. (B) La carga amiloide se calculó según porcentaje del área del hipocampo cubierta por depósitos (C) La densidad de la ocurrencia de placas se cuantificó como el número de placas por área. (D) Gráfico de frecuencias evidenciando el número de placas según tamaño. Tg-Veh n=7, Tg-Gal1 n=10. *p<0.05 (prueba de t, de dos y una cola en B y C, respectivamente). Barra de escala = 150 μ m.

Depósitos vasculares de A β en el hilio del hipocampo

Los depósitos vasculares de amiloide se asocian a daño tisular, como la alteración de la BHE y la limitación del intercambio de fluidos, oxígeno y metabolitos de deshecho (Gireud-Goss et al. 2021; Park et al. 2014). A su vez, alteran la comunicación entre los componentes de la UNV y se han relacionado directamente con la disfunción del acoplamiento neurovascular, pérdida de células de músculo liso y pericitos.

La bibliografía actual da cuenta de que el hilio es una región tempranamente susceptible en la patología, e íntimamente relacionada con los procesos cognitivos de los ratones (Pomilio et al. 2016). Por lo tanto, se procedió a explorar la angiopatía amiloide cerebral en el hilio del hipocampo. Se empleó la técnica de inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-A β 4G8 acoplada a una tinción de lectina de tomate-FITC (Lectina-FITC) para visualizar la microvasculatura y luego poder analizar los depósitos amiloideos sobre los vasos. Los detalles del análisis y procedimiento de cada técnica se describen en la sección de Metodología Experimental.

La Figura 16 muestra imágenes representativas de dichas marcaciones para animales Tg-Veh y Tg-Gal1, donde se evidencia una menor señal de A β en la microvasculatura de los animales Tg que recibieron Gal1 en comparación con los que recibieron vehículo. Efectivamente, el análisis mostró que la colocalización de Lectina-FITC con A β disminuyó significativamente en el grupo Tg-Gal1 respecto a los Tg-Veh, como se observa en la Figura 16C. De la misma manera, el número de segmentos vasculares con presencia de A β también fue menor en el grupo Tg-Gal1 (Figura 16D). Teniendo en cuenta que se ha demostrado previamente que Gal1 ejerce propiedades pro-angiogénicas (Croci et al. 2012; Croci et al. 2014), se evaluó la densidad vascular en esta región y se observó que, al menos tras este tratamiento de 3 semanas de duración, este parámetro no se vio afectado (Figura 16B). Por lo tanto, la disminución de A β vascular no se debió a un cambio en la red vascular sino, posiblemente, a una remoción del péptido.

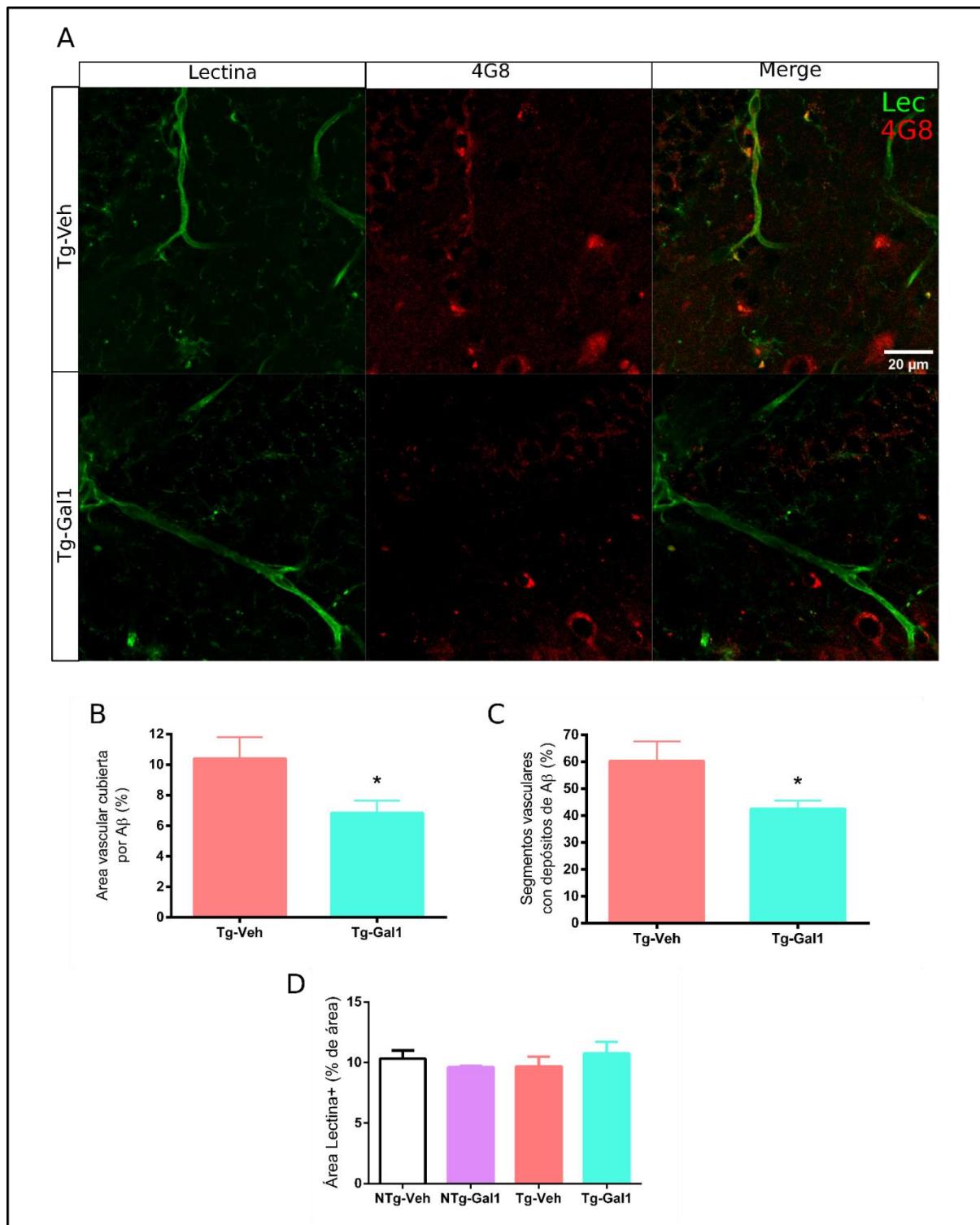


Figura 16. Gal1 disminuyó los depósitos vasculares de A β en el hilio del giro dentado de ratones PDAPPJ20 de 12 meses (A) Imágenes representativas de los cortes coronales de 60 μ m procesados para inmunofluorescencia contra 4G8 (rojo) acoplada a tinción con Lectina-FITC (Lec, verde). (B) Cuantificación de la colocalización de ambos marcadores expresada como el porcentaje de área Lectina-FITC+ que se encuentra colocalizando con la señal de 4G8 respecto al área total Lectina-FITC+. (C) Número de segmentos vasculares conteniendo A β . (D) Cuantificación de la densidad vascular. B y C, *p<0,05 (prueba de t, una cola). D, ANOVA de dos vías. Se emplearon 4-5 cortes de hipocampo por animal, n=4 animales por grupo. Barra de escala = 20 μ m.

Parte 2.

Alteraciones vasculares en hipocampo de ratones PDAPPJ20 y efecto del tratamiento con Galectina-1.

Permeabilidad de la barrera hematoencefálica en el hilio del hipocampo

El aumento de la permeabilidad de la BHE en el hipocampo se encuentra asociado al envejecimiento y a la disfunción cognitiva (Montagne et al. 2015). La disrupción de la BHE lleva a respuestas inflamatorias y neurodegenerativas, por lo que la permeabilidad vascular es un parámetro determinante en la progresión de la EA (Sweeney, Sagare, y Zlokovic 2018). En consecuencia, se evaluó la integridad de la microvasculatura del hilio del giro dentado de los ratones PDAPPJ20 mediante un ensayo de permeabilidad a moléculas presentes en el torrente sanguíneo. Como se muestra en el esquema de la Figura 17A, este análisis se realizó mediante una inyección en la vena de la cola de 100 μ l de Evans Blue (EB) 2% en solución salina, con el objetivo de evaluar posibles alteraciones en ratones transgénicos y el potencial efecto protector de Gal1 en la microvasculatura. Este colorante se conjuga en sangre con la proteína albúmina y atraviesa la BHE sólo en condiciones de disrupción o daño. El procedimiento se detalla en la sección correspondiente de Metodología Experimental.

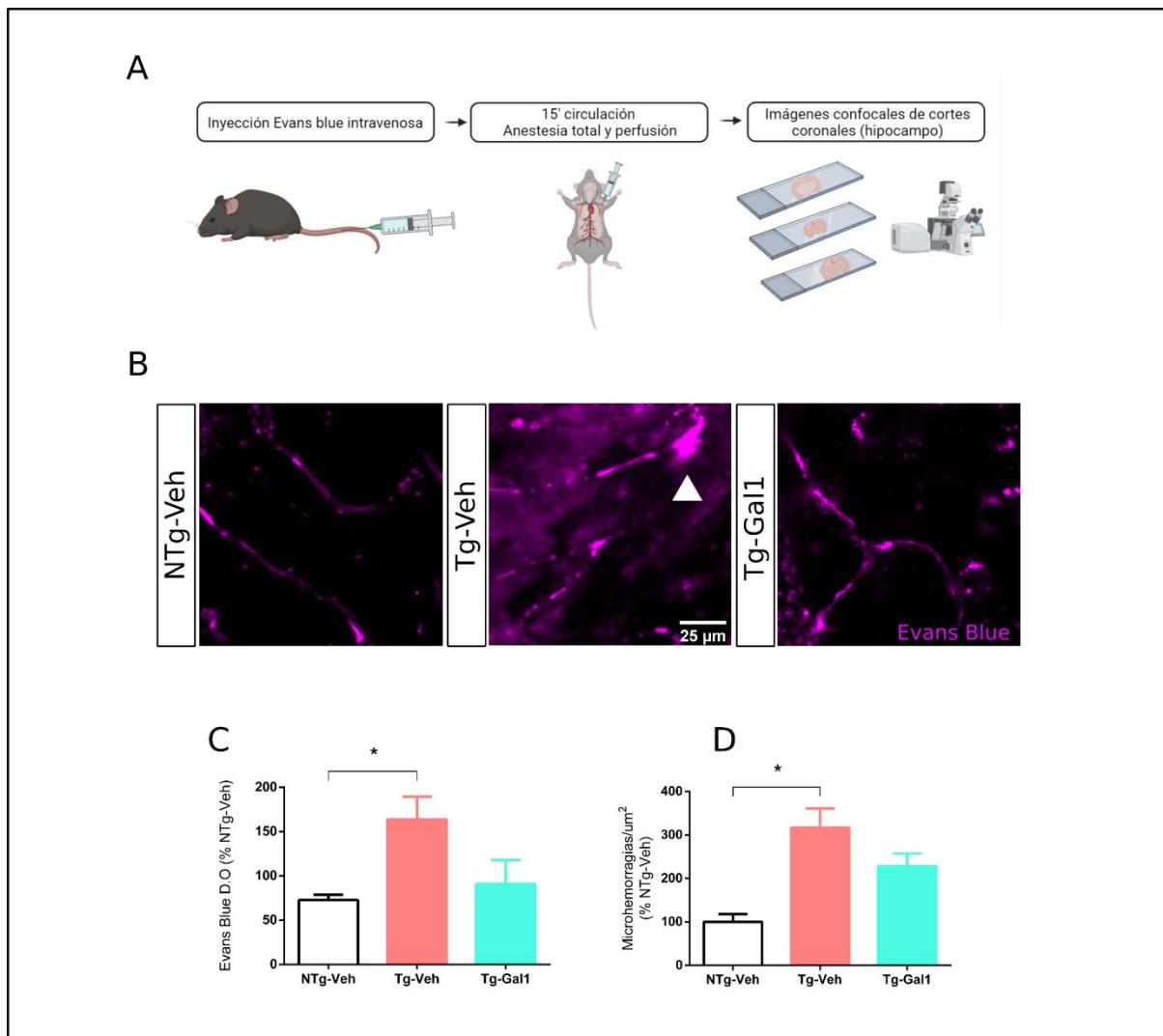


Figura 17. Gal1 se asoció con una disminución de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica en el hilio de ratones PDAPPJ20 de 12 meses. (A) Esquema del procedimiento experimental para la prueba de EB. (B) Imágenes representativas de los tres grupos experimentales de la sección del hilio evidenciando en magenta la señal de EB. La flecha blanca indica la presencia de una microhemorragia. (C) Densidad óptica de EB respecto al área cuantificada, expresada como porcentaje respecto del grupo NTg-Veh. (D) Número de microhemorragias por μm^2 , expresado como porcentaje respecto del grupo NTg-Veh. Los análisis corresponden al hilio del hipocampo. C y D *p<0.05 (ANOVA seguido de contrastes de Tukey). Se emplearon 4-5 cortes de hipocampo por animal, n=4 animales por grupo. Barra de escala = 25 μm .

Los ratones Tg-Veh evidenciaron mayor presencia de EB en el hilio del hipocampo comparados con los NTg-Veh, donde la marca de EB resultó muy escasa, revelando un aumento de la permeabilidad de la BHE (Figura 17A). La cuantificación de este parámetro se realizó mediante la evaluación de la densidad óptica de EB respecto al área y se muestra en

la Figura 17C, en porcentaje respecto al grupo NTg-Veh. La marca positiva para EB resultó mayor en el grupo Tg-Veh que en el grupo NTg-Veh, mientras que el grupo Tg-Gal mostró niveles semejantes a los ratones NTg-Veh, lo que evidencia una recuperación de la integridad de la microvasculatura en esta región.

Diversos estudios clínicos en pacientes han determinado que pacientes con EA presentan focos microhemorrágicos con una prevalencia de entre 26-48% (Vázquez-Justes et al. 2022; Ungvari et al. 2017; Yates et al. 2014; Benedictus et al. 2013). A su vez, modelos animales de la EA también recapitulan este indicador de daño vascular, especialmente en asociación a la angiopatía cerebral amiloide. También se ha sugerido que el número de eventos microhemorrágicos podría funcionar como un marcador del declive cognitivo y el estado de la patología en la EA (Ungvari et al. 2017)

En concordancia con esto, las imágenes obtenidas en este análisis mostraron claramente la presencia de microhemorragias vasculares, como la que se ilustra en la imagen correspondiente a un ratón del grupo Tg-Veh de la Figura 17B mediante una flecha blanca. Mientras que las microhemorragias detectadas en los ratones NTg-Veh fueron escasas, la cuantificación de este parámetro según el número de microhemorragias por área mostró que los ratones Tg-Veh presentaron un aumento del 300% de estos eventos. Por su parte, los animales Tg-Gal1 evidenciaron una disminución superior al 30% respecto a los Tg-Veh. Además, no se encontraron diferencias en la presencia de microhemorragias/ μm^2 entre los grupos NTg-Veh y Tg-Gal1. Estos resultados evidencian una recuperación de la integridad de la BHE, tanto en una disminución de la permeabilidad como en un número menor de microhemorragias luego del tratamiento con Gal1.

Presencia de Gal1 endógena en la vasculatura hipocampal

Previamente se ha visto que los astrocitos, en diversos modelos murinos de injuria o daño al SNC, responden aumentando la expresión de Gal1 (Gaudet et al. 2015; Sirko et al. 2015; Starossom et al. 2012; Qu et al. 2010). En estos contextos, esta proteína actúa endógenamente como un inductor de factores que estimulan la reparación y la sobrevida neuronal, como BDNF, o inducen la modificación del fenotipo de células microgliales o

macrófagos hacia M2, promoviendo la resolución de la respuesta inmune y la disminución del tono inflamatorio exacerbado (Qu et al. 2010).

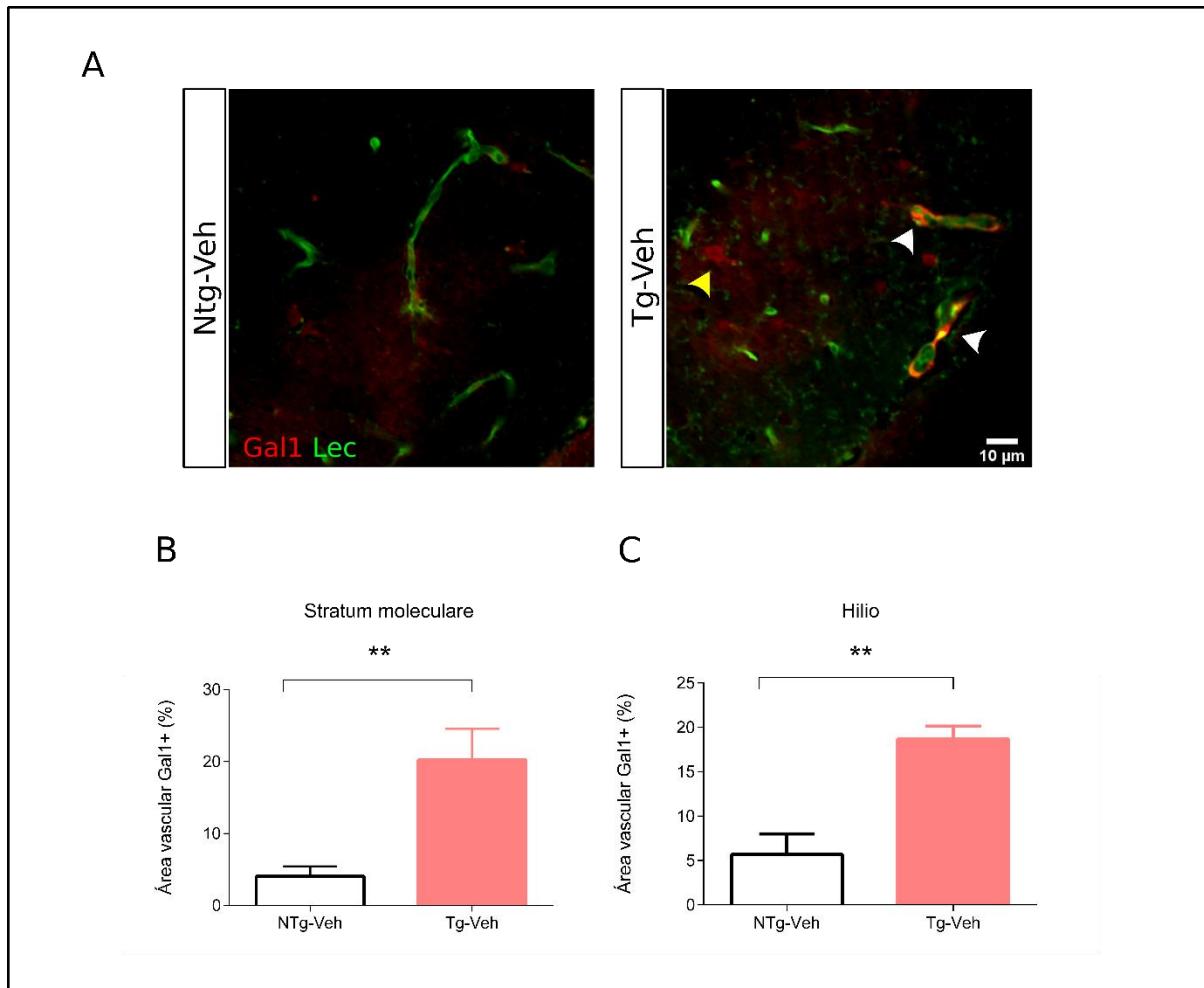


Figura 18. La vasculatura del hipocampo resultó positiva para la presencia de Gal1 en ratones PDAPPJ20 transgénicos de 12 meses (A) Imágenes representativas en cortes coronales de 60 μ m conteniendo hipocampo procesados para inmunofluorescencia contra galectina-1 (Gal1, rojo) acoplada a tinción con Lectina-FITC (Lec, verde). (B) Cuantificación del porcentaje de área Lectina-FITC+ que se encuentra colocalizando con Gal1 respecto al área total Lectina-FITC+ en el stratum moleculare (izquierda) y el hilio (derecha) del giro dentado. La flecha blanca indica vasculatura positiva para Gal1; la flecha amarilla señala posible astrocito Gal1+. NTg-Veh n=5, Tg-Veh, n=4 **p<0.01 (prueba de t de dos colas). Barra de escala = 10 μ m.

No existe evidencia previa en cuanto a la microvasculatura cerebral y la presencia de Gal1 en la EA. Para investigar este parámetro, se realizó una inmunofluorescencia contra Gal1 acoplada a Lectina-FITC en el hipocampo de ratones NTg-Veh y Tg-Veh (Figura 18). Mientras que la marca Gal1+ fue muy tenue en ratones NTg-Veh, los ratones Tg-Veh mostraron una

fuerte presencia de esta proteína en dos zonas distintas del hipocampo, el hilio y el *stratum moleculare* del giro dentado, con alta presencia sobre la vasculatura (flechas blancas). En particular, se determinó que la colocalización de la marca de Gal1 con la vasculatura en los ratones Tg-Veh fue significativamente mayor en comparación con los NTg-Veh (Figura 18B). Puede observarse también en la imagen representativa mostrada de la Figura 18A, que la señal Gal1+ coincide con morfología astrocítica, con sus procesos altamente arborizados (flecha amarilla). Este análisis no permite distinguir la fuente de Gal1. Sin embargo, este resultado permitió observar un evidente aumento de Gal1 en el hipocampo de ratones Tg-Veh respecto a animales NTg-Veh, especialmente de localización vascular.

Parte 3.

Alteraciones gliales y en la comunicación astrogli-endotelio en hipocampo de ratones PDAPPJ20. Efecto del tratamiento con Galectina-1.

Reactividad astroglial en el hilio del giro dentado del hipocampo

Como se mencionó, la EA se acompaña de un cuadro inflamatorio, marcado por el incremento de señales proinflamatorias que impactan sobre la glía, induciendo su reactividad. Para explorar la reactividad astroglial, se evaluó la morfología astrocítica mediante imágenes de inmunofluorescencia contra la proteína GFAP. La misma se obtuvo a partir de la cuantificación del tamaño de los astrocitos en el hilio del giro dentado, como medida del área inmunorreactiva para esta proteína. La Figura 18 muestra imágenes representativas del hilio de ratones NTg-Veh, Tg-Veh y Tg-Gal1, donde se observa de manera cualitativa una franca hipertrofia astroglial en la imagen correspondiente al Tg-Veh con soma y procesos aumentados. El área GFAP+ por astrocito en el hipocampo de los ratones Tg-Veh mostró una fuerte tendencia al aumento ($p=0.053$, ANOVA) comparado con los ratones NTg-Veh. Esto evidencia una transición morfológica hacia una reactividad astroglial en los animales Tg-Veh.

Los ratones Tg-Gal1, por su parte, mostraron una disminución significativa respecto a los ratones Tg-Veh, con una clara recuperación morfológica de los astrocitos, como se observa en la Figura 19. Si bien el *n* utilizado para este análisis (5 animales para los grupos Tg y NTg tratados con Veh y 4 para Tg-Gal1) es adecuado para evidenciar cambios robustos, eventualmente se podrían incorporar otros animales a esta cuantificación con el objetivo de determinar si la diferencia entre NTg-Veh y Tg-Veh puede ser consolidada y significativa.

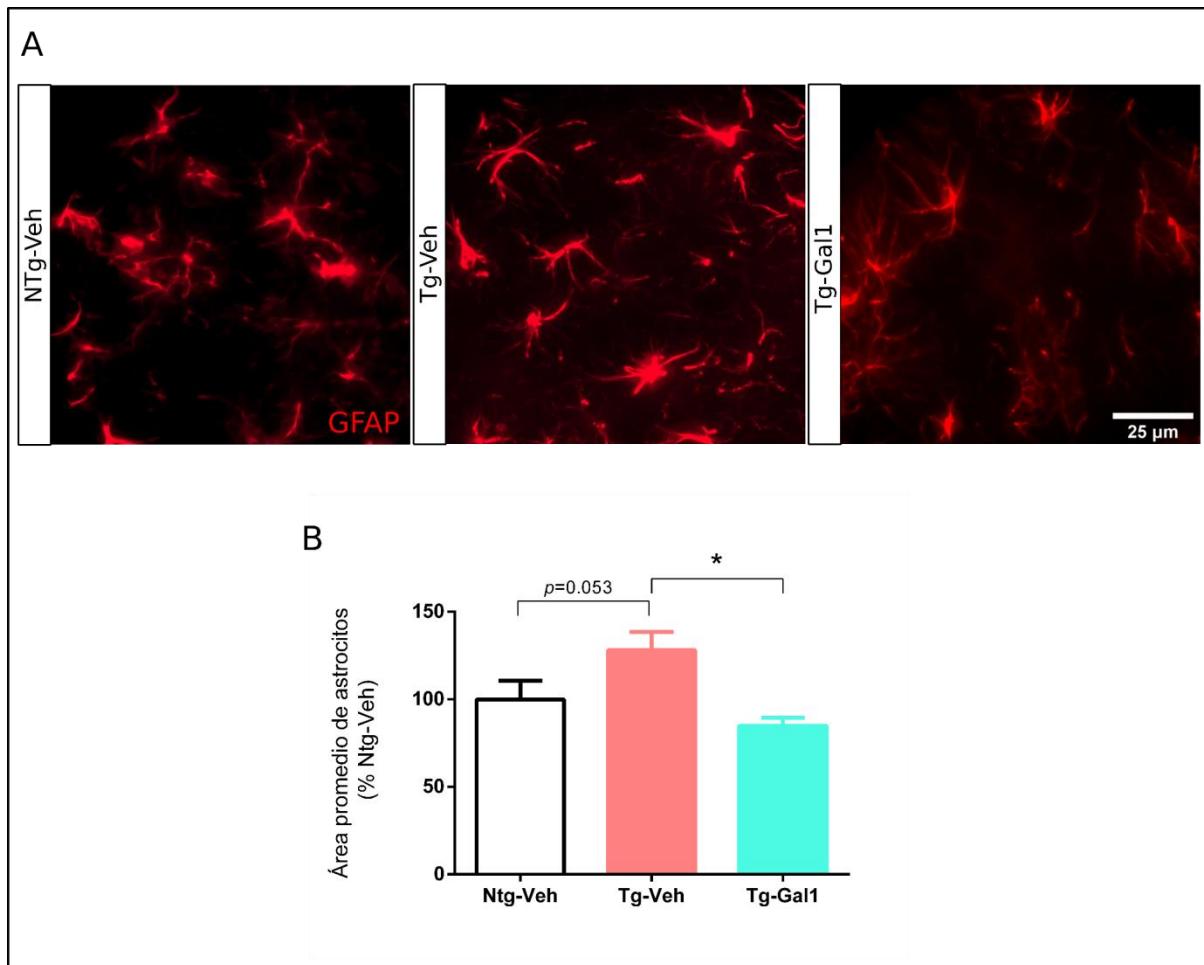


Figura 19. Gal1 disminuyó la astrogliosis en el hilio del giro dentado de ratones PDAPPJ20 de 12 meses. (A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia en cortes coronales de 60 μ m contra GFAP de ratones NTg-Veh, Tg-Veh y Tg-Gal1. (B) Análisis del área astrocítica cuantificada como el área GFAP+ promedio para cada astrocito. NTg-Veh y Tg-Veh $n=5$, Tg-Gal1 $n=4$ * $p < 0.05$ ANOVA seguido de contrastes de Tukey. Barra de escala = 25 μ m.

De todos modos, este parámetro evidenció un aumento del 28% del área promedio por astrocito de los ratones Tg-Veh respecto de los NTg-Veh en esta subregión del hipocampo, y

una clara recuperación morfológica de las células astrogliales luego del tratamiento con Gal1. Esto es apreciable en las imágenes representativas, donde se observa que los astrocitos del ratón Tg-Veh presentaron somas hipertrofiados y menor cantidad de proyecciones, asociados a mayor reactividad astroglial. En cambio, los astrocitos representativos del grupo Tg-Gal1 de la Figura 19A, reflejaron una apariencia más cercana al NTg, exhibiendo múltiples procesos y cuerpos celulares más finos.

Contacto astrocito-endotelio en el hilio del hipocampo

La presencia de β -amiloide sobre la vasculatura afecta el contacto directo entre el astrocito y la membrana basal del endotelio, interviniendo en la comunicación de estos tipos celulares. A su vez, se ha descrito que la reactividad astroglial puede darse en asociación a la retracción de los podocitos de los astrocitos (Wilcock, Vitek, y Colton 2009). En esta sección se muestran los resultados de la evaluación de la envoltura de los vasos por los pies astrocíticos, donde se buscó poder distinguir si la patología se acompañaba de alteraciones en este parámetro a los 12 meses de edad de los ratones, y si el tratamiento con Gal1 era capaz de modular este fenómeno. Para ello, se realizó una inmunomarcación contra la proteína astrocítica GFAP acoplada a tinción del endotelio empleando Lectina-FITC en cortes coronales del cerebro conteniendo hipocampo de los distintos grupos experimentales. Se tomaron imágenes de microscopía confocal del hilio del giro dentado para su posterior análisis, lo que se detalla en Metodología experimental. La Figura 20 muestra imágenes representativas de los grupos NTg-Veh, Tg-Veh y Tg-Gal1 donde se puede observar tanto la astroglía como la vasculatura. En ratones Tg-Veh se verificó una disminución en el área de contacto entre los pies astrocíticos GFAP+ y los vasos Lectina-FITC+ en comparación con los ratones NTg-Veh, medida como la colocalización entre la marca astrocitaria y la marca Lectina-FITC+, respecto al área Lectina-FITC+ total (Figura 20B). A su vez, se determinó el número de contactos promedio de los astrocitos con la vasculatura, encontrándose que los astrocitos del hipocampo de los ratones Tg-Veh presentaron colocalización entre sus procesos y el endotelio una menor cantidad de veces que aquellos de los ratones NTg-Veh (Figura 20C). Esto se evidencia cualitativamente en la Figura 20A al observar que la zona de colocalización entre las dos marcas (de color amarillo) resultó llamativamente menor en el ratón Tg-Veh. Los

astrocitos allí presentes evidenciaron la morfología hipertrofiada, con procesos más cortos, menores en número y más alejados de los vasos.

Por otro lado, el tratamiento con Gal1 en los ratones Tg se asoció a una recuperación de los contactos astrocito-endotelio tanto en la cuantificación del área de colocalización GFAP+/Lectina-FITC+, como también en el número de contactos de cada astrocito con el endotelio (Figura 20B y 20C). De manera relevante, el área vascular cubierta por pies astrocíticos en los animales Tg-Gal1 resultó significativamente mayor que en el grupo Tg-Veh, destacando la potencial acción moduladora de Gal1 sobre este parámetro.

En definitiva, Gal1 mostró un fuerte potencial capaz de modular la reactividad astroglial, lo que se vio reflejado en la recuperación de la morfología de los astrocitos y de la capacidad de envoltura del endotelio por los pies astrocíticos.

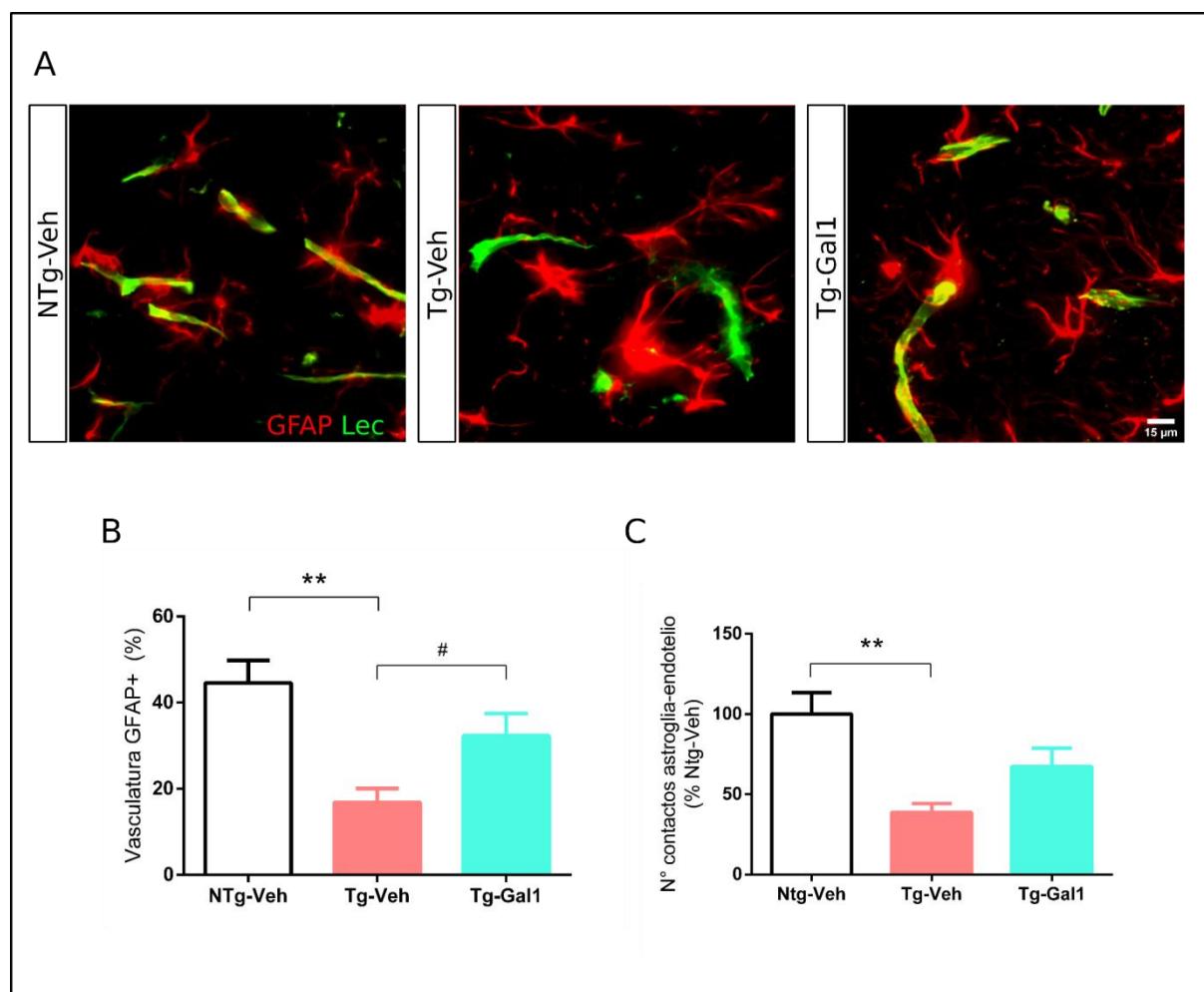


Figura 20. El tratamiento con Gal1 recuperó el contacto de los pies astrocíticos con la vasculatura en el hipocampo de ratones PDAPPJ20 de 12 meses. (A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia en cortes coronales

de 60 μm para GFAP (rojo) acoplada a tinción con Lectina-FITC (Lec, verde). (B) Análisis de colocalización de las marcas evaluada como el área GFAP/Lectina-FITC respecto al área total Lectina-FITC+. (C) Número de contactos promedio que un astrocito mantiene con la vasculatura, expresado en porcentaje respecto al grupo NTg-Veh. Los análisis corresponden al hilio del giro dentado. NTg-Veh y Tg-Veh $n=5$, Tg-Gal1 $n=4$. * $p<0.05$ ANOVA seguido de contrastes de Tukey y # $p<0.05$ contrastes ortogonales. Barra de escala = 15 μm .

Presencia de la proteína Acuaporina-4 de localización en los contactos astrocito-endotelio en el hilio del hipocampo

AQP4 es un canal de agua cuya expresión se encuentra altamente polarizada en el pie astrocítico que contacta la vasculatura, esencial para el transporte vascular. Evaluar la localización de AQP4 perivascular resulta un parámetro adecuado para inferir el estado funcional de las terminales astrocíticas. Con este objetivo, se utilizó la técnica de *array tomography*, que permite obtener imágenes tridimensionales de alta resolución de la región de interés. En este caso, se realizaron cortes coronales ultrafinos (25-100 nm) conteniendo hipocampo -a partir de cortes de vibrátomo- sobre los que se realizó la inmunomarcación contra la proteína AQP4 acoplada a una tinción del endotelio empleando Lectina-FITC. Luego se obtuvieron imágenes seriadas de microscopía confocal, que se procesaron para consolidar una reconstrucción tridimensional. El resultado permitió evaluar la presencia de las marcas de AQP4 y Lectina-FITC y su colocalización, con una precisión de pocos micrómetros.

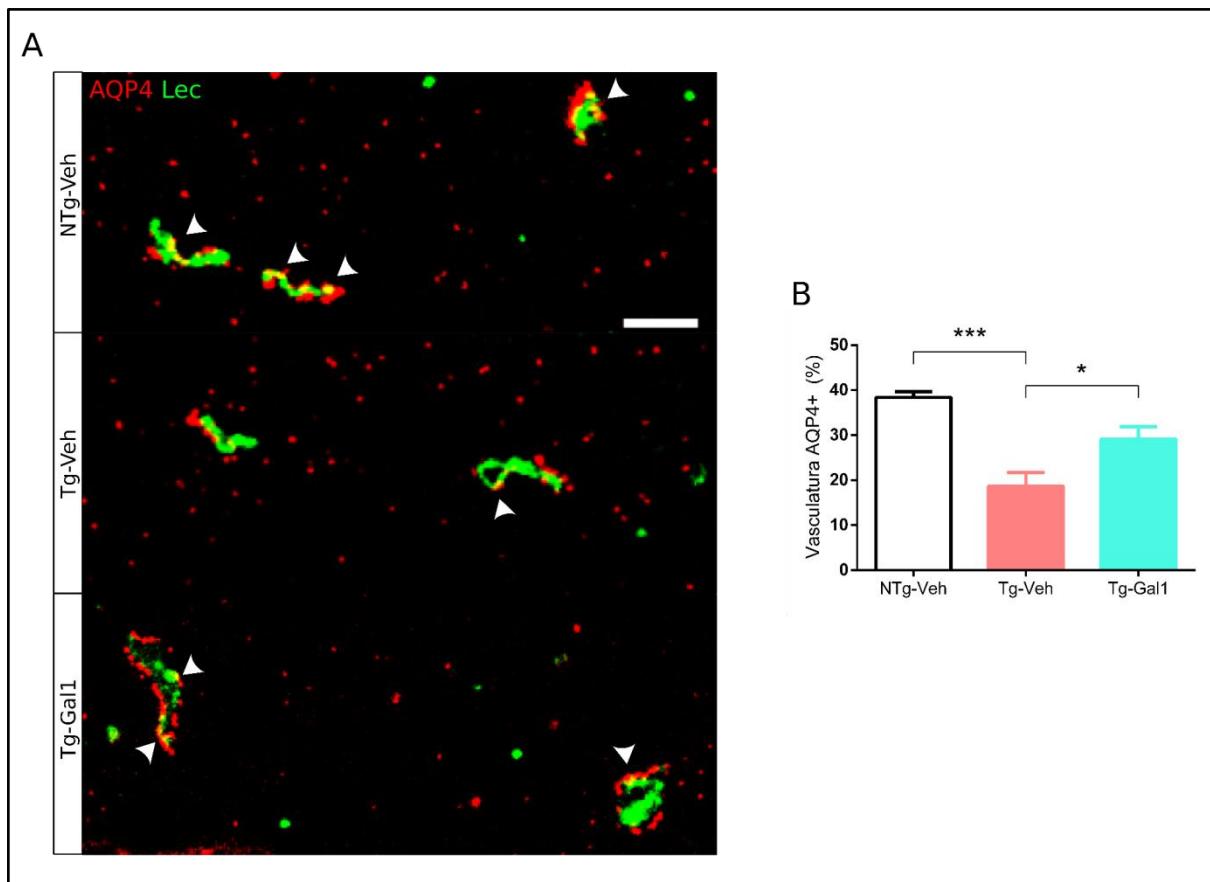


Figura 21. El tratamiento con Gal1 recuperó la presencia del canal de agua AQP4 en los contactos astrocito-
endotelio en el hilio del giro dentado de ratones PDAPPJ20 de 12 meses. (A). Imágenes representativas de alta
resolución de Array Tomography en cortes coronales ultrafinos (25-100 nm). Se realizó la inmunomarcación
específica contra AQP4 (rojo) acoplada a tinción con Lectina-FITC (Lec, verde). Las flechas blancas indican sitios
de superposición de las marcas. (B) Análisis de colocalización de las señales cuantificada como el área
colocalizando respecto al área total Lectina-FITC+. NTg-Veh y Tg-Veh $n=7$, Tg-Gal1 $n=5$ * $p<0.05$ y *** $p<0.001$
ANOVA seguido de contrastes de Tukey. Barra de escala = 5 μ m.

Sobre las imágenes, se analizó la presencia de AQP4 que se encontraba en contacto con el endotelio, y los resultados se expresaron como la cuantificación del área de colocalización de las marcas positivas respecto del área total Lectina-FITC+. Dicho análisis determinó que los ratones Tg-Veh presentaban una señal significativamente menor de AQP4 colocalizando con la vasculatura en el hilio del hipocampo en comparación con los NTg-Veh (Figura 21A). El grupo Tg-Gal1 mostró una recuperación de la marca perivascular de AQP4, la cual resultó además mayor que en el grupo Tg-Veh (Figura 21B), lo que sugiere el recobro funcional de la comunicación astrocito-endotelio luego del tratamiento con Gal1.

Parte 4.

Impacto de A β 1-40 fibrilar sobre células endoteliales de microvasculatura cerebral humana in vitro. Efecto del tratamiento con Galectina-1.

Viabilidad de las HBMEC ante distintas concentraciones de A β y efecto de Gal1

Con el objetivo de evaluar alteraciones en el endotelio de microvasculatura cerebral causados de manera directa por A β 1-40, principal forma que se deposita sobre la vasculatura, y estudiar el potencial protector de Gal1, se usó un modelo *in vitro* empleando células endoteliales de microvasculatura cerebral humana (HBMEC por sus siglas en inglés de *Human Brain Microvascular Endothelial Cells*).

Estudios en cerebros *post mortem* muestran que las células endoteliales permanecen ultraestructuralmente intactas tanto en ratones con EA familiar y muestras de pacientes humanos con angiopatía cerebral amiloide (Taylor et al. 2022; Thomas et al. 1996). Esto ha llevado a sugerir que los mecanismos activados por A β inducen la disfunción endotelial en ausencia de desprendimiento de las células endoteliales de la vasculatura vinculado a la apoptosis (A. C. Yang et al. 2020; Chisari et al. 2010; Stanyer, Betteridge, y Smith 2004; Niwa et al. 2001). Por esto, resultó de suma importancia para esta Tesis establecer un modelo *in vitro* que permitiera evidenciar alteraciones en células endoteliales causadas por la exposición a A β 1-40 en condiciones no apoptóticas. Con el objetivo de reproducir lo más fielmente posible el microambiente vascular de la patología, se obtuvieron las distintas formas moleculares de fibrillas de A β 1-40 que están en contacto con la vasculatura (principalmente protofibrillas y fibrillas que componen los depósitos vasculares), según se detalla en la sección de Metodología Experimental. En primer lugar, se ensayaron las concentraciones de A β 1-40 fibrilizado a las que se expondrían las HBMEC. Para obtener las condiciones deseadas, se realizaron pruebas de viabilidad celular (MTT) en respuesta al A β 1-40 en un rango de concentraciones de 0.01 a 0.5 μ M y se ensayaron dos tiempos de incubación durante, 6 y 24

h, como se muestra en la Figura 22 A y B, respectivamente. El análisis mostró que para las concentraciones menores a 0.2 μ M, no se observó disminución de la viabilidad celular. En particular, al intentar simular un microambiente de exposición crónica a la especie A β 1-40, el tiempo más relevante para evaluar resultaba ser 24 h. Como la concentración de 0.2 μ M causó una baja significativa de la absorbancia, medida de la viabilidad en el ensayo MTT, se eligió proceder en los experimentos con la concentración evaluada inmediatamente anterior, de 0.1 μ M. Los detalles de este experimento se encuentran en la sección de Metodología Experimental.

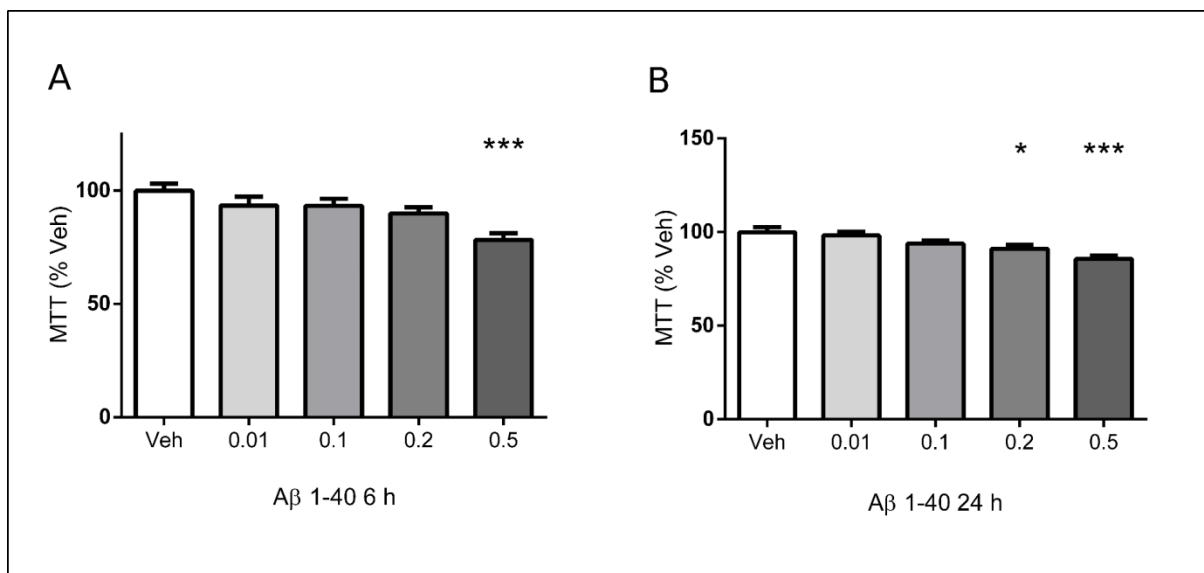


Figura 22. Efecto de distintas concentraciones de A β 1-40 sobre la viabilidad de células endoteliales derivadas de microvasculatura humana (HBMEC). Ensayo de viabilidad MTT en células endoteliales de microvasculatura cerebral humana en condición control (Veh) y expuestas a distintas concentraciones de A β 1-40 (0.01, 0.1, 0.2, 0.5 μ M). Los tratamientos fueron de 6 (A) y 24 h (B). Para todas las condiciones, $n= 8$ por tratamiento. La absorbancia a 577 nm es indicativa de las células metabólicamente activas y permite inferir viabilidad. Detalles en la sección de Metodología Experimental. * $p<0.05$ y *** $p<0.001$ ANOVA seguido de contrastes de Dunnet de las distintas concentraciones de A β contra el grupo Veh.

Integridad de la monocapa de HBMEC expuestas a A β y efecto de Gal1

Los resultados obtenidos en esta Tesis han demostrado la capacidad de Gal1 de modular varios parámetros relacionados con el estado de la vasculatura en ratones que recapitulan alteraciones presentes en la EA. Sin embargo, en modelos experimentales animales, es difícil discernir las alteraciones y mecanismos particulares que tienen lugar en las células endoteliales. En este sentido, el siguiente objetivo que se abordó fue estudiar el potencial efecto directo de Gal1 sobre células endoteliales cerebrales en cultivo.

Para evaluar la integridad endotelial, durante esta Tesis se puso a punto un ensayo de BHE *in vitro* utilizando células HBMEC sobre la membrana de un dispositivo *transwell*. Estas células, que requieren de un medio de mantenimiento suplementado con factores que permiten el desarrollo fenotípico adecuado, crecen hasta establecer una monocapa que se encuentra sellada entre los contactos célula-célula. La resistencia eléctrica transendotelial (TEER) es una medida de la resistencia de la monocapa al paso de corriente eléctrica. En confluencia, las HBMEC presentan un valor relativo de TEER alto, lo que se asocia con la integridad y la función de barrera propiamente dicha de la monocapa. En primer lugar, se debió establecer la dinámica de crecimiento y las características del modelo de BHE. Luego del sembrado, la conformación de la barrera fue monitoreada mediante la medición de TEER en cada cambio de medio para al menos dos *transwells*, lo que se repitió en tres experimentos independientes (Figura 23A). Se determinó que al día 12 post sembrado, la monocapa de HBMEC alcanzaba su máximo valor de TEER, seleccionando este tiempo para realizar los experimentos.

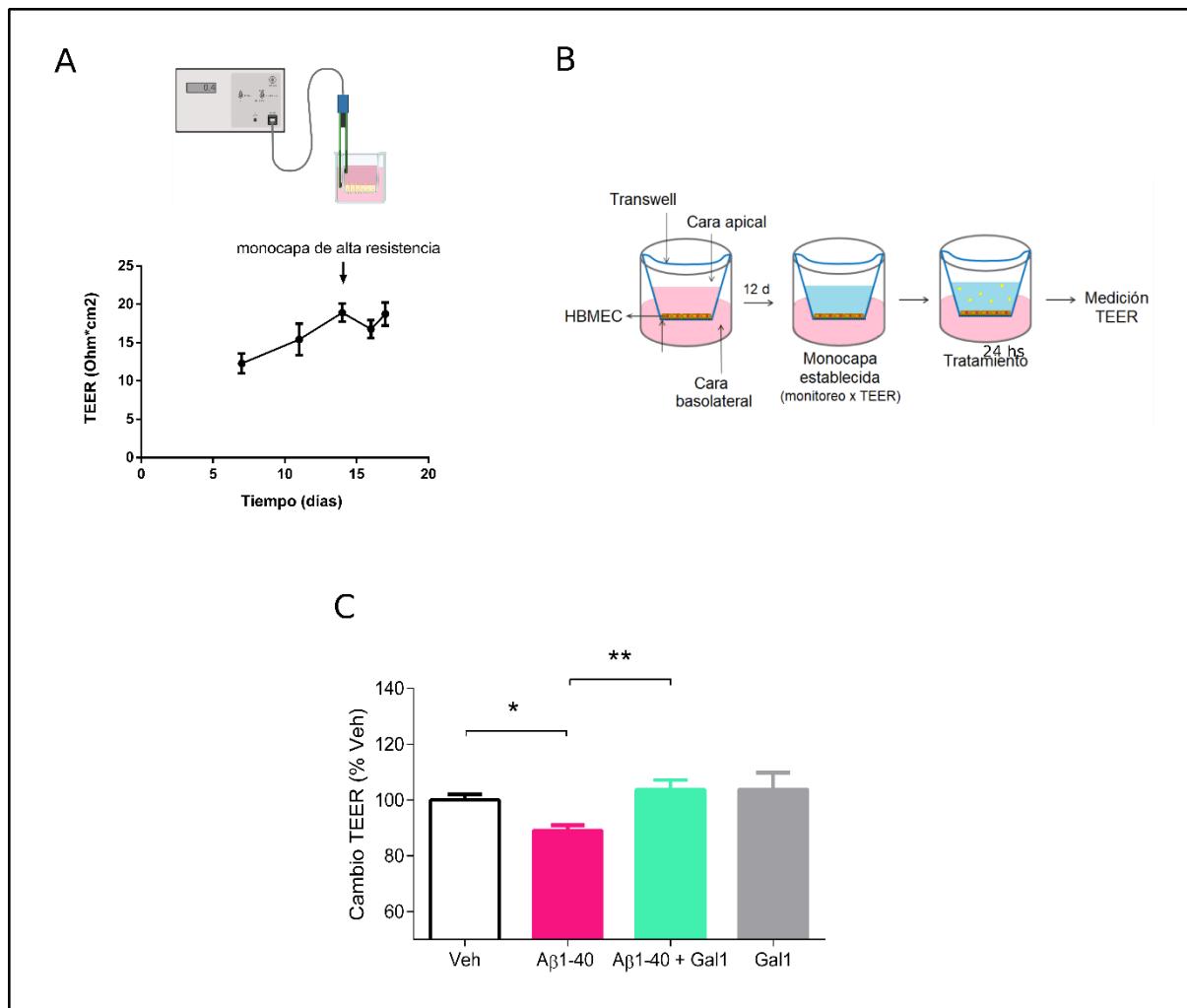


Figura 23. Gal1 recuperó la resistencia eléctrica transendotelial (TEER) de la barrera formada por las HBMEC causada por A β 1-40. (A) Ensayo de BHE in vitro utilizando HBMEC. Puesta a punto para la obtención de una monocapa sellada, monitoreada por el seguimiento de TEER y determinada por un aumento de este parámetro hasta llegar a un plateau. (B) Diseño Experimental. Grupos experimentales: Vehículo (grupo control), A β 1-40 (0.1 μ M), Gal1 (15 μ g/ml) y A β 1-40 + Gal1. Las monocapas de HBMEC sobre transwell fueron expuestas a los tratamientos durante 24 h. (C) Evaluación del cambio de TEER como valor luego de los tratamientos respecto al valor inicial para cada transwell, expresados en porcentaje respecto al grupo control. Resultado de tres experimentos independientes, n=6 (2 transwell/grupo en cada experimento) *p<0.05, **p<0.01 ANOVA seguido de contrastes de Tukey.

En la Figura 23B se muestra un esquema del procedimiento realizado para cada experimento utilizando el dispositivo *transwell*. Luego del establecimiento de la monocapa, comprobado por la medición de TEER, se determinó la disminución de la resistencia eléctrica transendotelial de la monocapa de HBMEC causada por la exposición a A β 1-40 0.1 μ M por

24 h, como parte de la puesta a punto. Luego se procedió a incubar distintas monocapas como se indica en la Figura 23B.

Las HBMEC se mantuvieron con medio control en el grupo vehículo (Veh), se expusieron a A β 1-40 0.1 μ M (A β 1-40), recibieron 15 μ g/ml de Gal1 recombinante (Gal1) o recibieron en conjunto la exposición a A β 1-40 y el tratamiento con Gal1 (A β 1-40 + Gal1) durante 24h. La Figura 23C muestra el cambio de los valores de TEER de HBMEC luego del tratamiento para cada transwell, calculado como el valor final de resistencia final (en $\Omega \cdot \text{cm}^{-2}$) respecto al valor inicial y luego expresado como porcentaje del grupo control. Los detalles experimentales de este ensayo y su análisis se encuentran en la sección de Metodología Experimental. Se determinó una disminución de la resistencia eléctrica de las monocapas pertenecientes al grupo expuesto a A β 1-40 comparado con el grupo expuesto a Veh, lo cual evidencia una pérdida de la integridad. Sin embargo, el cotratamiento con Gal1 impidió la disminución de este parámetro e incluso resultó en valores de TEER significativamente mayores a la condición de A β 1-40. Esto sugiere que la integridad endotelial *in vitro* se vio protegida por el tratamiento con Gal1. Por otro lado, la resistencia eléctrica medida en los grupos A β 1-40 + Gal1 y sólo Gal1 registraron valores TEER comparables con la condición de exposición al control (Veh). Por lo tanto, estos resultados sugieren que Gal1 es capaz de modular positivamente la integridad de la monocapa de células endoteliales derivadas de microvasculatura cerebral humana.

Impacto de A β 1-40 sobre la presencia de la proteína de unión estrecha ocludina en HBMEC y su modulación por Gal1.

La integridad de la BHE está ligada a la presencia de uniones estrechas ubicadas en la cara basolateral de los contactos célula-célula del endotelio. En contextos patológicos, estas uniones se ven perturbadas por la disminución de los niveles de las proteínas o por el secuestro intracelular que impide su localización en la membrana (Lochhead et al. 2020). En vista de los resultados anteriores, se analizó cualitativamente la presencia de la proteína de unión estrecha ocludina en las células HBMEC.

Para ello, se crecieron células sobre cubreobjetos durante 48 h y luego fueron expuestas a los tratamientos con A β 1-40 0.1 μ M, Gal1, A β 1-40 + Gal1 o Veh durante 24h. Luego de la

fijación, se procedió a la detección de ocludina por inmunofluorescencia empleando un anticuerpo específico. Se tomaron imágenes de las células con microscopía confocal, exemplificando lo que se observó en cada grupo experimental, en la Figura 24.

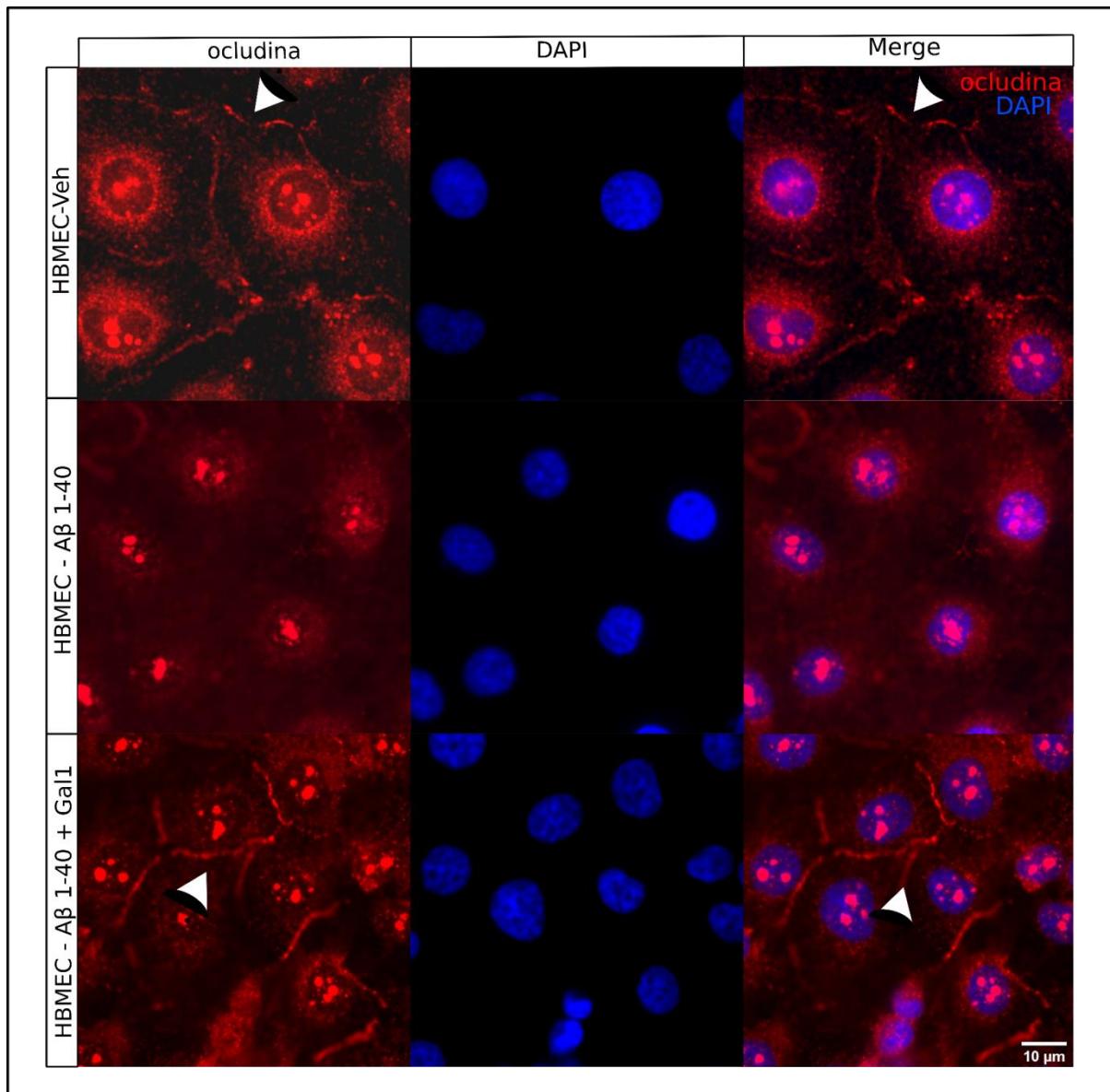


Figura 24. Inmunofluorescencia contra la proteína de unión estrecha ocludina acoplada a tinción de DAPI en células endoteliales de microvasculatura cerebral humana (HBMEC). Flecha blanca indica expresión de ocludina en los contactos célula-célula. Barra de escala = 10 μ m.

Se observaron diferencias en las HBMEC expuestas a los distintos tratamientos, lo cual se muestra en las imágenes representativas en la Figura 24. En la imagen correspondiente al

grupo Veh se observa la presencia de ocludina con localización en la membrana celular de las HBMEC, formando parte de los contactos célula-célula.

Aunque se realizó solo un análisis cualitativo, el fenotipo observado en las HBMEC expuestas a A β 1-40 fue muy claro, ya que la marca positiva para la ocludina se encontraba completamente ausente en la membrana celular. Esto podría indicar que A β 1-40 generó una pérdida o, más probablemente, la deslocalización de ocludina, coincidiendo con una señal uniformemente dispersa por el citoplasma de la célula endotelial.

Sin embargo, el grupo de HBMEC tratadas con A β 1-40 + Gal1, mostró una aparente recuperación de la marca de ocludina en varios sitios de contacto celular, como se muestra en las imágenes representativas. En este sentido, Gal1 parece tener la capacidad de atenuar el efecto de deslocalización de ocludina de la membrana de células endoteliales inducido por A β 1-40, sugiriendo un papel protector ante la alteración de la barrera.

En referencia a la marca nuclear positiva tras el empleo del anticuerpo anti-occludina, la misma se presentó de manera constante en todas las células independientemente del grupo experimental. La bibliografía no ha descrito dicha marca ni se encuentra reportado que ocludina pueda tener localización nuclear. El anticuerpo que se utilizó aquí, aunque muy reportado para *western blot* en células y en tejido e inmunomarcaciones en tejido, no cuenta con antecedentes de resultados de inmunofluorescencia en células (Y. Liu et al. 2018; Araújo et al. 2017). El detalle de los anticuerpos utilizados se encuentra en la sección de Metodología Experimental. En otros trabajos publicados donde se emplean otros anticuerpos para inmunofluorescencia de ocludina no detectan marca nuclear (Savettieri et al. 2000; Hollmann et al. 2017). Se infiere que *a priori* podría tratarse de una marca inespecífica al reconocer otro epítope ajeno a la proteína ocludina, pero se carece de evidencia completa.

Parte 5.

Cambios patológicos en la respuesta a estrés de retículo vascular en modelos experimentales de EA y su modulación por Gal1

Activación del sensor de UPR BIP/GRP78 en HBMEC expuestas a A β 1-40 y efecto de Gal1

La presencia de agregados proteicos resultantes de la acumulación de proteínas mal plegada es una la característica central de múltiples enfermedades neurodegenerativas como la EA (Ajoobady et al. 2022). Como se explicó en detalle en la Introducción, el estrés de RE causado por la acumulación de proteínas mal plegadas inicia la respuesta llamada UPR. Una activación persistente de la UPR debido a un estrés del RE constitutivo, responsable de procesos inflamatorios e incluso la muerte celular.

Se investigó el primer sensor de estrés de RE e inductor de la UPR, GRP78/BIP. Para ello, se utilizaron HBMEC y se estudió la presencia de la proteína mediante inmunofluorescencia empleando un anticuerpo específico.

Como se explicó previamente y se detalla en la sección de Metodología Experimental, las HBMEC se crecieron sobre cubreobjetos durante 72 h. Luego recibieron los tratamientos según correspondían al grupo Veh, A β 1-40, A β 1-40 + Gal1 o Gal1 durante 24 h, lo que permitió evaluar la presencia de la activación sostenida de la respuesta de estrés. La Figura 25A muestra imágenes representativas de microscopía confocal de cada grupo experimental. Al observar las imágenes, es posible detectar un cambio de localización y un aumento de la marca positiva de BIP tras la exposición a A β 1-40, detectando la formación de agregados BIP+ de alta intensidad de marca en el citoplasma celular.

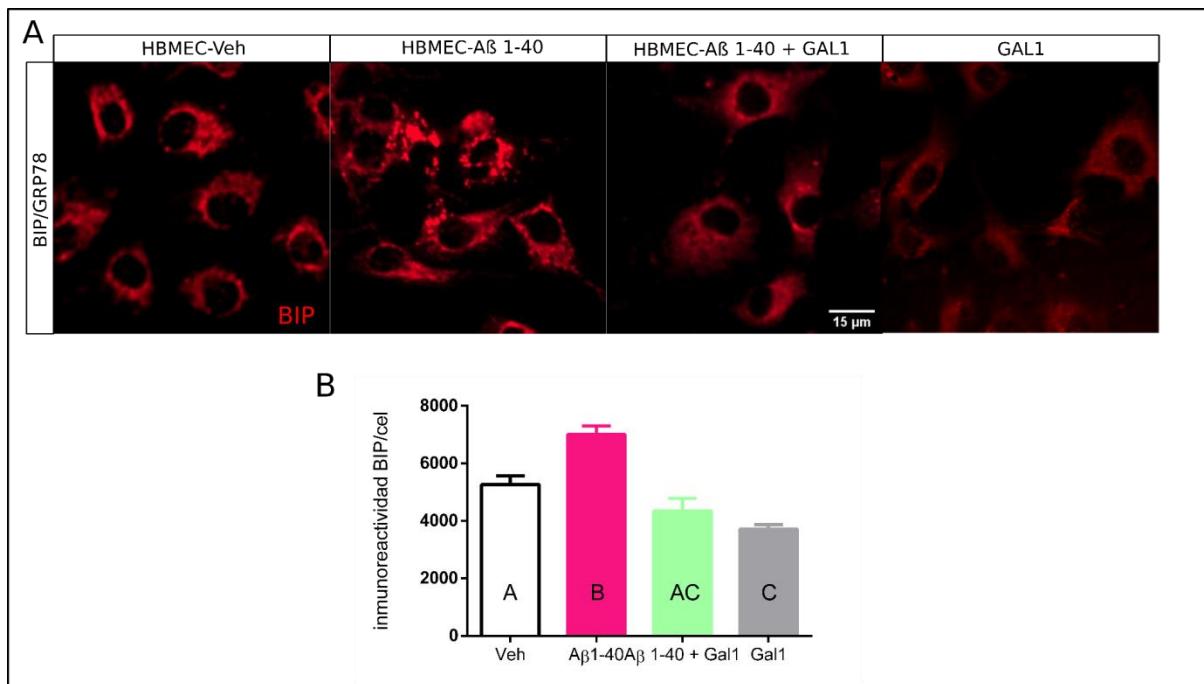


Figura 25. A β 1-40 indujo la expresión de BIP/GRP78 en HBMEC y el tratamiento con Gal1 la previno. (A) Imágenes representativas de la Inmunofluorescencia para BIP/GRP78 empleando un anticuerpo específico. (B) Cuantificación del promedio de la intensidad de marca BIP+ (mean grey value) para cada célula. Se cuantificó para cada grupo experimental entre 30-40 células pertenecientes a dos muestras distintas. Los resultados fueron consistentes en dos experimentos independientes. Se utilizó la nomenclatura A, B y C para nombrar grupos significativamente distintos según el p-valor obtenido del análisis estadístico: Veh vs Gal1 $p<0.001$; Veh vs A β 1-40, A β 1-40 vs Gal1, A β 1-40 vs A β 1-40+Gal1 $p<0.0001$. ANOVA seguido de contrastes de Tukey. Barra de escala = 15 μ m.

Luego, se cuantificó la densidad óptica de la marca BIP+ para cada célula. Se detectó un aumento de 30% de la marca positiva de esta proteína en HBMEC expuestas a A β 1-40 respecto al grupo mantenido en medio control (Veh), tal como se observa en la Figura 25B, demostrando una activación de la respuesta de UPR que se sostiene tras una exposición continuada al péptido amiloide. De manera relevante, dicho aumento no se observó cuando las HBMEC se trataron en conjunto con Gal1. Por lo tanto, el tratamiento fue capaz de prevenir el aumento de la marca positiva para BIP, lo que sugiere estrés de retículo, causado por A β 1-40. Es interesante notar que, Gal1 se asoció a una disminución de los niveles basales de la proteína de RE, mostrando una disminución en la cuantificación de la señal de BIP respecto al grupo Veh.

Activación de los efectores de UPR en HBMEC expuestas a A β y efecto de Gal1

En vista de la activación de BIP detectada, se buscó evaluar las vías río abajo de esta chaperona. La señalización de la UPR está constituida por tres sensores clave de estrés del RE: ATF6, IRE1 y PERK, proteínas transmembrana del RE.

Para evaluar la capacidad de HBMEC de responder mediante las vías de UPR, se realizó un control positivo empleando tapsigargina, un inhibidor selectivo irreversible de la Ca²⁺-ATPasa del RE que provoca un estrés grave del RE y la interrupción de la traducción (Caspersen, Pedersen, y Treiman 2000). Este ensayo requirió la puesta a punto incluyendo la evaluación visual del estado de las células vivas en cultivo para corroborar la morfología celular, ya que la exposición constante a tapsigargina causa apoptosis, y la evaluación de RT-PCR de los distintos efectores para comprobar la inducción de la UPR. Finalmente, las HBMEC fueron expuestas a tapsigargina 1 μ g/ml durante 4 h. Esto comprobó un incremento de la expresión de Ire1 α al doble, y un aumento de los niveles del ARNm de PERK al triple, respecto a la condición Veh (Figura 26 D y E). Interesantemente, tapsigargina no generó aumentos significativos en los niveles del mensajero de ATF6 (Figura 26 F).

En consecuencia, se midieron los niveles de ARNm de los tres efectores Ire1 α , PERK y ATF6, mediante RT-PCR en HBMEC que se expusieron a los distintos estímulos/condiciones. Los resultados fueron concluyentes, evidenciando que los niveles de Ire1 α y PERK se encontraban aumentados en las HBMEC expuestas a A β 1-40 en comparación con el grupo Veh (Figuras 26 A y B, respectivamente). Los niveles de ARNm de Ire1 α aumentaron un 20%, mientras que PERK mostró un incremento del 41%, evidenciando actividad sostenida de la UPR río abajo de BIP. Por otro lado, los niveles de ARNm de ATF6 en las HBMEC no se vieron afectados tras la exposición a A β 1-40, en concordancia con los resultados de tapsigargina, lo que podría indicar que este mecanismo en las HBMEC no se activa por UPR en estas células (Figura 26C).

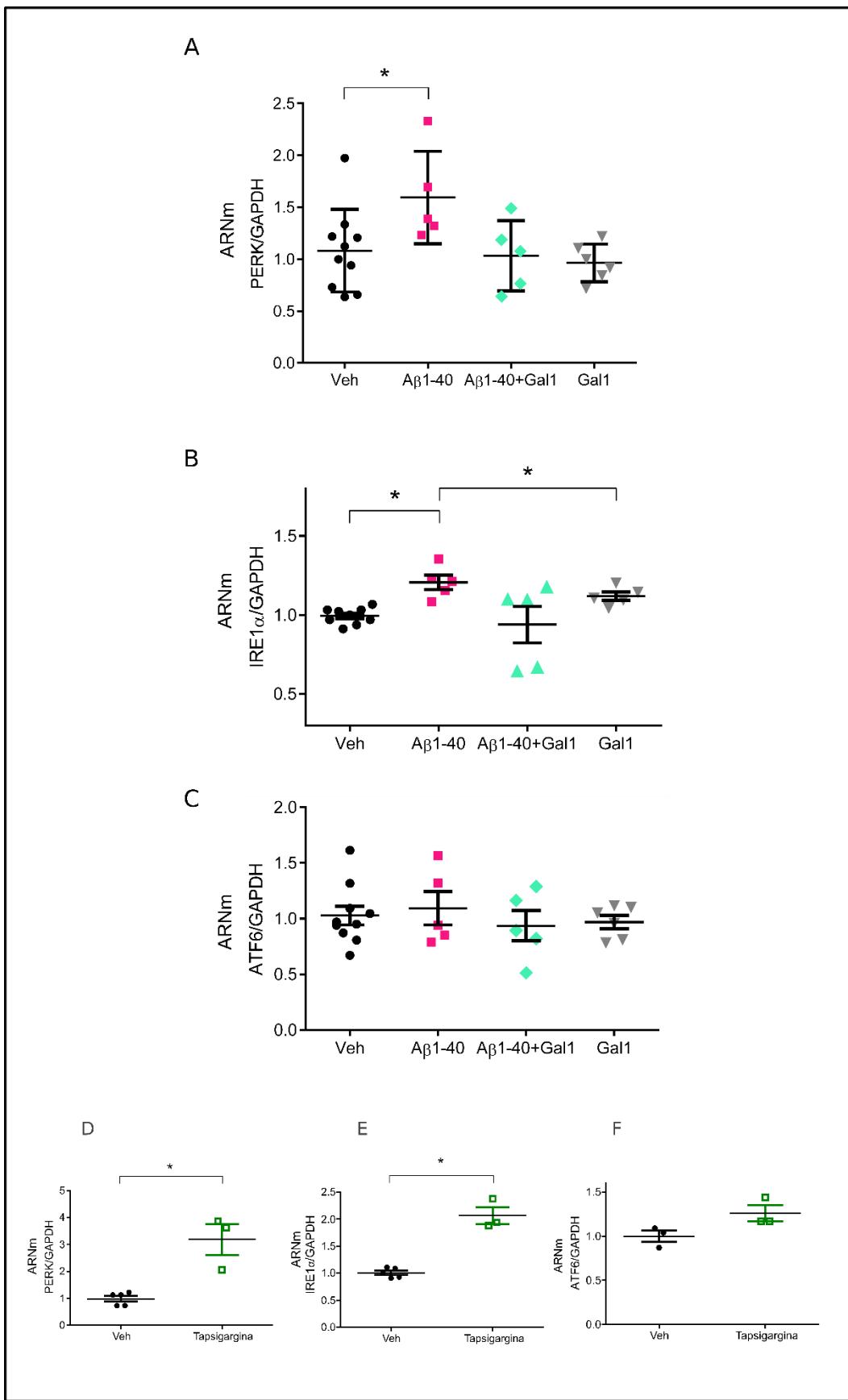


Figura 26. Gal-1 moduló la expresión de los efectores de la UPR *Ire1 α* y *PERK* inducidos por $A\beta$ 1-40 en HBMEC. (A-C) Niveles de expresión de ARNm relativizados al tratamiento control medido por RT-PCR de los efectores de

respuesta al estrés de retículo: *Ire1a* (A), *PERK* (B) y *ATF6* (C). Los puntos corresponden a muestras individuales de tres experimentos independientes. *Veh* $n=10$, *A β 1-40* y *A β 1-40 + Gal1* $n=5$, *Gal1* $n=6$ * $p<0.05$ ANOVA de dos vías seguido de comparaciones de Tukey. (D-F) Niveles de expresión de los inductores en las HBMEC tras expuestas al control positivo de inducción de estrés de retículo *tapsigargina* 1 μ g/ml por 4 h. Para la cuantificación se relativizaron los niveles del ARNm blanco a la expresión del gen housekeeping *GAPDH* de cada muestra. Detalles del protocolo de RT-PCR y el método de cuantificación se encuentran en la sección de métodos.

Por el contrario, no se detectaron cambios en los niveles de *Ire1 α* y *PERK* en el grupo *A β 1-40 + Gal1*, sugiriendo un mecanismo inhibidor de Gal1 sobre el aumento de los transcriptos inducidos por *A β 1-40*. Esto podría sugerir que el tratamiento con Gal1 asiste en la resolución de la UPR, no viéndose niveles alterados de los efectores a las 24 h, lo que podría evitar una respuesta al estrés de RE constitutiva y patológica. Además, el tratamiento de las HBMEC solamente con Gal1 no alteró los niveles basales de estos ARNm.

Translocación nuclear del factor de transcripción XBP1

Río abajo de IRE1 α , XBP1 induce la respuesta adaptativa de UPR y, eventualmente, se encarga de su resolución. Sin embargo, la hiperactivación de esta vía por estrés constitutivo del RE se vincula a la respuesta maladaptativa de la UPR.

Se continuó con la detección de la activación de XBP1 en células HBMEC, con el objetivo de evaluarla tras 24 h de exposición a *A β 1-40*, como también el efecto de Gal1. La detección de esta proteína suele hacerse mediante la técnica de *western blot* y en respuesta a tratamientos más agresivos y agudos. Para esta Tesis, se puso a punto el protocolo y se ensayaron distintos tiempos para detectar por inmunofluorescencia la translocación nuclear, manera más precisa de evaluar la activación de este factor de transcripción. Las HBMEC se crecieron sobre cubreobjetos durante 72 h previamente a recibir los tratamientos ya empleados, y luego se realizó una inmunofluorescencia empleando un anticuerpo específico contra esta proteína, acoplado a la tinción de DAPI para visualizar los núcleos.

Se obtuvieron las imágenes de microscopía confocal para evaluar el estado de activación de XBP1 a las 24 h, como se muestra de manera representativa para cada grupo experimental en la Figura 27A. Las imágenes ejemplifican claramente que las HBMEC tratadas con vehículo (grupo *Veh*) no presentan marca positiva para XBP1 en su núcleo. Por el contrario,

tras la exposición a A β 1-40, se observa fluorescencia en el núcleo. Dicha marca se muestra ausente en el grupo A β 1-40 + Gal1, lo que indica que Gal1 impediría la activación y posterior translocación nuclear del factor de transcripción.

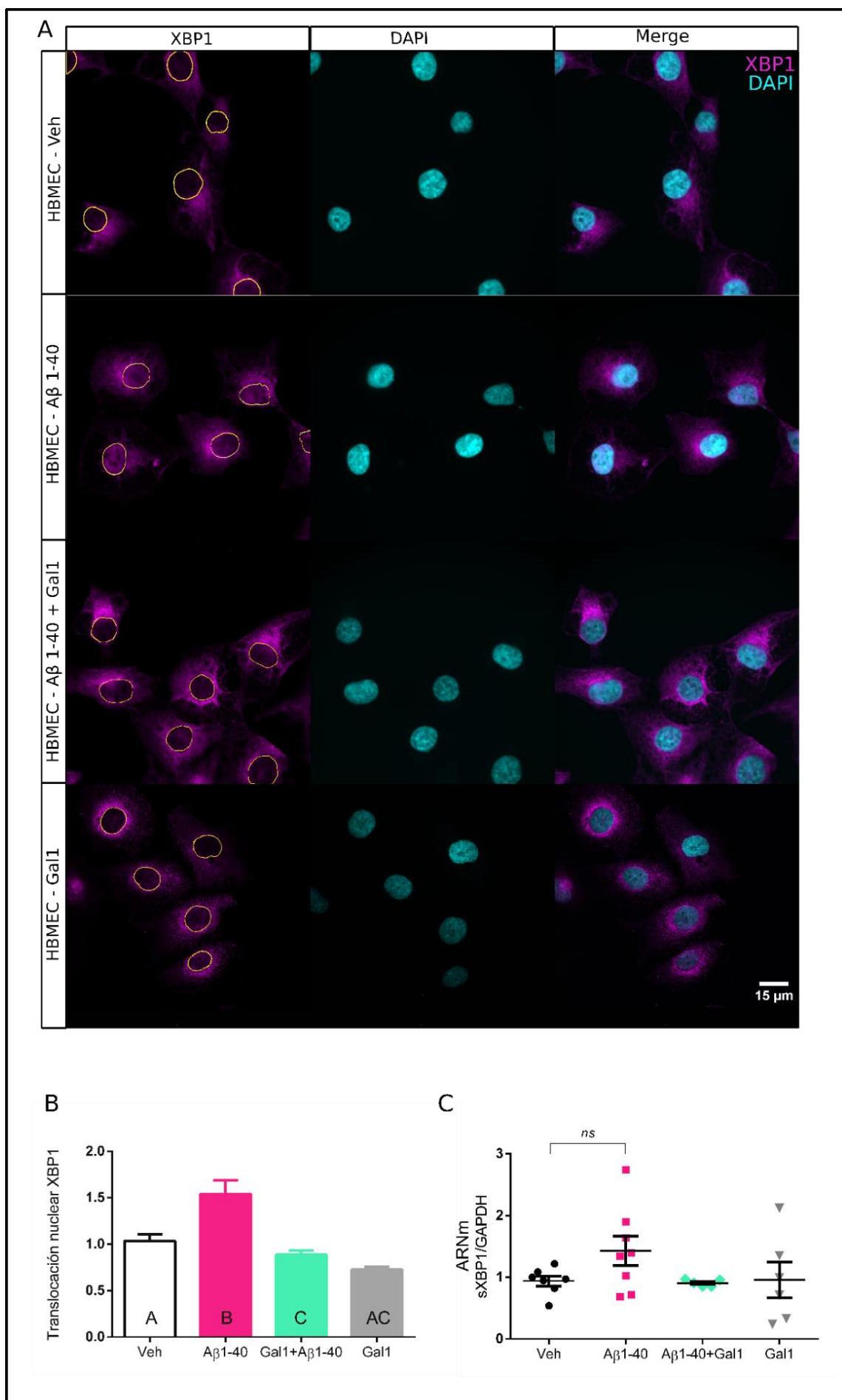


Figura 27. Gal1 moduló la translocación nuclear de XBP1 inducida por A β 1-40. (A) Imágenes representativas de inmunofluorescencia para XBP-1 y tinción con DAPI en HBMEC expuestas a A β 1-40, A β 1-40+ Gal1 o vehículo. Los núcleos se encuentran delimitados con línea punteada en la primera columna. (B) Cuantificación de la intensidad de la señal para XBP1+ (mean grey value) nuclear respecto a la marca citoplasmática. Los valores se encuentran relativizados al grupo Veh. Se cuantificó este parámetro en 30/40 células pertenecientes a dos réplicas distintas de cada grupo experimental. Los resultados fueron consistentes en dos experimentos independientes. (C) Niveles de expresión de ARNm de sXBP1 relativizados al tratamiento control medido por RT-PCR. (*) se utilizó la nomenclatura A, B y C para nombrar grupos significativamente distintos. Veh vs A β 1-40, A β 1-40 vs Gal1, A β 1-40 vs A β 1-40+Gal1 $p<0.0001$; Veh vs A β 1-40+Gal1 $p<0.001$. ANOVA seguido de contrastes de Tukey. Para c), ns: no significativo, ANOVA seguido de comparaciones de Tukey. Barra de escala = 15 μ m.

Para el análisis de translocación se utilizó un macro de ImageJ generado para ello durante la puesta a punto. Se midió la densidad óptica para la marca de XBP1 en el núcleo, delimitado por la tinción de DAPI, y la densidad óptica en el citoplasma. La cuantificación muestra la proporción de la intensidad de la marca nuclear respecto a la marca citoplasmática. Los resultados se muestran en la Figura 27B donde los valores se encuentran relativizados al grupo Veh. Se evidenció un aumento del 50% de la translocación nuclear de esta proteína luego de la exposición a A β 1-40 respecto al grupo Veh, lo que sugiere activación sostenida y que posiblemente involucre señales de daño causadas por la activación prolongada de XBP1. Dicho aumento no se observó en las HBMEC correspondientes al grupo A β 1-40 + Gal1, lo que comprueba que Gal1 estaría contrarrestando la activación constitutiva de esta vía de UPR, pudiendo tener un efecto protector. Respecto a las HBMEC que solamente recibieron Gal1, tampoco se vio marca positiva en el núcleo. En efecto, los valores de translocación nuclear calculados fueron significativamente menores respecto al grupo tratado con A β 1-40. Esto se condice con lo observado previamente en los niveles del ARNm de Ire1 α , donde también se detectó una disminución, lo que podría indicar una regulación negativa de todo este brazo de la UPR.

La Figura 27C muestra los niveles de ARNm medidos para sXBP1, donde no se observaron cambios luego de ningún tratamiento, aunque se reflejó un aumento no significativo de este mensajero en el grupo A β 1-40 en comparación al control. Por la cantidad de proteína activa en el núcleo, podríamos inferir que esto refleja un rápido *splicing* mediado por IRE1 y posterior traducción, observándose la máxima respuesta inducida por A β 1-40 ya en forma de proteína.

Por otro lado, se evaluó la expresión de este marcador de estrés de RE en el hipocampo de los ratones NTg-Veh, Tg-Veh y Tg-Gal1, como se muestra en la Figura 28. En particular, se analizó el porcentaje del área endotelial Lectina-FITC+ cubierta por la marca inmunorreactiva contra la proteína XBP1. Se observó una tendencia ($p=0.08$ por contraste ortogonal) a la disminución de la expresión de XBP1 en los ratones Tg-Gal1 respecto al grupo Tg-Veh, que presentó el valor medio más elevado para este parámetro. Si bien las diferencias entre grupos no fueron significativas, lo cual puede deberse a que el análisis realizado puede requerir un mayor número de animales, los ratones Tg-Gal1 mostraron la menor área vascular con presencia de XBP1. En cierto modo, este resultado acompañó lo visto en el ensayo *in vitro* de translocación nuclear de XBP1 en las células endoteliales, donde Gal1 disminuyó la presencia basal de XBP1 nuclear y contrarrestó el aumento inducido por A β 1-40.

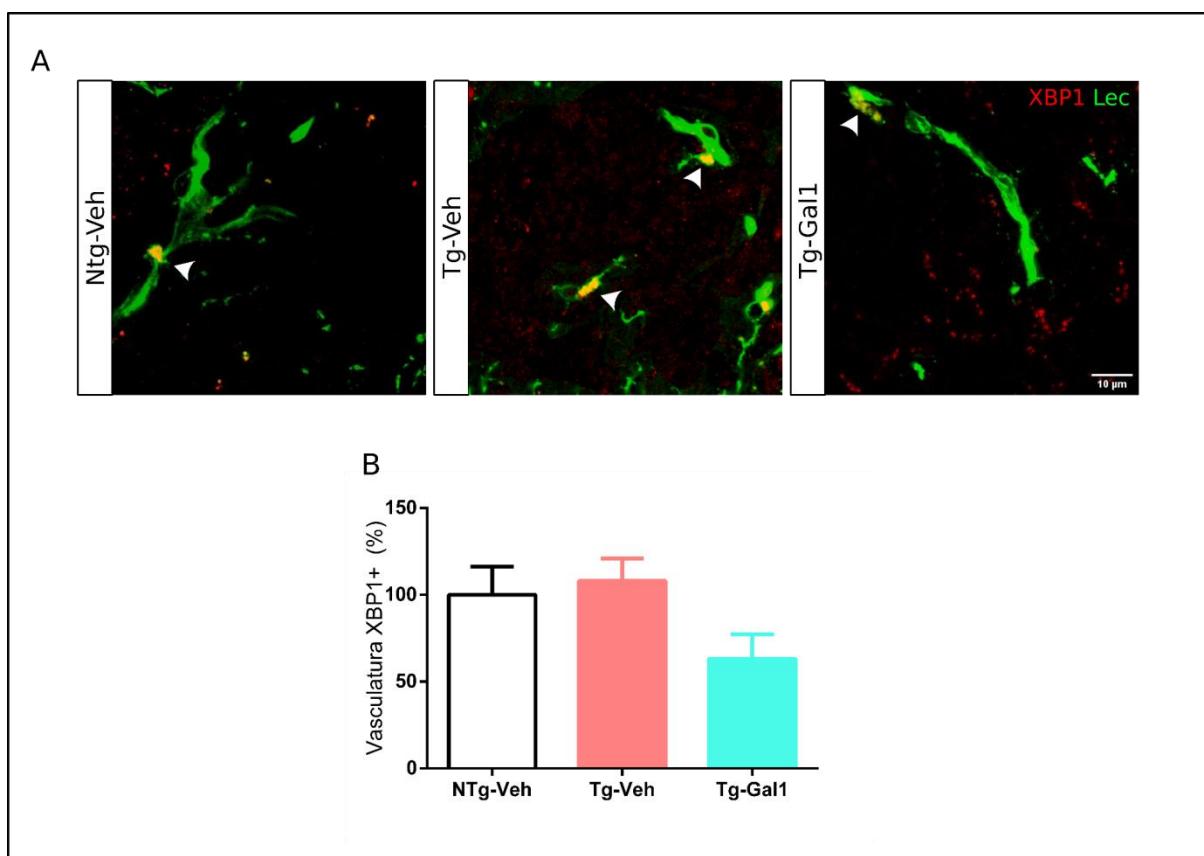


Figura 28. Presencia de la proteína XBP1 sobre la vasculatura del hipocampo en ratones PDAPPJ20 transgénicos de 12 meses (A) Imágenes representativas en cortes coronales de 60 μ m conteniendo hipocampo procesados para inmunofluorescencia contra XBP1 (rojo) acoplada a tinción con Lectina-FITC (Lec, verde). La flecha blanca indica la región de colocalización de ambas marcas. (B) Cuantificación del porcentaje de área Lectina-FITC+ que

se encuentra colocalizando con XBP1 respecto al área total Lectina-FITC+ en el hilio del giro dentado. Para todos los grupos, $n=4$. ANOVA $p=0.16$. *Tg-Veh* vs *Tg-Gal* $p=0.08$ por contraste ortogonal. Barra de escala = 10 μ m.

Parte 6.

Mecanismos de inflamación y apoptosis en células endoteliales de microvasculatura cerebral humana inducido por A β . Efecto del tratamiento con Galectina-1.

Translocación nuclear de NF κ B en HBMEC expuestas a A β . Efecto de Gal1

La interconexión entre el estrés del RE y la activación de NF κ B podría estar involucrada en la patogénesis de la EA. Estudios *in vitro* han demostrado que la exposición a células endoteliales al péptido A β 1-40 estimula la migración monocítica y aumenta la permeabilidad, efectos que dependen de la activación de NF κ B (Gonzalez-Velasquez et al. 2011).

Esta vía se induce rápidamente, por lo que se expusieron las células endoteliales a las mismas concentraciones de A β 1-40 y Gal1, aunque a tiempos más cortos, de 2 horas.

Con el objetivo de evaluar la activación de esta vía asociada a la respuesta inflamatoria, se estudió la capacidad de A β 1-40 para regular la translocación nuclear de NF κ B en células HBMEC, como también los efectos de Gal1. Para ello se realizó una inmunofluorescencia para revelar NF- κ B empleando un anticuerpo específico acoplado a la tinción con DAPI para visualizar los núcleos en células HBMEC. La Figura 32A muestra imágenes representativas de esta marcación, donde se ve que el grupo HBMEC tratado con A β 1-40 presentó marca nuclear de esta proteína, mientras que no se observó en los otros grupos.

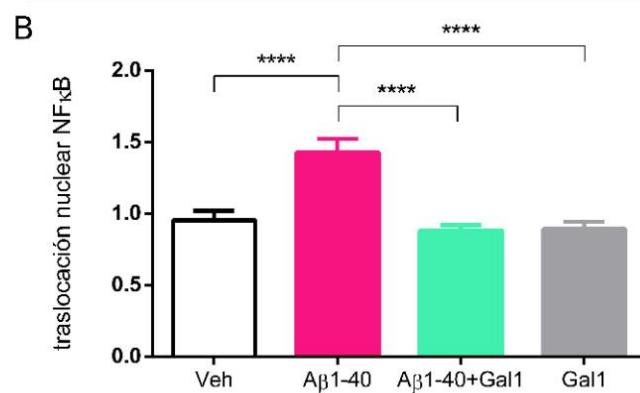
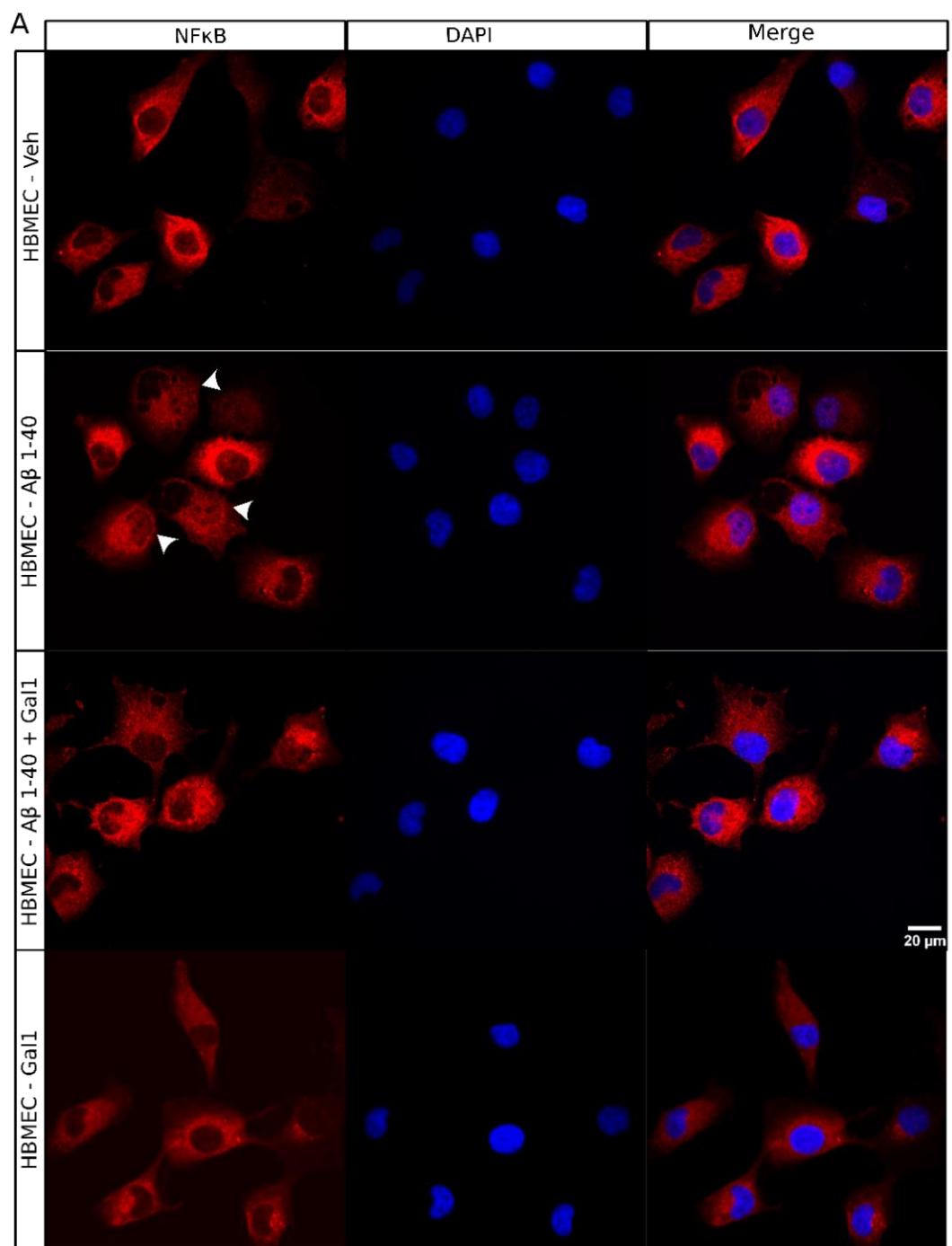


Figura 32. Gal1 disminuyó la translocación nuclear de NF κ B inducida por A β 1-40. Imágenes representativas de inmunofluorescencia para NF κ B acoplada a tinción con DAPI en HBMEC expuestas a A β 1-40, a A β 1-40 + Gal1 o Gal1. Las flechas blancas señalan la marca nuclear de NF κ B. (B) Cuantificación de la intensidad de marca NF κ B+ (mean grey value) nuclear respecto a la marca citoplasmática. Los valores se encuentran relativizados al grupo vehículo (Veh). Se cuantificó este parámetro para 30-40 células pertenecientes a muestras distintas de cada grupo experimental. Los resultados fueron consistentes en dos experimentos independientes. ***p<0.0001 ANOVA seguido de comparaciones de Tukey. Barra de escala = 20 μ m.

En efecto, se observó una marcada activación de NF- κ B en células HBMEC tratadas con A β 1-40, evidenciada por un aumento significativo en la translocación nuclear de NF- κ B en comparación con el grupo control vehículo, medido nuevamente a través de la proporción entre la densidad óptica nuclear y la citoplasmática (flechas blancas, Figura 32B). Este resultado sugiere una activación de la vía de señalización mediada por NF- κ B en respuesta al tratamiento con A β 1-40, implicando así un posible mecanismo inflamatorio en las células endoteliales durante la EA. Por su parte, el cotratamiento con Gal1 disminuyó la translocación nuclear de NF- κ B inducida por A β 1-40, indicando un efecto inhibidor de Gal1 sobre la activación de NF- κ B en células HBMEC expuestas al péptido amiloide.

Cuando las células se expusieron sólo a Gal1 no se detectó activación en las HBMEC medido por la translocación de NF- κ B, lo que es positivo ya que este factor de transcripción es un reconocido inductor de procesos inflamatorios. Adicionalmente, respalda la noción de que Gal1 atenúa la respuesta inflamatoria, y no la promueve, en células endoteliales.

Estos resultados sugieren un posible papel protector para Gal1 en la mitigación de la inflamación asociada a la EA.

Expresión del marcador de inflamasomas NLRP3 en HBMEC expuestas a A β y efecto de Gal1

Las señales consideradas de alarma que pueden activar el inflamasoma NLRP3 son muy amplias, como las especies reactivas del oxígeno, el A β y señales asociadas a daño como debris mitocondrial. A su vez, la inducción de estrés de RE es capaz de activar al inflamasoma NLRP3, principalmente, a través de XBP1. En consecuencia, se evaluaron los niveles de expresión del ARNm de NLRP3 de las células HBMEC expuestas a los distintos tratamientos.

Los niveles de ARNm en células expuestas a A β 1-40 mostraron un incremento en comparación con la condición control. Este aumento se vio contrarrestado por el tratamiento conjunto con Gal1, como se evidencia en la Figura 29, mostrando que los niveles de NLRP3 fueron significativamente menores en el grupo A β 1-40 + Gal1 en comparación con el grupo A β 1-40. Por lo tanto, los efectos de Gal1 no sólo son interesantes en cuanto a la disminución de las vías de UPR (y posible resolución del estrés de RE), sino que también se asociaron a la disminución de los niveles del ARNm de NLRP3. Este resultado también resulta auspicioso en vista que NLRP3 es un integrador de señales de daño, y que no sólo es una de las terminales de la UPR. En este sentido, este resultado podría significar un estado más saludable de las HBMEC tras el tratamiento con Gal1.

Por su parte las HBMEC expuestas solamente a Gal1 no mostraron variaciones de los niveles ARNm de NLRP3 comparado con el grupo Veh, que además resultaron significativamente menores que el grupo A β 1-40.

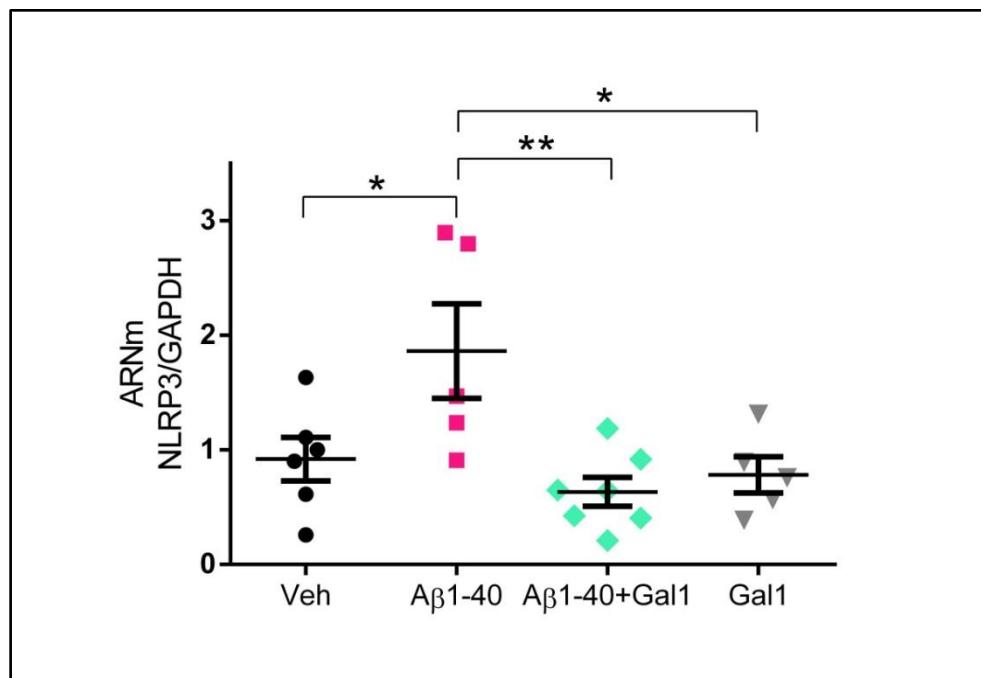


Figura 29. Galectina-1 contrarrestó el aumento del ARNm NLRP3 causado por A β 1-40 en células endoteliales de microvasculatura cerebral humana (HBMEC). Las células se expusieron a A β 1-40 (0.1 μ M) durante 24 h, Gal1 (15 μ g/ml) o ambas. Los niveles de expresión de ARNm se encuentran relativizados al tratamiento con vehículo. Los puntos corresponden a muestras individuales de tres experimentos independientes. Veh n=6, A β 1-40 n=5, A β 1-40 + Gal1 n=7, Gal1 n=5 *p<0.05, **p<0.01 ANOVA de dos vías seguido de comparaciones de Tukey

Expresión de la citoquina proinflamatoria IL1 β en HBMEC expuestas a A β y efecto de Gal1

La interleuquina-1 β (IL-1 β) es una citoquina ligada a la inflamación crónica y se encuentra asociada a la UPR maladaptativa, a las vías de activación de NF κ B, NLRP3 y muerte celular (apoptosis, piroptosis). Para estudiar esta citoquina, se exploraron los niveles del ARNm de IL1 β mediante RT-PCR y la secreción de esta proteína por ELISA sobre el medio condicionado de las HBMEC expuestas a los distintos tratamientos de A β 1-40, Gal1 o en conjunto como se realizó en los distintos experimentos in vitro.

En las condiciones estudiadas, no se observaron cambios en el nivel de expresión del mensajero de esta citoquina ante ninguno de los tratamientos (Figura 30). Cabe destacar que los niveles basales, es decir el grupo Veh, muestra niveles muy bajos de este mensajero, e incluso fueron difíciles de detectar, requiriendo una extensa puesta a punto del protocolo de RT-PCR. Los valores absolutos de expresión del grupo Veh muestran niveles 60 veces menores para IL1 β que para los niveles detectados del ARNm de NLRP3. Esto quizás explica la alta variación de los niveles de IL1 β entre las distintas muestras dentro de cada grupo experimental. Tampoco se detectaron niveles de proteína por ELISA en el medio de cultivo de las HBMEC para ningún grupo, por lo que dicho resultado no se muestra.

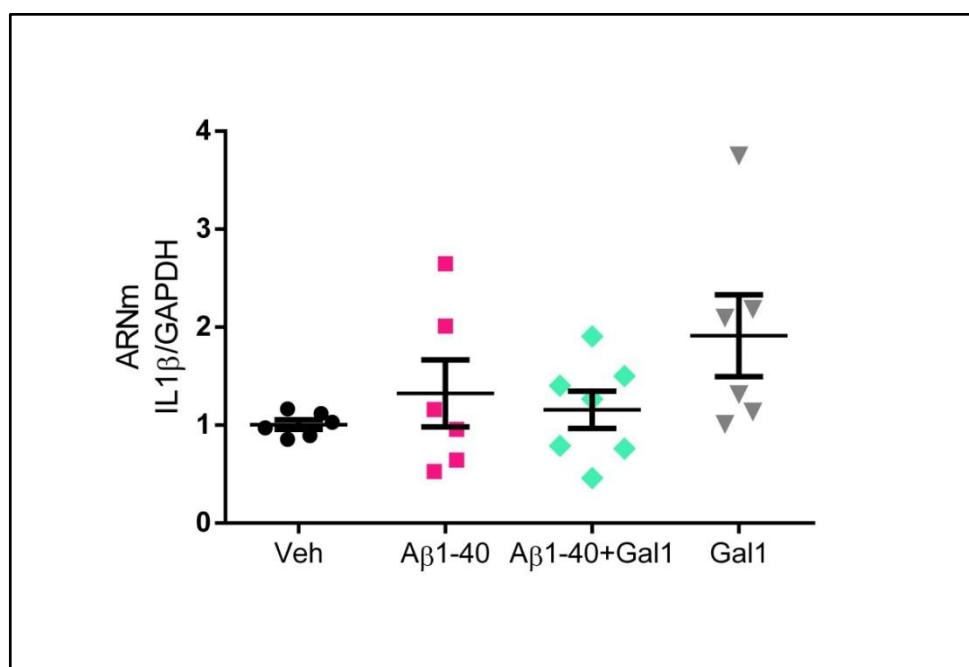


Figura 30. $\text{A}\beta$ 1-40 no causó aumentos en el ARNm $\text{IL1}\beta$ en células endoteliales de microvasculatura cerebral humana (HBMEC). Las células se expusieron a $\text{A}\beta$ 1-40 (0.1 μM) durante 24 h, Gal1 (15 $\mu\text{g/ml}$) o ambas. Los niveles de expresión de ARNm se encuentran relativizados al tratamiento con vehículo. Los puntos corresponden a muestras individuales de tres experimentos independientes. Veh $n=6$, $\text{A}\beta$ 1-40 $n=6$, $\text{A}\beta$ 1-40 + Gal1 $n=7$, Gal1 $n=6$. El análisis estadístico realizado fue el ANOVA de dos vías. Para la cuantificación se relativizaron los niveles del ARNm blanco a la expresión del gen housekeeping GAPDH de cada muestra. Detalles del protocolo de RT-PCR y el método de cuantificación se encuentran en la sección de métodos

Expresión del factor de transcripción CHOP, efector de apoptosis inducida por estrés de retículo, en HBMEC expuestas a $\text{A}\beta$ y efecto de Gal1

Cuando el sistema de UPR falla en el recobro de la proteostasis celular, se induce la transcripción de CHOP, asociado a la muerte celular. Se evaluó la expresión de este ARNm en HBMEC expuestas a los distintos tratamientos mediante RT-PCR. No se detectaron cambios en los niveles de CHOP expuestas en $\text{A}\beta$ 1-40 (Figura 31). Esto se condice con los resultados de MTT expuestos anteriormente, en los que se evaluó la viabilidad de las HBMEC, ya que no se vieron cambios tras la exposición a $\text{A}\beta$ 1-40. La no inducción de CHOP respalda la evidencia de que, tras 24 h, el péptido no causa muerte en estas células.

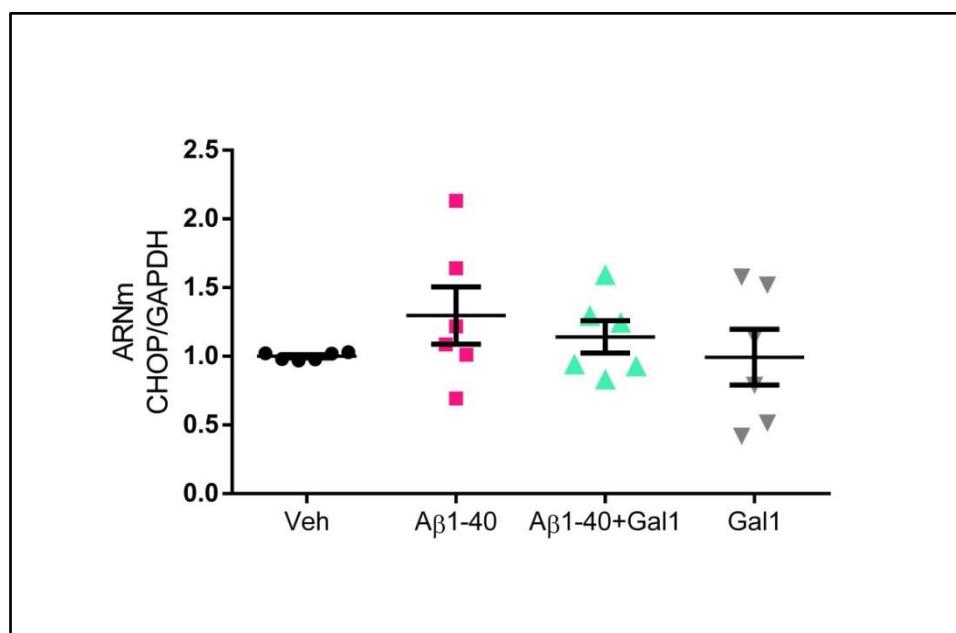


Figura 31. $\text{A}\beta$ 1-40 no causó aumentos en el ARNm CHOP en células endoteliales de microvasculatura cerebral humana (HBMEC). Las células se expusieron a $\text{A}\beta$ 1-40 (0.1 μM) durante 24h, Gal1 (15 $\mu\text{g/ml}$) o ambas. Los niveles de expresión de ARNm se encuentran relativizados al tratamiento con vehículo. Los puntos corresponden a muestras individuales de tres experimentos independientes. $n=6$ para todos los grupos. El análisis estadístico realizado fue el ANOVA de dos vías. Para la cuantificación se relativizaron los niveles del ARNm blanco a la expresión del gen housekeeping GAPDH de cada muestra. Detalles del protocolo de RT-PCR y el método de cuantificación se encuentran en la sección de métodos

Parte 7.

Análisis de transcriptómica de hipocampo completo de ratones PDAPPJ20 transgénicos y no transgénicos tratados con Galectina-1

Gal1 recuperó patrones de expresión de genesets alterados en ratones PDAPPJ20 transgénicos

Por último, se exploraron los cambios asociados a la patología en el perfil transcripcional del hipocampo de ratones de 12 meses de edad Tg-Veh, NTg-Veh y Tg-Gal1. Se realizó un análisis transcriptómico global (*bulk RNA-seq*) de muestras de ARN de todo el hipocampo ($n=3$ por grupo). Se utilizó el Análisis de Variación de Conjuntos de Genes (GSVA por *geneset variation analysis*) para estudiar los conjuntos de genes, o *genesets*, que experimentaban cambios transcriptómicos entre los grupos, a partir de la información obtenida de *Gene Ontology*. Esta ontología permite la interpretación funcional de los datos de transcriptómica, agrupando resultados de productos de genes en conjuntos de genes según procesos biológicos. Dichos conjuntos de genes representan vías o procesos celulares particulares, y su uso se encuentra curado y respaldado por múltiples trabajos que proponen estudiar cambios en los procesos celulares. Este método calcula a nivel conjunto de genes si hay cambios entre los grupos, comparados de a pares. Por ejemplo, toma un proceso celular a partir de los genes que lo componen y utiliza la información de la expresión de dichos genes en el grupo experimental NTg-Veh y los compara con el grupo Tg-Veh, obteniendo un p-valor

asociado a este contraste. Repite dicho análisis para todos los procesos y para todos los grupos experimentales, comparándolos de a pares.

Los contrastes GSVA entre los tres grupos identificaron los *genesets* con cambios de expresión significativos. En la Figura 33 se graficaron los resultados de este análisis mediante un diagrama de Venn. La Figura 33A muestra los conjuntos de genes aumentados entre las comparaciones, mientras que en la Figura 33B se muestran los conjuntos de genes disminuidos. Cada burbuja tiene asociada una leyenda del tipo “Tg-Gal1 vs NTg-Veh” siendo el primero el grupo en el cual se observan las variaciones, y el segundo es el grupo con el que se está comparando. Allí se observa la cantidad de *genesets* con diferencias entre las comparaciones, como también los *genesets* con cambios que son compartidos entre las distintas comparaciones. Se observa que es mayor el número de los conjuntos de genes que se diferencian entre los grupos Tg-Veh y NTg-Veh respecto a la comparación Tg-Gal1 vs NTg-Veh. Esto indicaría una disminución de los procesos alterados tras el tratamiento de Gal1, tanto para procesos aumentados como disminuidos. En particular de los *genesets* con una disminución en su activación, mientras que el grupo Tg-Veh presentaba 134 procesos alterados respecto al NTg-Veh, Tg-Gal1 sólo difirió de este último en 15, y ambas comparaciones sólo compartieron 1 *geneset* disminuido. También resulta interesante notar los procesos que difieren entre los animales Tg-Veh y Tg-Gal1, ya que demuestran los cambios promovidos por el tratamiento con Gal1. Allí vemos que la activación de numerosos conjuntos de genes se encuentra modificada, con 79 procesos aumentados y 142 disminuidos. La tabla de la Figura 33, si bien no permite observar los procesos que coinciden entre las comparaciones, muestra el número de *genesets* que varía entre los grupos, para una mejor interpretación.

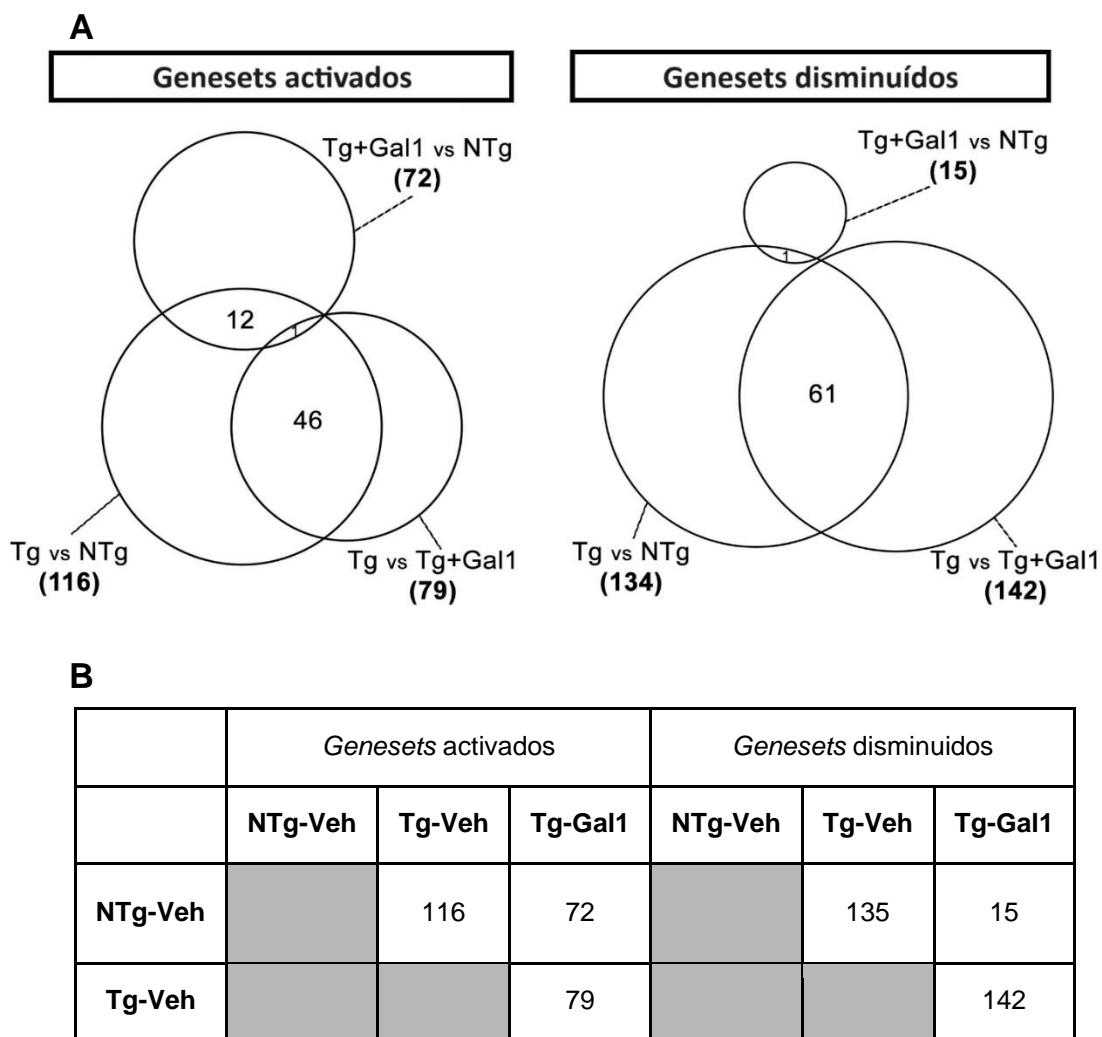


Figura 33. Gal1 modula las alteraciones del perfil transcripcional del hipocampo de ratones PDAPPJ20 de 12 meses. Diagrama de Venn mostrando el solapamiento de los conjuntos de genes (genesets) regulados positiva y negativamente (A y B respectivamente) extraídos del análisis de variación de genesets (GSVA) a partir de comparación por pares entre los tres grupos. El tamaño de los círculos se condice con la cantidad de genesets en cada grupo de contrastes. La intersección indica vías compartidas entre comparaciones, de lo contrario son únicas para ese contraste. La tabla resume las comparaciones de los procesos diferencialmente activados entre los grupos. $n=3$ para cada grupo.

En conclusión, tras comparar los conjuntos de genes positiva y negativamente regulados, se vio que los grupos NTg-Veh y Tg-Gal1 mostraron una mayor similitud en términos de la activación de la transcripción de procesos celulares específicos. Al haber recibido el tratamiento con Gal1, los animales transgénicos mostraron una menor cantidad de genesets diferencialmente expresados respecto a los NTg-Veh (Figura 33). En este sentido, la

administración de Gal1 en los ratones Tg-Veh se asoció a un desplazamiento de los patrones de expresión hacia el perfil que presentó el grupo NTg-Veh.

Para explorar más a fondo estos perfiles, se realizó un Análisis de Enriquecimiento de Conjuntos de Genes (GSEA por *geneset enrichment analysis*) para valorar el enriquecimiento de estos conjuntos de genes para cada muestra de hipocampo. GSEA genera un análisis de variación de actividad transcripcional de manera no supervisada, es decir, las muestras que se le brindan al algoritmo no son catalogadas o etiquetadas según hayan provenido de animales NTg-Veh, Tg-Veh o Tg-Gal1, permitiendo un análisis no sesgado. Por lo tanto, el análisis se realiza desconociendo a qué grupo experimental pertenece cada ratón, se ponderan todos los niveles de expresión de, en este caso, las 9 muestras para obtener valores relativos entre sí. El resultado es la asignación de una puntuación o *score* para cada conjunto de genes que va desde -1 para la menor activación hasta +1 para la activación máxima para cada proceso y para cada animal, como se muestra en la Figura 34 mediante un gradiente de color de azul a rojo.

Por lo tanto, el GSVA devolvió una lista con todos los conjuntos de genes diferencialmente activados, es decir, todos aquellos que mostraban cambios significativos. A partir de dicha lista, se identificaron y seleccionaron de manera manual aquellos involucrados con distintos procesos de interés: función neuronal, respuesta inmune, proteostasis celular y vías vasculares. También se incluyó como parte de los resultados procesos metabólicos, en particular relacionados con la función mitocondrial, ya que, aunque en principio no era un objetivo analizarlos, fue evidente la aparición de un importante número de estos procesos. Para la visualización y una mejor descripción, los *genesets* se separaron en las categorías mencionadas en distintas figuras, y los resultados para cada animal se agruparon por grupo experimental.

Activación de procesos transcripcionales neuro-cognitivos

En primer lugar, se observaron las vías celulares asociadas a la cognición y la función cerebral. Se encontró que 63 *genesets* relacionados con estas funciones presentaban diferencias significativas entre grupos. Como se describe abajo, son procesos que claramente se encuentran relacionados con el mantenimiento y funcionamiento neuronal y cognitivo. El

95% de ellos se encontraban menos activos en los ratones Tg-Veh, lo cual sugiere un claro proceso neurodegenerativo con afectación de la función neuronal asociado a la EA. Estos conjuntos de genes incluyen diversos procesos implicados en etapas del desarrollo neuronal (axones, dendritas, la diferenciación y migración de neuronas y mielinización). También se observaron alteraciones en vías de desarrollo y mantenimiento de estructuras, especialmente postsinápticas y presinápticas y expresión de proteínas, como receptores y neurotransmisores.

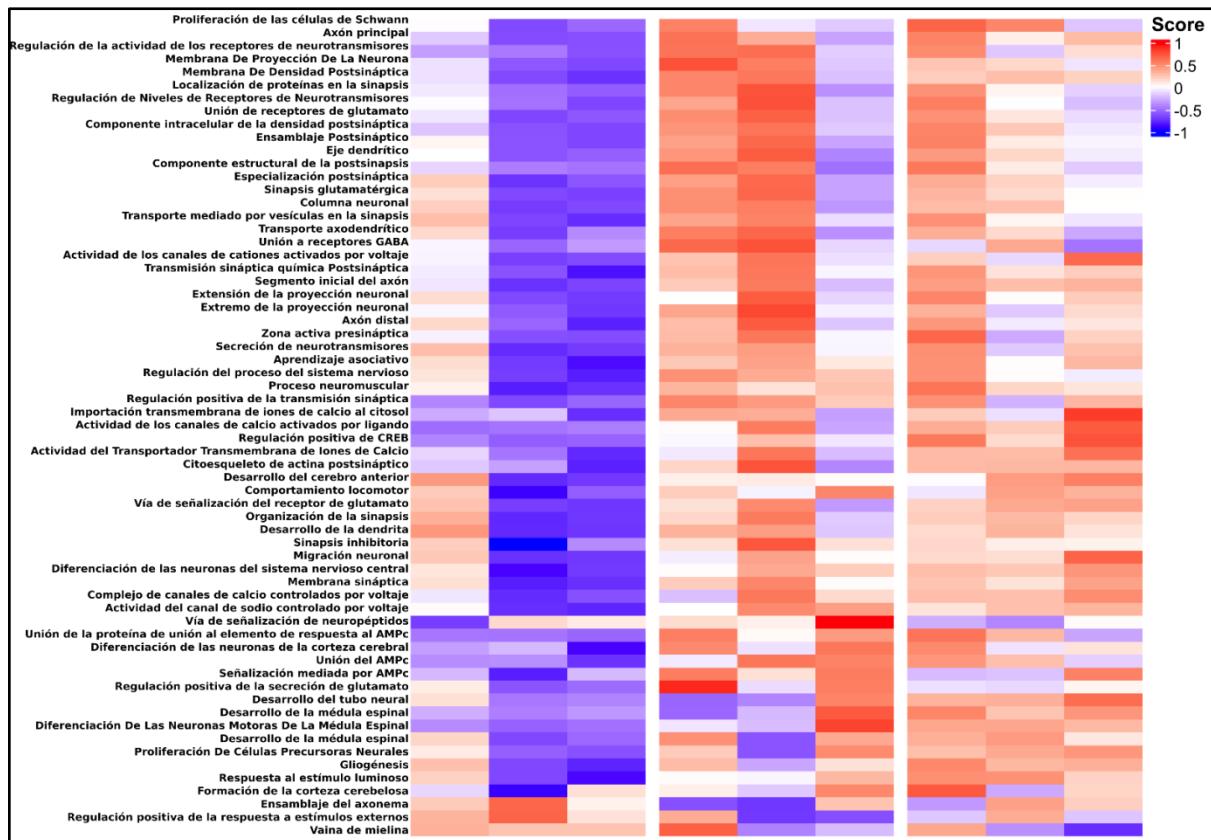


Figura 34. El tratamiento con Gal1 restaura el perfil de expresión de vías neuronales y cognitivas en ratones PDAPPJ20 de 12 meses. Se muestran los resultados del Análisis de Enriquecimiento de Conjuntos de Genes (GSEA por geneset enrichment analysis) de aquellos conjuntos de genes con diferencias significativas en el GSVA identificados como procesos de la función neuronal. GSEA calcula la variación de la actividad de manera no supervisada para todas las muestras. La desviación máxima de la puntuación de enriquecimiento del conjunto de genes con respecto a cero se indica como 1 (rojo) para el aumento y -1 (azul) para la disminución de la actividad

Cabe destacar que alrededor del 40% de estos genesets estaban relacionados con la cognición y los procesos cerebrales superiores (aprendizaje asociativo, regulación del

procesamiento del sistema nervioso, desarrollo del cerebro anterior, diferenciación de neuronas de la corteza cerebral, modulación y expresión de CREB/cAMP, señalización del calcio y de glutamato). Estos procesos se asocian al estado de la capacidad cognitiva de estos ratones, por lo que la disminución en el grupo Tg-Veh puede sugerir el involucramiento de procesos patológicos subyacentes al deterioro cognitivo observado en la EA. También se identificó una disminución de la transcripción de genes involucrados en la gliogénesis. La recuperación de los niveles de actividad de estos procesos fue evidente en los ratones del grupo Tg-Gal1. El perfil de colores permite una mejor visualización, donde se observa una gran similitud entre los ratones del grupo NTg-Veh y Tg-Gal1. A partir de estos resultados de RNAseq, podemos inferir que Gal1 se asocia con una recuperación de vías moleculares implicadas en procesos cognitivos.

Activación de procesos transcripcionales vasculares

Los procesos biológicos, moleculares y celulares correspondientes a los conjuntos de genes que mostraron diferencias significativas asociados a la función vascular se muestran en la Figura 35. Las muestras de ARN aquí presentadas corresponden a hipocampo completo. Teniendo esto en consideración, de todos modos, se han podido distinguir procesos transcripcionales alterados en el ratón modelo de EA cuya relevancia y expresión es más prominente en la vasculatura, en especial en las células endoteliales. Por eso, aunque no es posible asegurarlo, los hemos considerado como alteraciones de *genesets* relacionados de función vascular. La selección de estos *genesets* se condice con el reporte de los procesos alterados en células endoteliales de corteza prefrontal en pacientes con EA que, junto al hipocampo, es una de las zonas más afectadas por la patología (Lau et al. 2020).

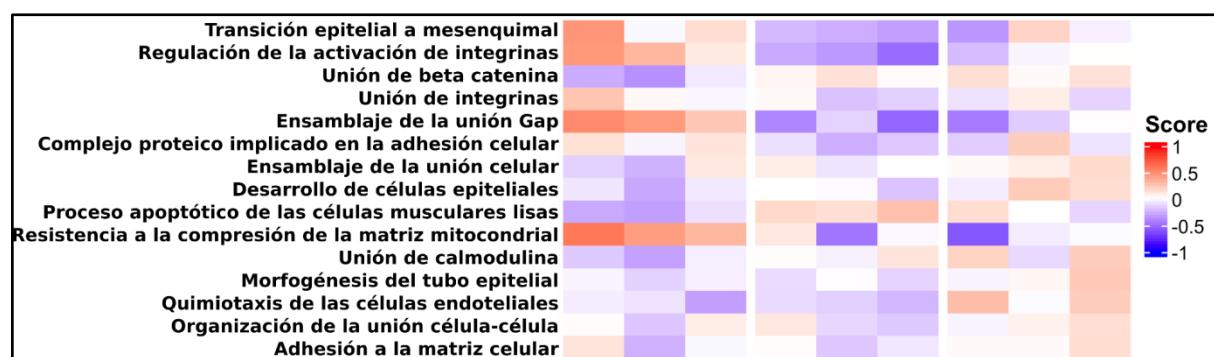


Figura 35. El tratamiento con Gal1 restaura el perfil de expresión de vías vasculares en ratones PDAPPJ20 de 12

meses. Se muestran los resultados de GSEA de aquellos conjuntos de genes con diferencias significativas en esta categoría. La desviación máxima de la puntuación de enriquecimiento del conjunto de genes con respecto a cero se indica como 1 (rojo) para el aumento y -1 (azul) para la disminución de la actividad

Resulta relevante para esta Tesis la mención en mayor detalle de los conjuntos de genes alterados asociados a la respuesta endotelial. Como evidencia de la alteración patológica del endotelio hipocampal en el modelo de EA, en el grupo Tg-Veh se encontró elevada la actividad del conjunto de genes *regulación positiva del proceso de transición de células epiteliales a mesenquimales (epithelial-to-mesenchymal transition)*. Evidentemente, la muestra de hipocampo carece de células epiteliales. Sin embargo, este proceso tiene su análogo en células endoteliales, *endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT)* (Hashimoto et al. 2023; Mehta et al. 2021). Durante este proceso, las células pierden el fenotipo polarizado que les permite la adhesión a la membrana basal y adquieren un fenotipo mesenquimal, que se caracteriza por una mayor capacidad migratoria, invasividad a los tejidos, mayor resistencia a la apoptosis y una incrementada producción de componentes de la matriz extracelular. También disminuye la expresión de proteínas de anclaje y contacto célula-célula. En este sentido, un vaso cuyas células endoteliales adquieran un fenotipo mesenquimal, presentarán mayor permeabilidad, mayor fibrosis, y pérdida de la capacidad de transporte transcelular específico.

Al contrario, este proceso no mostró aumentos de actividad en los ratones Tg-Gal1. Esto resulta de suma importancia para validar el trabajo realizado y los resultados de recuperación de fenotipo endotelial, como la permeabilidad de la barrera hematoencefálica con Gal1, tanto en el modelo *in vivo* como *in vitro*.

El conjunto de genes relacionado con la vía de *unión de B-catenina*, vía asociada con procesos patológicos de remodelación vascular, se encontró disminuido en el grupo Tg-Veh respecto tanto al grupo NTg-Veh como al Tg-Gal1. En concordancia con la alteración del fenotipo de la microvasculatura cerebral, los procesos que regulan la actividad de las integrinas presentaron mayor actividad en el grupo Tg-Veh respecto al grupo NTg-Veh. Los animales transgénicos que recibieron Gal1 tampoco evidenciaron cambios en la actividad de estos procesos.

Resulta importante destacar que el grupo Tg-Gal1 mostró un aumento significativo de la actividad del *geneset asociado al ensamblado de uniones celulares (cell junction assembly)* en comparación con el grupo Tg-Veh, lo que permite inferir que Gal1 tendría la capacidad de modular positivamente las vías que involucran la expresión de proteínas de unión estrecha, fundamentales para la integridad de la BHE.

En el grupo Tg-Veh se encontró aumentado el conjunto de genes de *matriz extracelular que otorgan resistencia a la compresión*, indicativo de posible desarrollo fibrótico, mientras que este aumento no se verificó en los grupos NTg-Veh y Tg-Gal1.

Respecto al fenotipo endotelial, se encontraron disminuidos el *ensamblaje de uniones de anclaje entre células y desarrollo de células epiteliales* solamente en los ratones Tg-Veh. El *geneset ensamblaje de uniones gap*, se vio elevado en los ratones Tg-Veh respecto del NTg-Veh, mientras que el grupo Tg-Gal1 mostró una recuperación de la expresión de esta vía.

Otro *geneset* que evidenció alteraciones en los ratones Tg-Veh fue el *complejo de proteínas involucradas en adhesión celular*, mostrando una mayor actividad en los genes que lo componen. Se ha descrito en varias oportunidades a lo largo de esta Tesis que, al haber disfunción endotelial, estas células aumentan las proteínas de adhesión que reconocen células del sistema inmune circulantes, promoviendo la infiltración de monocitos al cerebro y exacerbando la respuesta inmune. Al no mostrar aumento de la actividad de este *geneset*, los ratones Tg-Gal1 podrían tener una respuesta inmune más conservada/atenuada, tal como se ha descripto en diferentes escenarios experimentales (Toscano et al. 2011).

La calmodulina es una proteína que participa en diversas funciones, entre las que se destacan la formación de memorias, la inflamación, y la contracción de músculo liso a partir de su implicancia en la señalización mediada por Ca^{2+} . La vía de unión de calmodulina mostró niveles disminuidos en el grupo Tg-Veh respecto al Tg-Gal1, mientras que este último no se diferenció del grupo NTg-Veh. Por último, se observaron algunas variaciones entre el grupo Tg-Gal1 y NTg-Veh. En particular, en procesos de proliferación asociados con la angiogénesis (*epithelial tube morphogenesis, epithelial cell development, endothelial cell chemotaxis*).

En su conjunto, los *genesets* que presentaron cambios en su actividad en el ratón Tg-Veh respecto a la función vascular evidenciaron una alteración fenotípica que implica ciertas vías comunes con el proceso de EndMT, la fibrosis, adhesión y comunicación celular y expresión

de proteínas de uniones estrechas, entre otros. El grupo de animales Tg-Gal1 mostró una recuperación de los *genesets* relacionados con estos procesos.

Activación de vías de procesamiento y homeostasis proteica

Se identificaron procesos involucrados en la homeostasis y metabolismo de proteínas diferencialmente activados en los grupos analizados, lo que se muestra en la Figura 36. Los hipocampos de los ratones Tg-Veh presentaron un perfil indicativo de un aumento prominente de la síntesis proteica respecto a los ratones NTg-Veh. Se observó perfil de mayor actividad en diversos procesos de transcripción, traducción, y procesamiento proteico, que fueron acompañados por una disminución en los *genesets* reguladores de estas vías.

En cuanto a la transcripción, se observó una disminución en sus procesos regulatorios en comparación a los ratones NTg-Veh, incluyendo menor actividad de reguladores de unión al ADN y represores de unión a ARN, entre otros. A su vez, estos ratones presentaron alta actividad del conjunto de genes llamados *spliceosomas*, esenciales para el procesamiento de ARNm.

Respecto a la actividad traduccional, los ratones Tg-Veh mostraron elevadas las vías de expresión de ribosomas, subunidades del mismo, actividad de polisomas, actividad de unión del ribosoma, y también una mayor actividad de las vías de iniciación de la traducción.

A nivel de proteínas, se encontró alterada la actividad del procesamiento proteico, como una alta actividad en el proceso de plegado de proteínas y disminución de procesos relacionados a la red de trans-Golgi.

Los procesos de degradación también presentaron diferencias entre el Tg-Veh y NTg-Veh. Se detectó la disminución del *geneset* que agrupa genes ligados a la ubiquitinación de proteínas, y también el aumento de expresión del complejo proteasoma, que podría comprender un mecanismo celular compensatorio. El *geneset* membrana de endosoma tardío de suma relevancia en el proceso de autofagia y transporte celular, también se vio alterado.

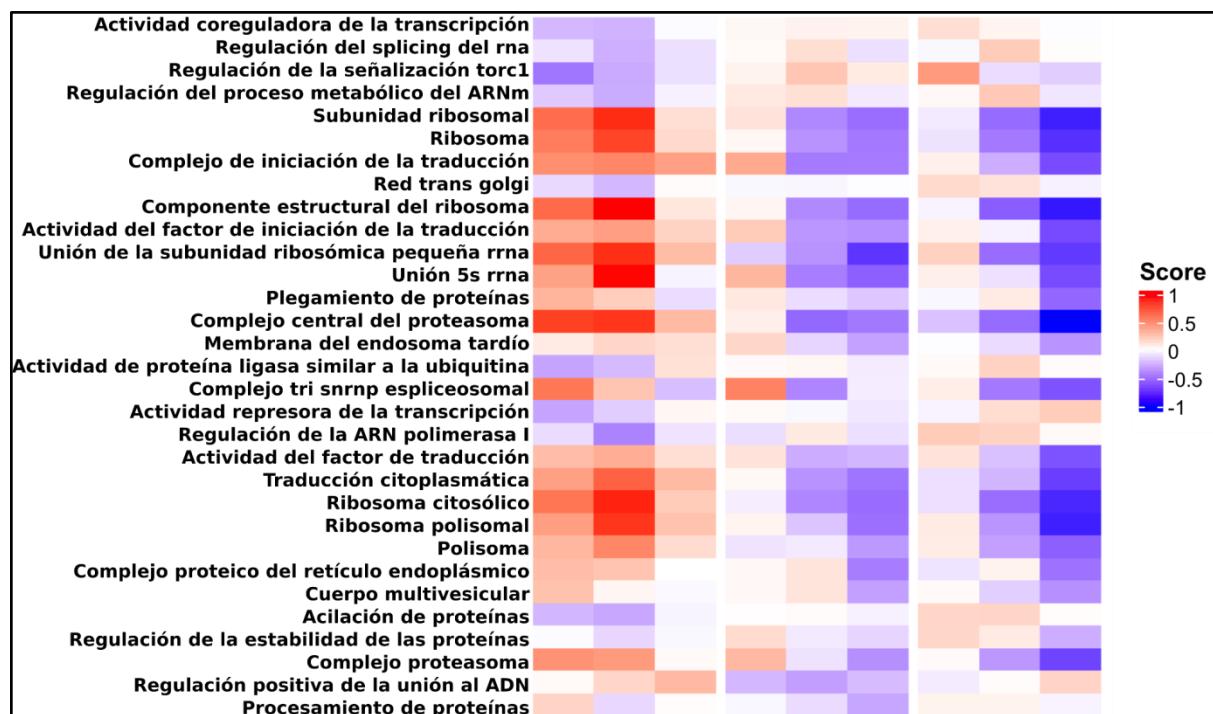


Figura 36. El tratamiento con Gal1 restaura el perfil de expresión de vías de proteostasis en ratones PDAPPJ20 de 12 meses. Se muestran los resultados de GSEA de aquellos conjuntos de genes con diferencias significativas en esta categoría. La desviación máxima de la puntuación de enriquecimiento del conjunto de genes con respecto a cero se indica como 1 (rojo) para el aumento y -1 (azul) para la disminución de la actividad

Por otro lado, los animales Tg-Gal1 mostraron perfiles de expresión similares a los NTg-Veh. Este fenómeno respalda la hipótesis de que Gal1 colabora con la recuperación de la homeostasis proteica en las células.

Es relevante notar que el *geneset de transporte lisosomal* se mostró con actividad aumentada en los Tg-Gal1 respecto al Tg-Veh. A su vez, el *geneset estabilidad proteica*, que podría indicar el mantenimiento de la proteostasis, presentó una mayor actividad también en el grupo Tg-Gal1.

Activación de procesos transcripcionales de respuesta inmune

La Figura 37 muestra los resultados del GSEA de 19 *genesets* relacionados con la respuesta inmunológica diferencialmente regulados en el GSVA. En general, los ratones transgénicos mostraron alta actividad en procesos inmunes, muchos de los cuales tienen un carácter proinflamatorio.

Entre los procesos aumentados en el grupo Tg-Veh se encontraron: expresión de citoquinas proinflamatorias (IFN- γ , IL-1 β , TGF- β), vías relacionadas con el complemento (activación del complemento) y respuesta inmune humoral. Las vías de proliferación y activación de las células inmunitarias representaron el 25% del aumento de expresión de los *genesets*, incluyendo procesos de actividad, proliferación y/o diferenciación de células mieloides y células T. También aumentaron otras vías de respuesta inmunitaria, como el procesamiento y la presentación de antígenos y la lisis celular, entre otras.

La alta actividad de estos conjuntos de genes en el grupo Tg-Veh resultó muy marcada, contrastando con una baja expresión de estas vías tanto en los ratones NTg-Veh como en los ratones Tg-Gal1. Este último, presentó un patrón mucho más similar al grupo NTg-Veh, lo que sugiere que el tratamiento con Gal1 actuó como modulador de la respuesta inmune y restauró la expresión de numerosos *genesets*.

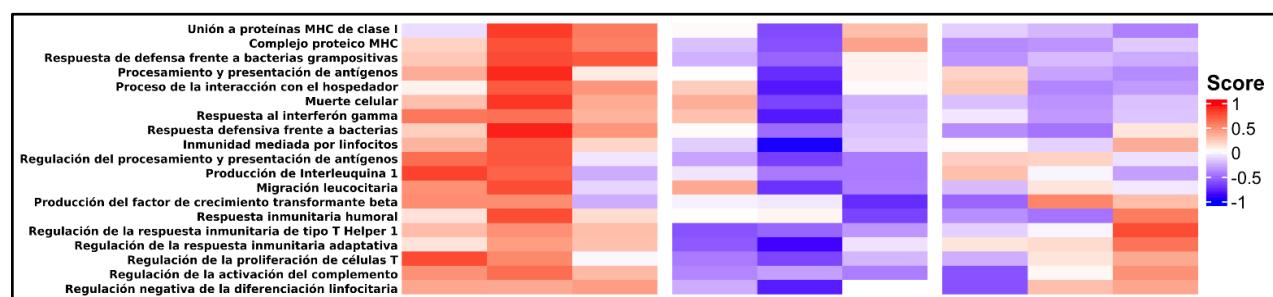


Figura 37. El tratamiento con Gal1 restaura el perfil de expresión relacionado con la respuesta inmune en ratones PDAPPJ20 de 12 meses. Se muestran los resultados de GSEA de aquellos conjuntos de genes con diferencias significativas en esta categoría. La desviación máxima de la puntuación de enriquecimiento del conjunto de genes con respecto a cero se indica como 1 (rojo) para el aumento y -1 (azul) para la disminución de la actividad.

Activación de procesos transcripcionales metabólicos

Por último, se identificaron *genesets* relacionados con el metabolismo/función mitocondrial. La expresión de la mayoría de estos conjuntos de genes fue pronunciadamente mayor en Tg-Veh frente a los otros grupos, que se observan en la Figura 38. Los *genesets* elevados en estos ratones evidenciaron una fuerte presencia de procesos característicos de la función mitocondrial, el estado redox, y procesos metabólicos generales. Se vio una actividad aumentada de los *genesets* de función mitocondrial, incluyendo el ensamblaje de complejos de la cadena respiratoria mitocondrial, la síntesis de ATP y la organización mitocondrial. Los

cambios relacionados con la respiración celular (respiración aeróbica, cadena respiratoria mitocondrial, fosforilación oxidativa, actividad de transferencia de electrones y más) representan el 30% de esta categoría. Además, también se observó el aumento en la actividad de procesos de organización y proteínas mitocondriales en el grupo Tg-Veh. En otro aspecto, se observó una mayor activación de los conjuntos de genes involucrados en la actividad antioxidante en los ratones Tg-Veh. Estos procesos involucrados se vieron relacionados con la actividad oxidoreductasa, el metabolismo del peróxido de hidrógeno, actividad del enzima glutatión peroxidasa y la detoxificación, lo que sugiere una respuesta elevada a estos procesos. Los conjuntos de genes vinculados al funcionamiento metabólico mostraron actividad similar entre los animales Tg-Gal1 y NTg-Veh, evidenciando efectos del tratamiento sobre los mecanismos moleculares subyacentes a la patología.

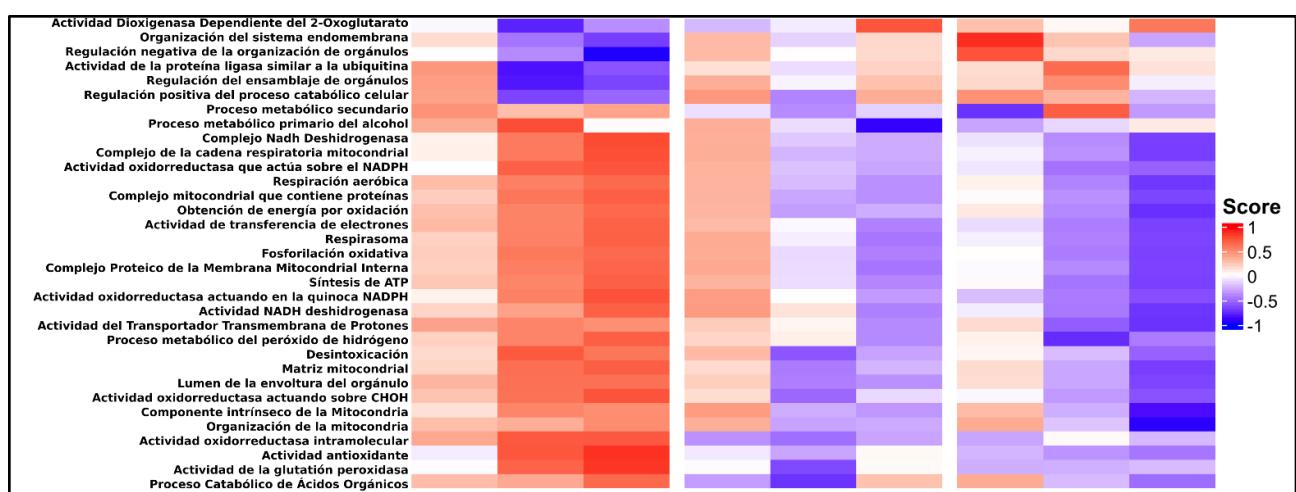


Figura 38. El tratamiento con Gal1 restaura el perfil de expresión de vías metabólicas en ratones PDAPPJ20 de 12 meses. Se muestran los resultados de GSEA de aquellos conjuntos de genes con diferencias significativas en esta categoría. La desviación máxima de la puntuación de enriquecimiento del conjunto de genes con respecto a cero se indica como 1 (rojo) para el aumento y -1 (azul) para la disminución de la actividad.

Discusión

1. Gal1 mejoró la función cognitiva y neuronal en ratones PDAPPJ20

Los pacientes que padecen la EA suelen experimentar déficits en la memoria espacial, en particular en la formación de nuevas memorias, las cuales son dependientes del hipocampo. El primer resultado presentado en esta Tesis es de especial importancia, ya que evalúa el aspecto cognitivo en dos pruebas específicas -en grupos experimentales separados- tras el tratamiento con Gal1. A partir de los resultados en pruebas comportamentales, se logró evidenciar una mejora de la memoria espacial a corto y mediano plazo en el grupo Tg-Gal1. Específicamente, en la prueba de NOL, se observó que los ratones tratados con Gal1 mostraron una preferencia significativa por el objeto relocalizado en comparación con los ratones no tratados con Gal1, lo que indica una restauración de la capacidad de reconocimiento espacial de los objetos. Además, en la prueba del laberinto en Y, mientras que los ratones Tg-Veh tuvieron un desempeño deficiente, los ratones tratados con Gal1 mostraron un tiempo de exploración en el brazo novedoso similar al grupo control, lo que sugiere una recuperación en la capacidad de realizar esta tarea. El laberinto en Y es una tarea, en comparación con el NOL, donde la arena se encuentra dividida en compartimentos y no hay objetos visibles atractivos para el ratón como el NOL, donde realiza una tarea activa de selección de objeto. Por lo tanto, estas tareas implican diferentes procesos de memoria espacial y, por lo tanto, resulta valioso obtener una mejora en ambos parámetros. En conjunto, estas pruebas permiten sugerir una recuperación en la capacidad de formar nuevas memorias espaciales en los ratones Tg-Gal1.

El análisis de RNAseq reveló la disminución de la actividad en diversas vías relacionadas al desarrollo neuronal, la función cognitiva y la gliogénesis en los ratones Tg-Veh en comparación con los ratones NTg-Veh. En este sentido, el análisis de procesos transcriptómicos del hipocampo respalda las pruebas conductuales, donde los ratones Tg-Veh muestran un bajo desempeño en pruebas de memoria espacial. La recuperación de los niveles de actividad de estos procesos se observó en los ratones Tg-Gal1, sugiriendo una asociación entre Gal1 y la recuperación de vías moleculares implicadas en procesos cognitivos. En particular, se observó una disminución en la expresión de genes relacionados con el desarrollo, funcionamiento neuronal y cognitivo en los ratones Tg-Veh en comparación

con los ratones Tg-Gal1 y NTg-Veh. Aquellos ratones transgénicos que recibieron Gal1 mostraron recuperación de conjuntos de genes asociados a procesos cognitivos, función neuronal, y mecanismos moleculares relacionados a la formación de memorias y el aprendizaje asociativo, incluyendo la formación de espinas neuronales y la diferenciación tanto neuronal como de sus precursores. Este fenómeno se acompañó de vías relacionadas con estructuras de comunicación neuronal como estructuras sinápticas y el aumento de neurotransmisores, neuropéptidos y canales de voltaje.

La memoria espacial y el efecto positivo del tratamiento con Gal1 no habían sido previamente estudiados. Sin embargo, hay antecedentes que sugieren un rol neuroprotector para esta proteína (Mendez-Huergo et al. 2014; Rabinovich y Croci 2012; Starosom et al. 2012). En la encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), modelo de esclerosis múltiple, Gal1 indujo un fenotipo de microglia M2 deactivado y fue capaz de promover la diferenciación de oligodendrocitos y la remielinización axonal (Starosom et al. 2012). A su vez, Quintá y colaboradores demostraron en un modelo murino de daño a la médula espinal que la administración local de Gal1 promueve la regeneración axonal a través de la regulación de las uniones entre neuropilina-1 (NRP-1) y semaforina. Dicho trabajo describió que Gal1 es capaz de disminuir el estado oxidativo del microambiente y promover la repolimerización de F-actina en el cono axonal, lo que contribuiría a la recuperación neuronal (Quintá et al. 2014). En el modelo de desmielinización murino por inyección de lisolecitina, la administración de Gal1 se asoció a la proliferación de oligodendrocitos maduros, colaborando en el proceso de remielinización (Rinaldi et al. 2016). Ambos modelos también describieron la deactivación microglial, contribuyendo a la inducción del fenotipo M2, asociado con la neuroprotección.

En concordancia con la bibliografía, dentro de las vías significativamente restauradas según el análisis transcriptómico realizado en esta Tesis, se encontraron procesos relacionados con el aumento de la mielinización neuronal (*proliferación de células de Schwann, envoltura de neuronas, vaina de mielina*). A su vez, el incremento de la vía de *gliogénesis* podría encontrarse relacionado con la proliferación de precursores neuronales, que dan linaje tanto a nuevas neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, encargados de la producción de mielina en el SNC. El análisis realizado también evidenció la regeneración axonal involucrando diversos procesos, como el incremento de la actividad de los conjuntos de genes de proyecciones neuronales, desarrollo de dendritas, transporte axón-dendrita, entre otros. En este sentido,

recientemente en un modelo de enfermedad de Parkinson, también se observaron efectos positivos luego del tratamiento con Gal1 en la prevención de la neurodegeneración de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra, acompañado por la modulación del fenotipo microglial (Y. Li et al. 2020).

Si bien en esta categoría de conjuntos de genes agrupamos todos los observados con la función neuronal, no es posible discernir en qué tipos celulares suceden dichas variaciones de actividad transcripcional. Por ejemplo, respecto a la estructura y función neuronal, se observan cambios en las estructuras especialmente postsinápticas y presinápticas, expresión de receptores y neurotransmisores, y mielinización. En este sentido, el trabajo de Lau y colaboradores estudió mediante la secuenciación de ARN de núcleos únicos, 169.496 células de muestras corticales prefrontales de pacientes con EA y controles sanos. Esta investigación permitió conocer los cambios de expresión de vías y genes específicos para cada tipo celular, relacionados a la patología de la EA. Allí revelaron que los mayores cambios observados respondieron a cuatro vías moleculares: angiogénesis en células endoteliales, respuesta inmune en células endoteliales y microglía, mielinización en oligodendrocitos y señalización sináptica en astrocitos y neuronas. Comparar lo obtenido aquí con estos resultados es sumamente interesante. En principio, en neuronas, se destacaron la alteración de vías asociadas con la organización neuronal, como la organización y adhesión sinápticas y desarrollo axonal. En los datos obtenidos en esta Tesis, se observaron alteraciones similares en el ensamblaje sináptico y formación axonal en los ratones Tg-Veh, que fueron restaurados por el tratamiento de Gal1.

Otros de los *genesets* destacados en estos ratones, como la disminución de la actividad de regulación de neurotransmisores, señalización sináptica y distintos procesos del metabolismo del glutamato (receptores, regulación de la secreción), coincidieron con los reportados por Lau et al. Allí mostraron que dichos procesos se encontraron desregulados en astrocitos. La pérdida de homeostasis astrocítica resulta neurotóxica e impacta en la función sináptica y neuronal (Verkhratsky et al. 2023). En efecto, la alteración del reciclaje de neurotransmisores, especialmente el glutamato, provoca excitotoxicidad y conduce a la muerte neuronal (Hynd, Scott, y Dodd 2004), por lo que la alteración de estos procesos identificados tanto en esta Tesis como en la bibliografía podrían contribuir a la neurodegeneración.

También los resultados de este trabajo coinciden con la disminución de procesos de mielinización que, como se mencionaron, fueron detectados en la población de oligodendrocitos.

El análisis en los ratones Tg-Veh también mostró disminución en la señalización de Ca^{2+} en comparación con el grupo NTg-Veh, y que se vio normalizado en los ratones tratados con Gal1. Recientemente, un meta-análisis que incluyó datos de secuenciación de célula única de 6 publicaciones independientes de distintas regiones de la corteza de pacientes con EA, observó alteración en genes implicados en la señalización de Ca^{2+} en astrocitos (Bouland et al. 2023). La disminución de la respuesta señales de Ca^{2+} en este tipo celular se ha observado en un modelo murino de la EA transgénico de APP, y se considera un mecanismo que podría impactar negativamente sobre el metabolismo neuronal, especialmente contribuyendo al desacoplamiento neurovascular durante la locomoción y la respuesta emocional a la sorpresa (Åbjørsbråten et al. 2022). El meta-análisis mencionado, realizó un estudio de la conexión de los cambios transcripcionales, estudiando cómo se interrelacionan los genes regulados diferencialmente en los distintos tipos celulares. Es interesante remarcar que dicho estudio determinó que los cambios transcripcionales se encontraban coordinados entre los distintos componentes de la UNV. En particular, el análisis de conexión entre genes sugirió que los cambios de expresión en neuronas se encontraban inducidos por procesos gliales (Bouland et al. 2023). Este análisis apoya la naturaleza multicausal de la EA, donde la comunicación celular es un componente crítico del proceso patogénico.

Por lo tanto, los datos que aquí se presentaron son respaldados con la bibliografía disponible, ya que los procesos destacados que engloban la función neuronal son los mismos. Esto también añade evidencia para el empleo del ratón PDAPPJ20 como un buen modelo para estudiar la EA. Es sumamente promisorio que el tratamiento con Gal1 haya logrado la recomposición de los niveles de numerosos procesos neuronales alterados en los ratones Tg-Veh que también, según la bibliografía, son deficientes en pacientes con EA.

Por último, otro aspecto observado puede estar relacionado con la neurodegeneración en la EA. Como se discutirá más adelante, la pérdida de integridad de la BHE que se observa en pacientes se relaciona con la infiltración de linfocitos T CD8+ citotóxicos, que exacerban la respuesta inflamatoria generando muerte neuronal. Estas células son blanco de Gal1, que

induce su apoptosis, lo que podría contribuir a disminuir el tono inflamatorio de la EA mediante este mecanismo y ejercer de este modo un rol neuroprotector (Mariño et al; 2023).

Además, el RNAseq aportó evidencia novedosa de que los ratones Tg-Gal1 mostraron niveles elevados de actividad en las vías asociadas a la cognición y procesos cerebrales superiores, lo que indica una mejora en la capacidad cognitiva de estos ratones. Este efecto apoya la acción moduladora de Gal1 sobre el comportamiento y memoria espacial de ratones con EA. De esta manera, los resultados de esta Tesis añaden evidencia de los beneficios del tratamiento de Gal1 en patologías del SNC.

En resumen, los resultados de las pruebas comportamentales y los análisis de RNAseq proporcionan una visión complementaria de los efectos del tratamiento con Gal1 en la función cerebral y la cognición en ratones con EA. Se puede inferir un estado de deterioro neurocognitivo en los ratones con EA, caracterizado por una reducción en la actividad de vías moleculares críticas para la función neuronal y que, además, Gal1 estaría participando en la recuperación de los procesos subyacentes a la neurodegeneración. Estos hallazgos aportan evidencia del impacto beneficioso del tratamiento con Gal1, mejorando significativamente el rendimiento cognitivo en ratones transgénicos de 12 meses y sugiriendo un efecto positivo sobre la función y los procesos neuronales en el hipocampo, una región clave para la formación de memorias espaciales.

2. Gal1 disminuyó el A_β parenquimático y el A_β vascular en el hipocampo de ratones PDAPPJ20

El A_β resulta tóxico y proinflamatorio para la mayoría de los componentes de la UNV, lo que induce estrés oxidativo, neuroinflamación, neurodegeneración y déficit cognitivos. Por ello, la eliminación del péptido es el foco de muchas terapias en desarrollo y la acción de un agente terapéutico que impida su formación o reduzca la carga podría contribuir a detener el progreso de la patología.

En este trabajo, la carga de amiloide en el hipocampo se determinó en secciones cerebrales de ratones Tg-Veh y Tg-Gal1 mediante tinción con rojo Congo. Antecedentes de nuestro

grupo constataron que dicha tinción resulta específica para los depósitos de A β , mediante la realización de una inmunohistoquímica empleando el anticuerpo 4G8, que reconoce los residuos 18-23 de A β y de APP, en secciones continuas de cortes coronales de ratón y comparando las marcas. Según lo estudiado, las secciones teñidas con rojo Congo proporcionan una mayor relación señal específica/fondo que la inmunohistoquímica en las placas amiloïdes, lo que fundamenta su uso para estudiar este parámetro (Beauquis et al. 2013). Mediante esta técnica, se observó una disminución significativa en la carga amiloïde en los ratones transgénicos tratados con Gal1, lo que sugiere un efecto protector de Gal1 contra la acumulación de placas amiloïdes en esta región crucial para la memoria. De manera promisoria, Gal1 podría tener un efecto modulador sobre la patología amiloïde en la EA y la progresión de la enfermedad. Además, se determinó que las placas pequeñas (aquellas con un área menor a 50 μm^2) aportaron mayoritariamente a esta diferencia, mientras que el tratamiento mostró menor efectividad en placas de mayor tamaño. Esto sugiere un posible mecanismo de acción de Gal1 asociado a la eliminación de oligómeros solubles y/o prototibrillas de A β en pequeños depósitos. Las dos vías principales para la eliminación de A β son, como se mencionó previamente, su salida a través de los compartimentos del sistema vascular (en especial la BHE) y, en segundo lugar, la degradación mediada por microglía.

En los últimos años, los tratamientos modificadores de la EA se han centrado principalmente en la inmunización pasiva con anticuerpos anti-A β , que buscan facilitar la eliminación de depósitos a través de la formación de complejos inmunes de anticuerpos con el A β . La hipótesis general es que estos complejos dirigen la respuesta inmune e incrementen la degradación estimulando la secreción de enzimas metaloproteasas y la fagocitosis del péptido. El entusiasmo por estas inmunoterapias se ve obstaculizado por varios eventos adversos, muchas veces severos, como las anormalidades en imágenes relacionadas con el amiloide (ARIA), mencionadas en la introducción de esta tesis, observadas en varios ensayos clínicos (Taylor et al. 2023).

En un estudio dentro del marco del proyecto, nuestro laboratorio ahondó en los efectos de Gal1 sobre la microglía, involucrada en eliminación de depósitos en el parénquima, en resultados que no se muestran en esta Tesis y que, sin embargo, son relevantes en la discusión de este trabajo. Los resultados sugerirían una deactivación de la microglía hacia un fenotipo alternativo menos reactivo con recuperación de las capacidades homeostáticas.

Como punto importante, observamos que la capacidad de fagocitar específicamente A β 1-42 se vio positivamente modulada por Gal1 a través de mecanismos que involucran el reconocimiento de glicanos por parte de esta lectina. El efecto de Gal1 sobre la microglía podría explicar parte de la disminución de la carga amiloide y de la actividad de vías inflamatorias en el hipocampo que evidencia el RNAseq. Si bien dichos resultados no son mostrados aquí, la importancia de estos es clave para abordar los efectos del tratamiento con Gal1 sobre los animales transgénicos para la EA.

Por otro lado, no se puede ignorar que la mayoría del A β producido se encuentra en estado soluble y es eliminado a través de la vasculatura mediante la BHE. El estado funcional y estructural de la vasculatura tiene un efecto directo sobre la eliminación y formación de depósitos de A β .

En particular, ya que se ha demostrado que la presencia de depósitos amiloideos sobre la vasculatura generan disfunción sobre los sistemas de eliminación perivasculares (Kim et al. 2020), algunos trabajos apuntaron a estimular la vasculatura con el fin de mejorar la eliminación del péptido amiloide. En modelos animales de EA, se ha demostrado que la terapia lumínica de láser a baja intensidad estimula el movimiento de fluidos por el sistema glinfático y aumenta la eliminación del A β (Semyachkina-Glushkovskaya et al. 2021; Grillo et al. 2013). Sin embargo, la estimulación láser tiene una limitación en cuanto a las zonas que se puede estimular de manera transcraneal, requiriendo estimulación invasiva para las zonas más internas a la corteza, lo que dificulta su potencial terapéutico en humanos (Salehpour et al. 2018).

Teniendo en cuenta la importancia de reducir la carga amiloide como una estrategia terapéutica potencial para la EA, la administración de Gal1 se presenta como una intervención prometedora de este aspecto de la patología.

Los resultados de la segunda parte de este estudio revelan que el tratamiento con Gal1 tiene un impacto significativo en las alteraciones vasculares en el hilio del hipocampo de ratones PDAPPJ20, modelo de EA. Nuestros resultados contribuyen a una nueva perspectiva sobre el posible papel de esta proteína en la patología.

Las especies de A β presentes en el cerebro de pacientes y de modelos experimentales tienen distintas propiedades biofísicas y bioquímicas. Esto les otorga a las variantes del péptido

distintas solubilidades y dinámicas de agregación, lo que puede influenciar en sus efectos patofisiológicos.

Los resultados de esta Tesis muestran una clara reducción de los depósitos sobre la vasculatura en animales transgénicos en un estadio avanzado de la patología tratados con Gal1. A partir del análisis de colocalización de las marcas de A β y el endotelio en los cortes de cerebro, se pudo observar que tanto el área de los vasos cubierta por A β , como el número de segmentos vasculares con A β se redujeron en el grupo Tg-Gal1 en comparación al grupo Tg-Veh. Esto sugiere una capacidad de Gal1 para regular la acumulación de A β en los vasos sanguíneos.

Una gran parte del A β se acumula en la membrana basal de células endoteliales y células murales en capilares y arterias. Esto lleva a una alteración morfológica en la membrana basal periarterial, a la pérdida de VSMCs y al aumento de la pulsatilidad vascular, es decir, la actividad vasomotora tónica, exacerbando la disrupción en el intercambio de fluidos y la progresión de la patología amiloide. En este sentido, las graves alteraciones del sistema perivascular en ratones transgénicos con EA comprometen la eliminación de A β (Kim et al. 2020). Por otro lado, en estudio reciente mostró que en el cerebro de pacientes con EA, las células vasculares presentan niveles más bajos de la glicoproteína P y la neprilisina, las cuales participan en la eliminación de A β (Solis, Hascup, y Hascup 2020).

A su vez, se ha vinculado la deposición amiloide vascular con el desarrollo de microhemorragias o edemas que se visualizan por técnicas de imágenes (anormalidades en imágenes relacionadas al amiloide, o ARIA) en pacientes que recibieron inmunoterapias anti-A β . Aunque estos tratamientos lograron reducir los niveles totales de A β , su administración también provoca una notable respuesta inflamatoria, intensifica la permeabilidad vascular, compromete la integridad vascular y desencadena la aparición de microhemorragias o edemas en modelos de ratones y pacientes con EA. Un trabajo reciente ha descrito un posible mecanismo para ARIA: los anticuerpos forman complejos insolubles con el A β de localización vascular causando un aumento de la extravasación de proteínas plasmáticas y microhemorragias en ratones PDAPP (Taylor et al. 2023). A su vez, se ha asociado a la activación sostenida de los macrófagos perivasculares con la disfunción neurovascular inducida por estas terapias.

Nueva evidencia publicada por Kim y colaboradores demuestra que uno de los mecanismos por los que el amiloide lleva al aumento de la permeabilidad de la BHE es mediante la perforación de la membrana basal endotelial/mural donde se acumula el péptido. Dicho trabajo también detectó que la alteración de la integridad de la membrana basal permite que la proteína A β entre en el compartimiento cerebral y se acumule también fuera de la membrana basal (Gireud-Goss et al. 2021). En este sentido, la angiopatía cerebral amiloide es un componente importante de la EA, relacionado con el daño vascular, la activación endotelial, el daño a la BHE, la infiltración de monocitos y la neuroinflamación, factores que contribuyen al déficit cognitivo y al progreso de la patología.

En definitiva, los resultados obtenidos sugieren la capacidad de Gal1 para regular la acumulación de A β en los vasos sanguíneos, lo que podría impactar sobre la progresión de la EA. Los procesos que podrían estar siendo modulados son diversos, incluyendo el mantenimiento de la estructura y función vasculares y mecanismos de eliminación del A β , como la eliminación del péptido por otras vías.

Al reducir los depósitos vasculares de A β , Gal1 podría contribuir modulando la BHE y previniendo la pérdida de su integridad, mediante efectos sobre la restauración del fenotipo endotelial y la integridad de membrana basal, evitando la infiltración de monocitos y mejorando la eliminación de A β . Además, la función vascular depende de múltiples componentes de la UNV, por lo que Gal1 potencialmente podría modular más de un tipo celular.

3. Gal1 moduló la respuesta inflamatoria y metabólica en la EA experimental

La evidencia muestra que la neuroinflamación, tanto en pacientes como en modelos animales, contribuye a la patogénesis de la EA (W. Zhang et al. 2023; F. Zhang y Jiang 2015). La EA se asocia a una desregulación metabólica, aumento del estrés oxidativo y la reactividad glial (Ajoobady et al. 2022). Además, la acumulación de proteínas amiloides tóxicas durante la

patología también gatilla procesos inflamatorios que eventualmente llevan a la neurodegeneración (Fang et al. 2015).

La reactividad de los astrocitos es una característica temprana de la EA. La primera observación de numerosas células gliales reactivas rodeando las placas de A β , descrita por Alois Alzheimer, no fue tenida en cuenta durante décadas (Fakhoury 2018). Hoy en día, múltiples evidencias han descrito astrocitos reactivos en regiones afectadas por A β o tau en tejido cerebral *post mortem* de pacientes con EA (Smit et al. 2021; Carter et al. 2019). En ratones modelo de la EA, la bibliografía describe un aumento de GFAP en astrocitos del parénquima cerebral, mientras que los pies astrocíticos que contactan la vasculatura muestran degeneración y pérdida de la inmunoreactividad para la proteína GFAP en estas terminales (Wilcock, Vitek, y Colton 2009). En condiciones patológicas, los astrocitos experimentan alteraciones funcionales y morfológicas, como el ensanchamiento del soma y sus proyecciones. En humanos, se han descrito niveles elevados de GFAP y S100B en el suero de pacientes con demencia vascular y con EA esporádica (Carter et al. 2019). Los astrocitos reactivos son actores cruciales en la progresión de la patología de la EA, contribuyendo a la neuroinflamación mediante la secreción de citoquinas, factores proinflamatorios, óxido nítrico y ROS.

En esta Tesis, se evaluó la reactividad astroglial en términos de expresión de GFAP. Los ratones transgénicos tratados con Gal1 exhibieron una significativa disminución en el área astrocítica positiva para esta marca en comparación con los tratados con vehículo, sugiriendo una reducción en la reactividad astroglial (Figura 19). Este resultado es consistente con los estudios mencionados que destacan el papel modulador de Gal1 en la respuesta inflamatoria y la activación de células gliales en diversos contextos.

Los astrocitos secretan una variedad de mediadores extracelulares y muestran gran diversidad en la expresión genética y modificaciones celulares según el microambiente en el que se encuentren y el fenotipo que adoptan (Gama Sosa et al. 2023). Estas células pueden ser inducidas por la microglía proinflamatoria hacia un fenotipo neurotóxico denominado A1 (Liddelow et al. 2017). Esta evidencia, sumada a los trabajos que destacan la modulación del fenotipo microglial por Gal1, podría sugerir que la disminución de la reactividad astrocítica podría ser explicada por la falta de señales proinflamatorias microgliales. Por otro lado, Taylor y colaboradores describieron en el modelo de EA APP/PS1 la inducción de astrocitos

reactivos neurotóxicos A1 en ausencia de reactividad microglial. En este trabajo, demostraron en etapas tempranas de la enfermedad una fuerte astrogliosis, caracterizada por expresión de la proteína clásica de astrocitos A1 positivos para el complemento 3, en asociación con depósitos amiloides vasculares, sugiriendo que estas células podrían estar respondiendo directamente al A β , como también a señales de reactividad de células endoteliales o murales, desencadenadas por daños vasculares. El mismo patrón fue hallado en pacientes con EA. Recientemente, este grupo demostró que la activación mediada por LPS de células endoteliales induce un fenotipo A1 particular en astrocitos reactivos C3+, que se diferencia de aquel inducido por microglia por un fuerte perfil de expresión de proteínas de remodelación de la matriz extracelular (Taylor et al. 2022).

En conclusión, los astrocitos son capaces de responder a diversos agentes del microambiente a partir de señales que reciben de neuronas, microglía y células endoteliales. La disminución de la reactividad glial indicaría una disminución en la inflamación general y, en particular, la disminución de la astrogliosis podría significar la recuperación de ciertas funciones homeostáticas de los astrocitos, que son cruciales para el mantenimiento y el correcto funcionamiento del SNC, como el soporte metabólico neuronal, la regulación del flujo sanguíneo y la integridad de la BHE.

Los resultados de RNAseq presentados en esta Tesis se alinean con lo mencionado anteriormente y la bibliografía. En los ratones Tg-Veh, se observó una alteración de los conjuntos de genes relacionados con respuestas inmunológicas y procesos asociados en comparación con los ratones NTg-Veh. Específicamente, se vieron elevados genesets relacionados con la producción de IL-1 β y respuesta a interferón gamma (IFN- γ), dos citoquinas que evidencian procesos inflamatorios en el hipocampo de estos ratones. A su vez, se encuentra incrementada la actividad en conjuntos de genes asociados con la regulación de la respuesta inmunitaria adaptativa, sugiriendo que el sistema inmunológico adaptativo podría estar desregulado en la EA. Además, el aumento de la migración de leucocitos observado podría indicar posibles cambios en la movilidad de células del sistema inmunológico hacia el sistema nervioso central a través de una BHE permisiva.

Los resultados evidencian que el tratamiento con Gal1 fue capaz de revertir la elevada actividad de numerosas vías inmunológicas que se encontraban alteradas en los ratones

transgénicos, lo cual respalda la capacidad de Gal1 de revertir la reactividad astrocítica y la modulación de la activación microglial observadas.

La evidencia sugiere que los mecanismos de la inflamación y la alteración del metabolismo en el SNC en la EA están interconectados (García-García et al. 2021; Ferrucci y Fabbri 2018; Youm et al. 2013). En particular, un aspecto clave del metabolismo alterado en la EA es la disfunción mitocondrial, un prominente rasgo de la inflamación crónica durante la patología (Wilkins et al. 2014).

En efecto, el análisis de transcriptómica permitió evidenciar importantes alteraciones metabólicas en los ratones Tg-Veh respecto a los animales NTg-Veh. En particular, se vio un aumento prominente de vías relacionadas con la función y estructura mitocondriales, en particular la fosforilación oxidativa, utilización de NADH y NADPH, cadena de transporte de electrones, respiración, entre otras. Acompañan estos cambios el enriquecimiento de la actividad de numerosos mecanismos dirigidos a mitigar un exceso de estrés oxidativo, como el metabolismo del peróxido de hidrógeno, mecanismos de detoxificación celular, y diversos mecanismos antioxidantes y reductores de ROS, que indican desbalance redox en estos ratones.

En el cerebro de pacientes con EA, se ha visto una prominente alteración del metabolismo. Particularmente se ha reportado glucólisis disfuncional, alteración en la regulación del calcio, el metabolismo lipídico, los procesos mitocondriales y la desregulación de la vía mTOR (Rummel y Butterfield 2022). La bibliografía sugiere que estos procesos están íntimamente relacionados con un incremento del estrés oxidativo en las células. El funcionamiento normal de las sinapsis exige mecanismos coordinados que, a su vez, requieren un suministro suficiente de sustratos energéticos. Las neuronas utilizan sobre todo la fosforilación oxidativa y reciben lactato de origen astrocitario que entra directamente al ciclo de Krebs (Mosconi 2013). Sin embargo, durante el envejecimiento la capacidad de las neuronas para oxidar la glucosa en la glucólisis aumenta, lo que se ve acompañado de un aumento significativo del metabolismo energético mitocondrial y de la reorganización de la red mitocondrial, traduciéndose en un mayor estrés oxidativo (Drulis-Fajdasz et al. 2018; Brand 2010). Por lo tanto, los resultados obtenidos se encuentran en línea con lo reportado en la literatura sobre los cambios descritos durante la EA y el envejecimiento.

La modulación de todos estos procesos y la recuperación de los niveles de actividad de los *genesets* del grupo Tg-Gal1, resultan sorprendentemente positivas. Esto podría tener grandes implicancias en el alcance del rol de la modulación de la respuesta inflamatoria para tratar la EA, evidenciando un impacto sobre la regulación del metabolismo.

Además, Gal1 ha sido previamente vinculada a la disminución de especies reactivas de oxígeno en neuronas (Quintá et al. 2014) y, más recientemente, se identificó a Gal1 como moduladora de la funcionalidad mitocondrial en las VSMCs, protegiendo su fenotipo contráctil contra la aterosclerosis (Roldán-Montero et al. 2022).

Por lo tanto, los efectos positivos de Gal1 modulando el perfil inmunológico y metabólico de diversas células de la UNV podría ser beneficioso para múltiples procesos que subyacen la EA, en especial la mejora de la función mitocondrial y procesos antioxidantes.

4. Gal1 contrarrestó alteraciones vasculares y perivasculares en el hipocampo de ratones PDAPPJ20

La capacidad de Gal1 de modular tanto la respuesta inflamatoria como la respuesta y estado vascular, nos ha llevado a la exploración de su efecto sobre la función vascular en la EA, donde la vasculatura desempeña un rol crucial en la patogénesis. El mantenimiento de las funciones cerebrales requiere una regulación precisa de las barreras vasculares entre el LCR y el fluido intersticial del cerebro, y entre el cerebro y la sangre circulante por los vasos sanguíneos. El aumento de permeabilidad de la BHE ha sido asociado al déficit cognitivo (Nation et al. 2019). Incluso, se ha detectado la pérdida de integridad de la BHE previamente a la aparición de disfunción cognitiva y presencia de placas amiloides y ovillos neurofibrilares en pacientes con EA (Ishii y Iadecola 2020).

Esta Tesis evaluó la permeabilidad de la BHE en animales transgénicos de 12 meses empleando la administración intravenosa del colorante Evans Blue, que se conjuga con

albúmina en sangre y sólo entra al compartimiento cerebral en condiciones patológicas donde la integridad de la barrera se encuentra comprometida, como se observó en los ratones Tg-Veh. Nuestros resultados mostraron que Gal1 se asoció a disminución significativa de la presencia de EB en el hilio del hipocampo de ratones transgénicos. Estos hallazgos sugieren que Gal1 preserva la integridad de la BHE.

Parodi-Rullan y colaboradores determinaron que el A β acumulado en la vasculatura lleva a la degeneración de la pared celular, muerte de células vasculares, microhemorragias y aumento de la permeabilidad de la BHE (Parodi-Rullán et al. 2020). En este sentido, los efectos de Gal1 sobre la permeabilidad de la vasculatura cerebral podrían explicarse como una consecuencia de la disminución de la presencia de amiloide sobre la vasculatura, lo que permitiría que los vasos recuperen su reactividad vascular y su selectividad al pasaje de sustancias, creando un círculo positivo de eliminación de A β y mejora de la función vascular. Por otro lado, la misma pérdida de integridad de la BHE da lugar al aumento de procesos proinflamatorios y la alteración del fenotipo vascular. Por consecuencia, la eliminación de A β se ve comprometida y la acumulación de amiloide aumenta, exacerbando la patología neurovascular, la neurodegeneración y contribuyendo a la progresión del deterioro cognitivo. Si el tratamiento con Gal1 actuase mejorando la integridad vascular, podría estar protegiendo la UNV contra este ciclo patológico.

La funcionalidad de las células endoteliales es crucial para el mantenimiento de la BHE (Ludewig, Winneberger, y Magnus 2019; Yamazaki et al. 2019). La evidencia señala efectos detrimetiales del A β en células endoteliales de la microvasculatura cerebral causando, por ejemplo, un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS), la alteración de las funciones endoteliales, expresión de moléculas inflamatorias e incluso la apoptosis (Vukic et al. 2009; Folin et al. 2005).

Se ha determinado que Gal1 es capaz de modular el fenotipo de células endoteliales en tumores (Croci et al. 2012; Croci et al. 2014). Sin embargo, su efecto sobre la microvasculatura cerebral en enfermedades neurodegenerativas aún se desconoce. A partir de lo que se observó en el ensayo de permeabilidad de EB y el análisis de depósitos amiloideos vasculares, se podría hipotetizar que Gal1 contrarresta los efectos patológicos en la EA sobre la estructura y funciones endoteliales, y de esta manera modula la integridad de la BHE y contribuye a la eliminación de A β a través del sistema vascular.

Las microhemorragias o microsangrados son el resultado de fugas a través de pequeños vasos cerebrales. Numerosa bibliografía demuestra que las microhemorragias se asocian a la edad, y se observan con mayor frecuencia en pacientes con EA (Sepehry et al. 2016; Shams et al. 2015; W. Liu et al. 2015). Los estudios en pacientes con EA indican que en un rango de 68-86% se evidencian microhemorragias, especialmente lobares (Sparacia et al. 2017; Basselerie et al. 2017). El uso de técnicas de imágenes de alta resolución en los últimos años ha permitido estimar con mayor precisión este dato, que se condice con la prevalencia de microhemorragias en los informes patológicos (Vázquez-Justes et al. 2022; Sheikh-Bahaei et al. 2019). La hemoglobina extravasada es digerida por los macrófagos y la microglía, donde el grupo hemo es secuestrado en la proteína altamente estable hemosiderina, generando depósitos perivasculares de esta proteína (Haller et al. 2018). Además, se ha descrito que las microhemorragias positivas para proteínas derivadas de la sangre y la vasculatura- coinciden en gran medida con depósitos amiloideos y se asocian a una mayor permeabilidad de la BHE (Poliakova et al. 2016; Ly et al. 2010)

La angiopatía cerebral amiloide y la aterosclerosis cerebral son los principales detonantes de las microhemorragias cerebrales en la EA. Principalmente, las microhemorragias lobares se asocian a la angiopatía cerebral amiloide, mientras que las microhemorragias no lobares se asocian a la aterosclerosis cerebral (Kuroda et al. 2020; Romero et al. 2017). Estos eventos son un importante rasgo histopatológico que refleja el trastorno vascular en la EA. Siguiendo esta correlación, en pacientes con EA la presencia de microhemorragias no lobares se asoció con un mayor riesgo de eventos cardiovasculares y mortalidad cardiovascular, mientras que los pacientes con microhemorragias lobares presentaban un mayor riesgo de ictus y de mortalidad relacionada con el ictus, poniendo en relevancia este parámetro como posible indicador del estado de la progresión de la patología (Benedictus et al. 2015).

Los estudios clínicos respaldan esta visión, ya que la presencia de múltiples eventos de microsangrados correlacionan con un peor estado cognitivo, siendo asociados a peores resultados en el Mini-Mental State Examination, la prueba de asociación visual de denominación de objetos y la prueba de fluidez en pacientes con EA en comparación con aquellos que presentaban 0-1 de estos eventos, a pesar de una duración similar de la enfermedad (Wu et al. 2014; Goos et al. 2009). Además, la presencia de microhemorragias múltiples se asoció a un mayor número de hiperintensidades de sustancia blanca

evidenciadas en imágenes de resonancia magnética, lo que se asocia a un drenaje cerebral insuficiente y falla del sistema glinfático (Kuroda et al. 2020).

En esta Tesis, se muestra la presencia de un mayor número de microhemorragias vasculares en el hipocampo de los ratones Tg-Veh de 12 meses comparados con animales NTg-Veh de la misma edad. Sin embargo, el tratamiento con Gal1 se asoció a una reducción del número de microhemorragias en ratones Tg-Gal1, lo que sugiere un potencial beneficio de Gal1 en la función vascular y la progresión de la patología en el modelo de EA. En línea con esta hipótesis, algunos estudios determinaron que los pacientes de EA con microhemorragias se correlacionan con un perfil patológico de biomarcadores en LCR. Por lo tanto, la presencia de microsangrados evidenciaría un estado más avanzado de la enfermedad (Noguchi-Shinohara et al. 2017; Goos et al. 2009). Otro aspecto que asocia estos eventos como marcadores de la progresión de la EA, es su correlación con una baja perfusión cerebral y una disminución en el consumo cerebral de glucosa, dos alteraciones comunes que acompañan la EA (Noguchi-Shinohara et al. 2017).

Si bien no se ha podido determinar la causalidad de eventos, también se ha demostrado recientemente que la presencia de microhemorragias lobares se encuentra asociada espacialmente a la marca de A β vascular (mayormente A β 1-40) evaluada mediante un trazador fluorescente en imágenes de tomografía por emisión de positrones en pacientes.

Por lo tanto, las microhemorragias cerebrales se asocian con un peor estado cognitivo, vascular y metabólico de la patología, lo que respalda la importancia de la integridad de la BHE en la patogénesis de la EA. El tratamiento con Gal1 emerge como una estrategia terapéutica prometedora para modular estos aspectos.

El estudio de la expresión endógena de Gal1 ante injurias y distintos estímulos permite conocer en qué contextos fisiopatológicos podría estar involucrada. Se observó un incremento de la colocalización de esta proteína con el endotelio en el hipocampo de ratones transgénicos PDAPPJ20. Estos hallazgos son novedosos y sugieren una relación directa entre la expresión de Gal1 y las alteraciones vasculares asociadas con la EA. Sin embargo, no es posible discernir si el endotelio del hipocampo es fuente o blanco de Gal1 en este contexto.

Algunos estudios han determinado que Gal1 es expresada por diversas células del SNC, incluyendo microglía, astrocitos, células endoteliales y VSMCs. Recientemente, Roldán-

Montero y colaboradores observaron que, en arterias coronarias humanas con lesiones ateroscleróticas, la expresión de Gal1 tanto en células endoteliales como en VSMCs se vio disminuida respecto a arterias sanas. Los autores vincularon esto con la pérdida de VSMCs que ocurre en esta patología. Además, mostraron en cultivos primarios de VSMCs obtenidos de aorta que Gal1 protege la función mitocondrial y el fenotipo contráctil de estas células (Roldán-Montero et al. 2022). Otros autores, en cambio, al emplear un modelo de administración de angiotensina II, observaron un aumento de Gal1, lo cual sugiere que cambios en la expresión de Gal1 en lesiones vasculares dependería del modelo utilizado (Chiang et al. 2021).

Sin embargo, prevalece la evidencia de que la expresión de Gal1 es protectora en contextos de inflamación y daño vascular. En el trabajo de Croci et al, se describió que en un microambiente de hipoxia *in vitro*, las células endoteliales HUVEC tienen mayor capacidad de unir Gal1, mediante modificaciones de los epítopes de glicanos presentes en su superficie. Este fenómeno se vincula a la capacidad proangiogénica de Gal1, la cual sería beneficiosa en contextos de falta de suministro de oxígeno. En este sentido, se ha descrito a la angiogénesis como un sistema de reparación en condiciones asociadas con traumatismo cerebral y trastornos neurodegenerativos, incluyendo la EA y angiopatía cerebral amiloide (Merkulova-Rainon et al. 2018; S. Zhang et al. 2018). Aunque esta Tesis no observó cambios en la densidad vascular durante un tratamiento corto, la administración más prolongada de Gal1 podría tener un efecto proangiogénico en los vasos que ayude a restablecer la perfusión cerebral que se observa en la EA.

Recientemente, se han descrito efectos protectores de la administración de Gal1 en un modelo murino de la enfermedad de Parkinson (Y. Li et al. 2020). Previamente, se observó por proteómica que los niveles de Gal1 endógenos aumentaban en la sustancia nigra y que se veían disminuidos en el LCR en pacientes con esta patología (Marques et al. 2019; Werner et al. 2008). Por lo tanto, los niveles de Gal1 se verían modificados en contextos neurodegenerativos. Los resultados de esta Tesis muestran una fuerte marca vascular de Gal1 en el hipocampo de animales Tg-Veh. En resultados preliminares, hemos detectado que *in vitro* células endoteliales de microvasculatura cerebral humana expresan Gal1, y que su expresión podría estar incrementada al ser expuestas a la especie A β 1-40, predominante en los depósitos vasculares. Sin embargo, no podría excluirse la posibilidad de que esta lectina

pueda provenir de células murales o perivasculares, como los astrocitos, y estar uniéndose al glicocálix de la superficie de estas células. En la Figura 18 de la sección de Resultados, también es posible distinguir células de morfología astrocítica positivas para Gal1 que pueden ser una fuente de esta lectina. En este sentido, Starosom y colaboradores estudiaron los efectos de Gal1 en la encefalomielitis autoinmune experimental en ratones, donde determinaron que estímulos inflamatorios incrementan la secreción de Gal1 por astrocitos y postularon que Gal1 proveniente de astrocitos promovería un microambiente neuroprotector a través de la modulación del fenotipo microglial. Adicionalmente, en cerebros de pacientes con EA, nuestro laboratorio ha determinado un aumento de la colocalización de la marca de Gal1 y la proteína astrocítica GFAP (resultados no incluidos en esta Tesis). También en el contexto de este trabajo hemos constatado que los niveles de la proteína Gal1 en LCR se encuentran aumentados en pacientes con EA, analizados en aproximadamente 1000 muestras (datos todavía no publicados). De esta manera, el aumento de Gal1 en enfermedades neuroinflamatorias podría estar ligado a un mecanismo protector.

Independientemente de la fuente de Gal1, diversos mecanismos podrían explicar sus efectos beneficiosos en la vasculatura cerebral, incluyendo una acción directa sobre las células endoteliales.

Las alteraciones en la comunicación entre los astrocitos y el endotelio pueden contribuir a la patogénesis de la EA, viéndose alteradas las funciones de mantenimiento vascular de los astrocitos (Acosta, Anderson, y Anderson 2017). Se ha observado previamente que en la patología ocurre una pérdida de la polarización de los astrocitos, que se asocia con una alteración de la homeostasis del agua y del potasio (J. Yang et al. 2011). A su vez, la vasculatura puede recibir estímulos negativos de los astrocitos reactivos, afectando su fenotipo y acentuando la permeabilidad de los vasos cerebrales.

Esta Tesis, como parte del análisis de los efectos de Gal1 en ratones con EA, evaluó la interacción física entre los astrocitos y el endotelio en el hilio del hipocampo. Los resultados mostraron que los ratones transgénicos presentaron una disminución en el área de contacto entre los pies astrocíticos y los vasos sanguíneos, como también un menor número de proyecciones de los astrocitos a la vasculatura, en comparación con los ratones no transgénicos. El tratamiento con Gal1 revirtió la disminución de ambos parámetros evidenciando una recuperación de la envoltura vascular de los pies astrocíticos en los

animales tratados. Los hallazgos presentados respaldan la idea de que Gal1 reduce la reactividad astroglial y promueve la recuperación de la comunicación astrocito-endotelio, lo que podría tener implicancias positivas en la función cerebral.

Este fenómeno podría estar relacionado con diversos factores estudiados. En primer lugar, estudios previos demuestran que los depósitos de A β acumulados sobre la membrana basal del endotelio vascular impiden el contacto entre el astrocito y el endotelio, lo que a su vez correlaciona con la presencia de zonas de alta permeabilidad (Kimbrough et al. 2015; Wisniewski, Vorbrot, y Wegiel 1997). Es posible que el A β vascular induzca una alteración fenotípica en los astrocitos, causando la retracción de los pies astrocíticos que contactan la vasculatura. En este sentido, la disminución del A β vascular observado luego del tratamiento con Gal1 podría tener como consecuencia la restauración del fenotipo astrocitario y la recuperación de la interfaz astrocito-endotelio. Por otro lado, los astrocitos desempeñan un papel crucial en la eliminación y la degradación del A β mediante la expresión de proteasas como la neprilisina, la enzima convertidora de endotelina, la enzima degradadora de insulina y las metaloproteinasas de matriz. Además, los astrocitos secretan ApoE, que se une a las especies de A β alterando su capacidad para formar agregados insolubles y facilitando su eliminación a través de la BHE. Por lo tanto, disminuir la reactividad glial también podría contribuir a restaurar los mecanismos de eliminación de A β .

La localización perivascular de AQP4 es de suma relevancia para la eliminación de solutos intersticiales, incluido A β , a través del sistema perivascular (Valenza et al. 2020; Xu et al. 2015). La pérdida de AQP4 en las terminales astrocíticas se asocia con el estado de la patología en pacientes con EA, teniendo una correlación positiva con el aumento de la carga amiloide y la severidad del diagnóstico clínico (estadio de Braak) (Zeppenfeld et al. 2017). Nueva evidencia muestra que en ratones con EA el daño a la BHE es seguido por infiltraciones de componentes sanguíneos al parénquima cerebral y la expresión alterada de AQP4 (Shibly et al. 2023).

En esta Tesis, el análisis de alta resolución *array tomography* reveló una disminución significativa de la señal de AQP4 colocalizando con la vasculatura en el hilio del hipocampo de ratones transgénicos en comparación con los no transgénicos. El grupo tratado con Gal1 mostró una recuperación de la marca vascular de AQP4, sugiriendo una recuperación funcional en la comunicación astrocito-endotelio (Figura V). Por lo tanto, el tratamiento con

Gal1 no sólo redujo la reactividad astroglial en el hilio del hipocampo de ratones PDAPPJ20, sino que también promovió la recuperación de la comunicación astrocito-endotelio, restableciendo la polarización de los astrocitos. Estas observaciones podrían explicar, en parte, la recuperación de la integridad de la BHE y la eliminación del A β vascular, lo que puede tener implicaciones significativas para la función cerebral en el contexto de la EA. Estos resultados respaldan la relevancia de Gal1 como un posible agente terapéutico para modular los fenotipos tanto gliales como de células vasculares, y restaurar la homeostasis en el microambiente cerebral en el contexto de la EA.

En consecuencia, es posible inferir una retroalimentación positiva por los efectos de Gal1 donde participen la recuperación de la integridad vascular, la disminución de la activación astroglial, el aumento de la eliminación de A β y la restauración de la envoltura astroglial de la vasculatura, teniendo como desencadenante la capacidad inmunorreguladora de Gal1.

5. Gal1 atenuó las alteraciones endoteliales en la EA experimental.

Cambios en las funciones de las células vasculares contribuyen al proceso de patogénesis, neurodegeneración y pérdida cognitiva en la EA (Nation et al. 2019; Yamazaki et al. 2019). Dado que el componente principal de la BHE son las células endoteliales, la recuperación de la integridad observada en ratones transgénicos podría sugerir un efecto directo de Gal1 directo sobre las mismas, contribuyendo a mantener la especificidad y selectividad de la barrera. Por ello, se utilizó un modelo *in vitro* de células endoteliales de microvasculatura cerebral humana (HBMEC), que permita evaluar específicamente cambios fenotípicos y moleculares en estas células, asociados a la patología amiloide, y en consecuencia, evaluar si Gal1 puede interferir en estos procesos patológicos. Para ello, se empleó una concentración de A β 1-40 a un tiempo lo más prolongado posible que no altere la viabilidad celular.

Como se mostró en los resultados, se evaluó el potencial de Gal1 de modular la integridad endotelial, implementando un ensayo de barrera *in vitro*, monitoreando el TEER de la

monocapa de HBMEC sobre la membrana de un dispositivo *transwell*. Al exponer las monocapas a los distintos tratamientos, se determinó que A β 1-40 causó la disminución de la resistencia eléctrica de las monocapas de HBMEC, mientras que el tratamiento conjunto con A β 1-40 y Gal1 por 24 h impidió dicha alteración. Estos resultados también evidenciaron un aumento significativo de la resistencia eléctrica de las HBMEC respecto a la exposición únicamente con A β . Este resultado sugiere un efecto protector de Gal1 sobre la integridad de la BHE, aspecto crucial en el contexto de la EA. Adicionalmente, se identificó que la exposición de las células HBMEC a A β 1-40 causó la disminución de la marca de ocludina en la membrana celular que se evidenciaba en el grupo tratado con vehículo. En la misma dirección que los valores de TEER, Gal1 atenuó la deslocalización de ocludina en los contactos entre células. Por lo tanto, podría haber una relación entre el mantenimiento de la resistencia eléctrica propiciado por Gal1 y la conservación de ocludina. Este resultado podría ser fortalecido mediante una cuantificación de otras técnicas como medición de la expresión por RT-PCR y *western blot*, aunque la bibliografía muestra que no siempre estos análisis reproducen de manera fiel la integridad endotelial, y el estudio de otras proteínas de uniones estrechas o anclaje entre células endoteliales mediante inmunocitoquímica.

La BHE controla el traspaso de A β entre los compartimientos cerebrales y el plasma, principalmente gracias a la expresión de transportadores específicos. Una BHE funcional permite la polarización adecuada de las células endoteliales y las proteínas de unión estrecha que controlan el flujo paracelular hacen posible el direccionamiento del A β , logrando su eliminación. El equilibrio entre la entrada y la salida de A β se altera durante la EA (Petrushanko, Mitkevich, y Makarov 2023), por lo que la recuperación de la BHE podría mejorar el *clearance* de los péptidos. En un futuro sería relevante complementar estos estudios e investigar los efectos de Gal1 sobre el pasaje de A β a través de las células endoteliales empleando este modelo. Respaldando los resultados anteriores, Gal1 demostró preservar la BHE tanto *in vivo*, disminuyendo la permeabilidad al Evans Blue, como *in vitro*, manteniendo la resistencia eléctrica de la monocapa de HBMEC, por lo que su empleo para subsanar la patología vascular de la EA es prometedor.

Este resultado concuerda con los resultados de los perfiles transcripcionales, que apuntan a una disfunción de ciertos procesos vasculares en los ratones Tg-Veh, como también a una recuperación de la actividad de éstos en animales transgénicos tratados con Gal1.

En particular, se detectó elevada actividad del *geneset* de regulación positiva del proceso de transición de células epiteliales a mesenquimales (Epithelial-to-Mesenchymal Transition o EMT) en los ratones Tg-Veh. La muestra del hipocampo no incluye células epiteliales, por lo que se puede inferir que los cambios corresponden a su análogo en células endoteliales *Endothelial-to-Mesenchymal Transition* o EndMT. Este proceso se asocia a la pérdida de polaridad celular, aumento de migración e invasividad, mayor permeabilidad vascular, fibrosis y pérdida de transporte transcelular específico. La elevada actividad de *genesets* relacionados a estos procesos de EndMT que se observa en los Tg-Veh implica un estado inflamatorio y remodelación vascular. Por lo tanto, la restauración del perfil transcripcional de estos procesos en los ratones transgénicos tratados con Gal1 sugiere un efecto beneficioso del tratamiento en la preservación de la integridad de la BHE. De la misma manera, la restauración del *geneset* de ensamblaje de uniones celulares en el grupo Tg-Gal1 indica la capacidad de esta lectina para promover la expresión de proteínas de unión estrecha, lo que podría sugerir un aumento de estas uniones en células endoteliales.

Por lo tanto, el cambio fenotípico observado en las células endoteliales a causa de la exposición a A β puede implicar diversos mecanismos, como la vía de NF- κ B. La activación de NF- κ B es crucial en la patogénesis de diversas enfermedades neurodegenerativas, incluida la EA (Hetz y Saxena 2017; Kaltschmidt y Kaltschmidt 2015). Los resultados obtenidos en esta Tesis revelan la capacidad de A β 1-40 para inducir la translocación nuclear del factor de transcripción NF- κ B en células HBMEC y cómo este proceso puede ser modulado por la presencia de Gal1. Por lo tanto, la interacción entre la acumulación de A β y la activación de NF- κ B en células endoteliales cerebrales sugiere un papel importante en los eventos inflamatorios asociados a la EA. La inhibición de la translocación nuclear de NF- κ B en presencia de Gal1 sugiere un potencial efecto modulador sobre la activación de esta proteína inducida por A β en las HBMEC. Si bien se han descrito efectos antiinflamatorios de Gal1 en otros tipos celulares, esta Tesis reporta por primera vez este efecto sobre células endoteliales cerebrales y su efecto sobre este factor.

Esta interacción entre A β , Gal1 y NF- κ B destaca la complejidad de los eventos intracelulares que contribuyen a la patogénesis de la EA. El papel de Gal1 como modulador de la respuesta inflamatoria y su capacidad para interferir con la activación de NF- κ B pueden tener implicaciones terapéuticas significativas en el desarrollo de estrategias para mitigar la

inflamación neurodegenerativa asociada a la EA. En respaldo con esta hipótesis, se ha observado una regulación de NF- κ B por Gal1 en linfocitos T (Toscano et al. 2011) y células microgliales (Starossm et al. 2012) en contextos independientes a la EA.

El análisis de conjuntos de genes también detectó variaciones en procesos de proliferación vascular, como la morfogénesis de tubos epiteliales, el desarrollo de células epiteliales y la quimiotaxis de células endoteliales, en el grupo Tg-Gal1 en comparación con el grupo NTg-Veh. Estos hallazgos sugieren que el tratamiento con Gal1 podría haber estimulado ciertas vías de angiogénesis en el hipocampo de los ratones con EA, aunque no se tradujeron en cambios en la densidad vascular mediante la cuantificación de Lectina-FITC, posiblemente debido a la acotada duración del tratamiento (3 semanas).

Cierta evidencia ha demostrado que todas las formas de péptido A β , incluidas las formas monoméricas, pueden interferir con la angiogénesis, un mecanismo de reparación imprescindible para los vasos lesionados en el cerebro con EA y la angiopatía cerebral amiloide (Parodi-Rullán, Sone, y Fossati 2019). Este mecanismo respalda las observaciones sobre la disminución de la densidad y de la cobertura vascular en pacientes con EA, que ha sido reportada en el hipocampo, el prosencéfalo y la retina (X. Wang et al. 2021; Fischer, Siddiqi, y Yusufaly 1990). Diversos estudios en animales y modelos *in vitro* acompañan estos resultados (Parodi-Rullán et al. 2020; Paris et al. 2010), a pesar de algunos resultados contradictorios (Biron et al. 2011; Koster et al. 2016). La angiogénesis defectuosa también se acompaña con niveles alterados de moléculas proangiogénicas en suero de pacientes. De manera controversial, se ha reportado tanto su incremento (angiogenina y TIMP-4), como la disminución (angiogenina y VEGF) (Qin et al. 2015; Y. N. Kim y Kim 2012). Por otro lado, la deficiencia en angiogénesis y densidad de la microvasculatura cerebral se presenta no sólo en pacientes con EA, sino que también ha sido asociada al envejecimiento y correlaciona con la pérdida cognitiva (Ambrose 2012).

En este sentido, la neovascularización y el aumento concomitante en la densidad de microvasos en el hipocampo se han demostrado como un sistema de reparación capaz de mejorar la cognición en modelos transgénicos de APP (S. Zhang et al. 2018)

En un trabajo relativamente reciente, Parodi-Rullán y colaboradores estudiaron el efecto de diversas formas del péptido A β sobre la angiogénesis de células endoteliales *in vitro*. Allí vieron la interrupción de la angiogénesis, respaldando el bloqueo de los procesos

angiogénicos durante la EA. Además, el trabajo sugiere un mecanismo por el cual el A β compite con los receptores que inducen la proliferación endotelial (Parodi-Rullán et al. 2020). A partir de la evidencia, se podría hipotetizar que la disminución de la perfusión cerebral y la eliminación defectuosa de A β presentes durante la EA, inducen un mecanismo compensatorio proangiogénico. Sin embargo, la progresión de la enfermedad y la consecuente acumulación excesiva de amiloide, podrían bloquear estos procesos que, sumados a la pérdida de vasos dañados, podrían causar la disminución de la densidad vascular o, por otro lado, la hipervascularización defectuosa por exceso de señales proangiogénicas observada en algunos estudios. Por lo tanto, un tratamiento con Gal1 más prolongado podría tener efectos potenciales en la angiogénesis en el hipocampo de los ratones con EA, como se indica por el incremento en los procesos de proliferación observados en el análisis de *genesets*.

6. Gal1 restauró mecanismos de proteostasis e inflamación en la EA experimental

La disfunción de los mecanismos de proteostasis se ha asociado al envejecimiento y a la patogénesis de la EA (Tseng et al. 2023), por lo que la modulación de éstos aporta nuevas perspectivas para el desarrollo de estrategias terapéuticas. La sobrecarga de los mecanismos de la red de proteostasis (síntesis, plegado, transporte, degradación), los cuales actúan orquestados, llevan a un estado de estrés del RE. El estrés excesivo, prolongado o constitutivo del RE induce la activación prolongada de la UPR, denominada maladaptativa. Si bien los mecanismos sensores y muchos de los efectores son los mismos, la diferencia entre una UPR adaptativa o maladaptativa se genera por la duración o magnitud del insulto (Ajoorabady et al. 2022).

Los resultados presentados en esta Tesis revelan una conexión crítica entre la presencia de A β y la activación de mecanismos de estrés de RE en las células HBMEC, así como el impacto modulador de Gal1 en estos procesos.

Estudios previos respaldan el aumento de BIP en animales modelos de la EA. En el modelo murino APP/PS1, se demostró que los niveles de BIP se encontraban aumentados en el hipocampo de estos ratones (Cui et al. 2017). Se asoció dicho aumento a la expresión del marcador de apoptosis neuronal PTEN1. Hoozemans y colaboradores determinaron mediante *western blot* mayores niveles de proteína BIP en la corteza temporal y el hipocampo de pacientes en EA en comparación con sujetos controles (Jeroen J. M. Hoozemans et al. 2009). Estas observaciones sugieren que la patología de la EA está relacionada con la inducción constitutiva del estrés del RE y la UPR maladaptativa.

En primer lugar, la exposición de HBMEC a A β 1-40 indujo una marcada expresión de la proteína residente del retículo endoplasmático BIP/GRP78, también llamada HSPA5, evaluada por inmunocitoquímica. La activación de BIP es una respuesta adaptativa destinada a restaurar la homeostasis proteica, pero su persistencia puede llevar a procesos inflamatorios e incluso la muerte celular (Cao, Luo, y Shi 2016; L. Chen et al. 2015). Este fenómeno sugiere una respuesta sostenida al estrés, lo cual podría tener un impacto negativo sobre la función celular de las HBMEC. Gal1 mostró ser capaz de contrarrestar el aumento de BIP medido a las 24 h tras exposición a A β 1-40, sugiriendo un rol positivo sobre la recuperación de la proteostasis alterada por A β .

Luego, se evaluó la expresión de los ARNm de los efectores río abajo de BIP mediante RT-PCR. Los resultados mostraron un incremento en los niveles de mensajeros de los efectores de la UPR Ire1 α y PERK en las células HBMEC expuestas a A β . Esta observación respalda la asociación entre los mecanismos de estrés de RE y la activación de las células endoteliales de microvasculatura cerebral causada por la exposición prolongada de concentraciones subtóxicas de A β . PERK e IRE1 son capaces de inducir la expresión *de novo* de BIP tras ser activadas, lo que concuerda con lo observado anteriormente. Sin embargo, el tratamiento con Gal1 contrarrestó estos efectos, confirmando el efecto modulador de esta lectina sobre distintos procesos celulares, incluyendo la respuesta al estrés de retículo endoplasmático. Estos resultados cobran particular importancia teniendo en cuenta investigaciones previas que han asociado la activación de la UPR con el desarrollo de la EA y han propuesto la UPR como un objetivo terapéutico (Rahman et al. 2018; Martínez et al. 2017)

La activación sostenida de IRE1 α se asocia a la sobreexpresión de genes blanco de la UPR, teniendo como consecuencia una respuesta maladaptativa, que puede llevar a la inflamación

e incluso la muerte celular (Haiying Chen et al. 2016; Ghosh et al. 2014). Respecto a la EA, se ha encontrado sobreexpresión de este factor en pacientes con la patología. Aniotz y colaboradores analizaron tejido *post mortem* de pacientes con EA de estadios Braak 0-IV y determinaron fuerte presencia de IRE1 α fosforilada en el hipocampo, indicando activación de este efecto. Además, en un modelo murino de la EA, la delección de IRE1 α logró disminuir la carga amiloide, restauró la capacidad sináptica de neuronas en CA1, y mejoró la memoria de estos ratones. Lee y colaboradores demostraron que el silenciamiento de PERK *in vitro* protegió contra la toxicidad de A β en neuronas (Lee et al. 2010). Sin embargo, las intervenciones para silenciar o disminuir los niveles de efectores de la respuesta de estrés de RE no han demostrado ser consistentes, existiendo evidencia de efectos adversos sobre la patología en la EA. Se sostiene que la intervención de estos mecanismos puede ser positiva o negativa dependiendo del estadio de la patología.

Fonseca y colaboradores han demostrado que una exposición *in vitro* a altas concentraciones de A β 1-40 inducen apoptosis mediada por estrés de RE, en particular por inducción del factor proapoptótico CHOP, en células endoteliales de vasculatura cerebral de rata. En este trabajo, se observaron elevados niveles de BIP, XBP1 y, a diferencia de lo observado en esta Tesis, de ATF6 (Fonseca et al. 2013).

La translocación nuclear de XBP1, un factor de transcripción activado por Ire1 α , es un paso clave en la UPR. La exposición a A β 1-40 evidenció la activación y la marca nuclear sostenida a las 24 h de XBP1, pero este efecto fue prevenido por el tratamiento con Gal1. Por lo tanto, Gal1 podría ser esencial para restaurar la homeostasis proteica y mantener la función endotelial.

Zeng y colaboradores observaron en un modelo de aterosclerosis que en las zonas más susceptibles a desarrollar una lesión (las zonas de ramificación, que reciben mayor presión pulsátil), las células endoteliales expresan altos niveles de XBP1 (Zeng et al. 2009). *In vitro*, determinaron que células endoteliales de vasculatura umbilical (HUVECs) responden a alteraciones de flujo con la expresión de esta proteína. A su vez, este estrés sostenido indujo la disminución de la proteína cadherina de vasculatura endotelial (VE-cadherina), implicada en la integridad endotelial, mediado por aumento de la expresión de metaloproteasas. Esta evidencia respalda la noción que la sobreactivación de XBP1 causa la pérdida de integridad

vascular, lo cual puede ser un mecanismo clave en la pérdida de integridad de la BHE que observamos en las HBMEC y los ratones transgénicos.

Con el objetivo de aportar nuevos conocimientos de la activación de la UPR en las distintas células que componen la UNV, recientemente se publicó un trabajo por Hori y equipo, donde investigaron los patrones celulares y temporales específicos de la respuesta al estrés del RE tras injuria cerebral utilizando ratones indicadores de la activación del estrés del RE, que expresaban la proteína XBP1 unida a GFP (Q. Fan et al. 2023). Este trabajo determinó por primera vez que en ambos modelos de lesión traumática cerebral e isquemia (modelo de accidente cerebrovascular por oclusión permanente de una carótida) las células endoteliales son las que más fuertemente expresan este marcador de UPR. Al día 1 post injuria local por perforación, las células endoteliales representaron el 71-74% de todas las células positivas para XBP1, siendo la población celular más abundante que mostró su expresión. Las siguientes de mayor contribución fueron los astrocitos, teniendo una respuesta más tardía y llegando a contribuir a la expresión de XBP1 total aproximadamente en un 35% entre los días 3-7. Las neuronas fueron las más rápidas en responder, 6 h post injuria, aunque sólo significaron un 10% de las células GFP+, porcentaje que disminuyó rápidamente durante los días siguientes a la lesión. Interesantemente, la microglia y los oligodendrocitos no parecieron responder al daño en términos de expresión de XBP1. En el modelo de isquemia estudiado en este mismo trabajo, la dinámica de activación fue similar. Este trabajo enfatiza a la microvasculatura dentro de la UNV como una entidad tempranamente respondedora al daño en términos de la UPR. A su vez, los astrocitos parecen tener también una respuesta significativa y temprana, aunque dicho aumento de la expresión de XBP1 sucede luego del comienzo de la respuesta endotelial, lo que podría sugerir que las células gliales actúan en consecuencia de las señales recibidas de la vasculatura. De todos modos, las células endoteliales presentan la respuesta más acentuada y sostenida que, ante un insulto crónico, podría tornarse en una respuesta de XBP1 maladaptativa llevando a inflamación y muerte celular.

Hasta la actualidad, no hay estudios que hayan investigado la respuesta de estrés del RE en células endoteliales de la microvasculatura cerebral en el contexto de la EA en pacientes o modelos animales. La mayoría de las investigaciones se han centrado en las neuronas y su relación con la acumulación de proteínas amiloides y tau. Sin embargo, la asociación del

estrés crónico, la UPR y la patogénesis de la EA han sido ampliamente reconocidas, centrándose en el impacto del estrés en la degeneración neuronal (Uddin et al. 2020; Rahman et al. 2018)

En este sentido, se exploró la proteína de XBP1 colocalizando con el endotelio en el hilio de los ratones Tg-Veh y su modulación por Gal1, parámetro que, en la bibliografía disponible hasta el momento, no se encuentra reportado. El tratamiento con Gal1 mostró una tendencia relevante para la marca positiva para XBP1 sobre la vasculatura, resultado que podría consolidarse con el análisis de un número mayor de ratones. Este parámetro resulta relevante ya que muestra una asociación *in vivo* entre Gal1 y la atenuación de XBP1, lo que concuerda con la disminución de su activación en células HBMEC.

Asimismo, el análisis de transcriptómica respalda la modulación de procesos de la homeostasis proteica por Gal1. En particular, los perfiles transcripcionales observados sugieren que los ratones transgénicos experimentan una desregulación caracterizada por elevados niveles de síntesis de ARNm y proteínas, disminución de los procesos regulatorios de la proteostasis y una posible falla en la degradación proteica. La administración de Gal1 parece tener un efecto beneficioso al restaurar varios de estos conjuntos de genes, destacando su potencial terapéutico en el mantenimiento de la homeostasis proteica en condiciones patológicas.

La elevada actividad de vías involucradas en la producción de proteínas observada en los ratones transgénicos incluye tanto la transcripción como la traducción, indicando una activación generalizada de la maquinaria celular para la síntesis proteica. Este incremento se ve acompañado por una disminución de procesos de regulación negativa de la transcripción en los ratones Tg-Veh, lo que sugiere una mayor actividad transcripcional. Además, la disminución de la actividad de reguladores de unión al ADN y represores de unión a ARN indica una pérdida de control en la expresión génica.

A nivel de proteínas, se observan alteraciones en los procesos de plegado, transporte intracelular y degradación en los ratones Tg-Veh. Respecto a este último, se vinculan la disminución de los *genesets* como la ubiquitinación de proteínas y transporte a lisosomas.

Los ratones que recibieron el tratamiento con Gal1, por su parte, muestran una recuperación de los niveles de actividad de estos conjuntos de genes diferencialmente activados en los ratones transgénicos que recibieron vehículo, tanto en los procesos transcripcionales, como

en los traduccionales. Por lo tanto, los niveles de actividad transcripcional de estos conjuntos de genes en los ratones Tg-Gal1 sugieren nuevamente una restauración de la homeostasis proteica. Además, se vieron modulados ciertos procesos que podrían funcionar como mecanismos compensatorios: la disminución de activadores de la transcripción y aumento de la regulación negativa de la transcripción, así como la activación de la actividad de transporte lisosomal.

En el mismo sentido, se asoció el tratamiento de Gal1 recombinante que recibieron los ratones Tg-Veh a una disminución de la presencia de XBP1 sobre el endotelio de la vasculatura en el hilio del hipocampo de estos ratones. Estos hallazgos contribuyen a pensar en una nueva perspectiva sobre el papel de Gal1 como regulador de la respuesta de la UPR en la patogénesis de la EA y sugieren que la modulación de estos mecanismos podría ser un enfoque terapéutico promisorio. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para comprender completamente los mecanismos subyacentes y evaluar la viabilidad de Gal1 como un objetivo terapéutico en la EA. En vista de la ausencia de evidencia previa, continuar explorando la activación de mecanismos de estrés reticular y mecanismos de proteostasis en la vasculatura de animales y pacientes con EA podría arrojar nueva información sobre los mecanismos subyacentes a la patología.

Luego, se exploró la expresión del componente de inflamasoma NLRP3, cuya activación puede ser desencadenada en el contexto de una UPR disfuncional. El inflamasoma NLRP3 está implicado en un amplio abanico de patologías y enfermedades como sensor inmunitario innato intracelular, incluyendo enfermedades vasculares (Bai et al. 2020). Además, la activación de este componente en ratones se vincula a la pérdida de integridad de la BHE (Miraglia et al. 2016).

Los resultados evidenciaron que la exposición de las HBMEC a A β 1-40 indujo una fuerte expresión del inflamasoma NLRP3, respaldando la noción de que el estrés sostenido del RE y la activación de las vías proinflamatorias en células endoteliales son eventos interconectados en la patogénesis de la EA (Heneka, McManus, y Latz 2018). También se demostró la capacidad de Gal1 para contrarrestar este aumento en la expresión de NLRP3, lo cual se condice con los efectos antiinflamatorios de Gal1 observados tanto en esta Tesis como en trabajos previos.

La formación del inflamasoma NLRP3 puede tener como consecuencia la apoptosis mediada por la activación de la caspasa-1 y la secreción de IL-1 β . Esta citoquina se asocia a programas de muerte celular en distintos tipos celulares mediante distintos mecanismos, como la apoptosis mitocondrial y en consecuencia a un estrés de retículo endoplasmático sostenido, a través de la inducción de CHOP (Wang et al. 2023). Los resultados aquí expuestos mostraron que la exposición de las HBMEC a concentraciones subtóxicas de A β 1-40 no modificaron los niveles de ARNm de IL1 β medidos por RT-PCR y que tampoco indujeron la secreción de IL-1 β , medida por ensayos de ELISA en el medio de las células HBMEC. Tampoco se observaron aumentos significativos en los niveles de ARNm CHOP en las HBMEC. La falta de aumento en los niveles de CHOP es coherente con los resultados del ensayo MTT, que indicaron que la concentración de A β 1-40 utilizada no indujo una disminución significativa en la viabilidad celular. Por lo tanto, estos resultados sugieren que A β 1-40 induce la expresión del inflamasoma NLRP3 en células endoteliales de microvasculatura cerebral humana, y este efecto puede ser contrarrestado por Gal1. Sin embargo, la IL1 β no parece ser el principal mediador de la respuesta inflamatoria en estas condiciones particulares, y río abajo de NLRP3 podría actuar otro factor proinflamatorio, como IL-18, que no hemos evaluado en esta Tesis. Otra variable podría ser el tiempo de los tratamientos, causando que en el momento de la determinación de la expresión de dicha citoquina, no haya suficiente activación del inflamasoma, a pesar del aumento del nivel de mensajero, para iniciar esta vía. Además, la activación de IL-1 β ha sido asociada a la apoptosis mediada por la activación de la UPR en células endoteliales (Barros Ferreira et al. 2024; Pan et al. 2017). Acorde a la bibliografía, la ausencia de cambios en el ARNm IL-1 β también se condice con los resultados del MTT.

Existen otras vías alternativas, que no han sido evaluadas en esta tesis, por las cuales NLRP3 podría inducir la disfunción endotelial (Bai et al. 2020). Por ejemplo, el factor HMGB1, molécula representativa de patrones asociados a daño moleculares o DAMPS, es secretado ante la activación de NLRP3, siendo capaz de alterar la integridad de la barrera endotelial. HMGB1 provoca la formación de fibras de actina de estrés, aumentando la contractilidad de las células endoteliales, lo que contribuye a la desregulación del flujo sanguíneo y alteración del fenotipo endotelial (Zheng et al. 2016; Wolfson, Chiang, y Garcia 2011). La expresión de HMGB1 provoca la expresión de quimioquinas y moléculas de adhesión mediada por NF- κ B

y la internalización de proteínas de anclaje, que aumentan la permeabilidad celular y favorecen la infiltración de células del sistema inmune (Liang et al. 2020; Zheng et al. 2016). Además, HMGB1 puede adherirse al receptor de productos de glicosilación avanzada (RAGE), conocido transportador endotelial de A β durante el proceso de eliminación, por lo que puede competir por la unión al receptor y exacerbar el problema de acumulación vascular del péptido.

En el hipocampo de cerebros de pacientes con EA, Ismael et al describieron una elevada expresión del inflamasoma NLRP3 y marcadores de estrés, especialmente en cercanía de depósitos de A β (Ismael et al. 2021). Dicho trabajo también reveló la presencia de interacción con la tiorredoxina (TXNIP), una proteína capaz de inducir la formación del inflamasoma NLRP3, en microglía y astrocitos, validando a este factor como partícipe en múltiples procesos inflamatorios en el contexto de la EA. Por lo tanto, mitigar el estrés de RE constitutivo y/o las vías XBP1 y NF- κ B podría ejercer un rol neuroprotector en la EA al impedir la activación del inflamasoma NLRP3.

Los resultados del RNAseq también evidenciaron cambios asociados a procesos inflamatorios en células vasculares en los ratones Tg-Gal1. La mayor actividad de *genesets* relacionados con la activación de integrinas y unión a integrinas indica alteraciones en la adhesión celular, un evento común en procesos inflamatorios, esencial para la formación de la BHE. A su vez, la disminución en la actividad de la vía de unión de β -catenina se asocia con cambios patológicos, incluyendo inflamación y la remodelación vascular. Por último, la disminución de la vía de unión de calmodulina en el grupo transgénico implica un desbalance en la homeostasis de calcio, lo cual se ha vinculado con respuestas inflamatorias y contracción de músculo liso. Por lo tanto, la restauración del perfil de los ratones Tg-Gal1 sugiere efectos antiinflamatorios del tratamiento en células de la vasculatura.

Lau y colaboradores, en su estudio de la secuenciación de ARN de núcleos únicos, reportaron un marcado aumento de genes característicos de la respuesta inflamatoria en poblaciones de células endoteliales, incluidos IFN- γ y el regulador de interferón IRF7, vía que también se observó incrementada en los hipocampos de los ratones Tg-Veh analizados en esta Tesis.

Por otro lado, en pacientes con EA, las células endoteliales expresan genes asociados con la inducción de la respuesta inmune, en especial el reclutamiento de linfocitos T y el aumento de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase 1, que provoca la

infiltración de linfocitos T CD8+ citotóxicos en el cerebro (Gate et al. 2020; Dulken et al. 2019). Como resultado, se inician procesos que causan la activación microglial y perturban la neurogénesis del giro dentado hipocampal (Di Liberto et al. 2018). De suma relevancia, la bibliografía ha demostrado que Gal1 induce la apoptosis de células T CD8+, lo que podría resultar un mecanismo de gran importancia en la neuroprotección ejercida por esta molécula (Rubinstein et al. 2004).

Estos hallazgos ofrecen nuevas perspectivas sobre la interacción entre A β , Gal1, el estrés de RE constitutivo y los marcadores inflamatorios en el contexto de la EA, y proporcionan una base para investigaciones futuras que exploren más a fondo estos mecanismos.

Alcances y limitaciones del trabajo

Consideraciones sobre el modelo experimental

Aunque los modelos animales transgénicos han sido y son sumamente valiosos para estudiar aspectos específicos de la enfermedad de Alzheimer, es importante reconocer sus limitaciones en la representación de la diversidad genética y las características del Alzheimer esporádico o de inicio tardío, que es más común en la población humana. En esta sección se discutirán algunas ventajas y limitaciones de los modelos animales de la EA, centrándonos en los modelos murinos.

Hasta la fecha, los ensayos clínicos derivados de estudios preclínicos en animales modelo de EA han sido insatisfactorios. Aproximadamente, el 99,6% de estos han sido interrumpidos, lo cual, en parte, podría deberse a la traslación prematura a la clínica. Aunque algunos resultados de investigaciones preclínicas resultaron muy prometedores en modelos animales, abordaban aspectos limitados de la patología de la EA, lo que podría justificar su falla (Götz, Bodea, y Goedert 2018).

El modelo murino PDAPPJ20 empleado en esta Tesis, ha sido ampliamente utilizado en la investigación de la EA debido a su capacidad para recapitular algunas de las características claves de esta enfermedad neurodegenerativa en humanos. Como se mencionó anteriormente, estos roedores llevan el transgén de la proteína APP humana con las mutaciones Swedish e Indiana, lo que resulta en una sobreproducción de péptido beta-amiloide (A β) y una acumulación de placas amiloides.

Aunque el modelo PDAPPJ20 recapitula muchos de los aspectos de la patología asociada con la EA, como la inflamación y la disfunción sináptica, no muestra una tauopatía prominente como se observa en la enfermedad humana, aunque se ha reportado evidencia de un aumento de los niveles de tau hiperfosforilada (Simón et al. 2009; Mucke et al. 2000).

Entre las limitaciones también se encuentra la diferencia entre la cinética de aparición de ciertas alteraciones. Por ejemplo, el déficit cognitivo es uno de los primeros cambios observables, desde los tres meses, mientras que en humanos suelen presentarse con una patología amiloide ya establecida (Ameen-Ali et al. 2019). También, algunos de los modelos murinos transgénicos suelen desarrollar patología en un período de tiempo mucho más corto que los humanos, por lo que podrían no reflejar con precisión la progresión temporal de la EA en pacientes. En ese sentido, la cepa empleada muestra una evolución progresiva de la patología.

Otro aspecto relevante para esta Tesis es que los ratones y los humanos pueden tener respuestas inmunológicas específicas que difieren, lo que puede afectar la interpretación de los resultados de estudios relacionados con el sistema inmunológico en modelos murinos, como las vías de activación de citoquinas. Para el caso de tratamientos potenciales que se dirijan al sistema inmunológico, como es el empleo de Gal1, sería necesario evaluar las diferencias y similitudes entre las especies. También, las intervenciones que modifican el sistema inmunológico pueden tener efectos secundarios diferentes en ratones y humanos, lo que podría limitar la traslación a la clínica. Existen modelos dirigidos a subsanar esta limitación, por ejemplo, modelos murinos con sistemas inmunológicos humanizados, que reciben células inmunológicas humanas. También es esencial la validación en muestras humanas, como el análisis de tejido cerebral *post mortem* de pacientes con EA muestras de LCR y/o plasma sanguíneo.

Si bien la investigación rigurosa implica la reproducibilidad de los resultados y que las condiciones del ambiente permanezcan estables, la EA se encuentra influenciada por factores ambientales y el estilo de vida. En este sentido, los modelos y condiciones experimentales utilizadas para la investigación no recapitulan la influencia de estos factores. Otra dificultad que se presenta es la multicausalidad de la EA, ya que los modelos murinos transgénicos que se centran en aspectos específicos de la patología, como la acumulación de placas de beta-amiloide, podrían no estar reflejando completamente la complejidad de la enfermedad

humana. Siempre que sea posible, complementar la investigación utilizando más de un modelo o con otros enfoques, como estudios epidemiológicos y análisis de tejidos humanos, es esencial para obtener una comprensión más completa de la enfermedad.

Consideraciones del esquema de tratamiento empleado

La selección de la edad de tratamiento se justifica en que, a los 12 meses, los ratones PDAPPJ20 presentan un estado establecido de la EA, con una carga significativa de placas amiloides, neuroinflamación y déficits cognitivos establecidos. Esta etapa de la enfermedad refleja más de cerca la presentación clínica en humanos cuando los pacientes buscan tratamiento médico, ya que, al contrario de lo que suele suceder en los modelos animales, en humanos los síntomas cognitivos aparecen luego de los cambios histopatológicos. Por lo tanto, estudiar los efectos del tratamiento en este punto proporciona información relevante sobre cómo las terapias pueden afectar a los pacientes en un estado sintomático de la enfermedad. Además, aunque la intervención temprana podría ser beneficiosa teóricamente, la falta de diagnóstico temprano limita la viabilidad translacional de dichas investigaciones.

Por estas razones, el tratamiento preventivo en etapas tempranas de la enfermedad, como a los 6 meses en ratones PDAPPJ20, no reflejaría la realidad clínica actual y no abordaría la necesidad de investigar terapias para pacientes en etapas más avanzadas de la enfermedad.

La mayoría de los ensayos clínicos de terapias modificadoras del curso de la EA se centran en pacientes en etapas más tempranas de la enfermedad, con escaso déficit cognitivo. La selección de estos pacientes se basa en el diagnóstico neuropsicológico y niveles elevados de A_β 1-42. Por lo tanto, existe una brecha para la investigación de todos los pacientes que presentan mayores alteraciones tanto cognitivas como estructurales, como la presencia de daño vascular.

Estudiar los efectos del tratamiento a los 12 meses en ratones PDAPPJ20 no solo proporciona información relevante para comprender cómo las terapias pueden afectar a pacientes en etapas sintomáticas de la enfermedad, sino que también contribuye a limitar esta brecha en la investigación clínica al abordar una etapa de la enfermedad que actualmente carece de opciones terapéuticas efectivas, ya que los únicos medicamentos que modifican el curso de la enfermedad, los anticuerpos monoclonales, sólo son recomendados para casos leves de

EA. En resumen, el esquema de tratamiento a los 12 meses en ratones PDAPPJ20 se justifica por su relevancia para el estado sintomático establecido de la EA, la falta de tratamientos preventivos aprobados y la necesidad de investigar terapias para pacientes en etapas más avanzadas de la enfermedad.

Por otro lado, se deben considerar algunas de las limitaciones del protocolo empleado. Una limitación importante de este estudio es la falta de evaluación de la duración a largo plazo de las mejoras observadas posterior al tratamiento con Gal1. Aunque se han demostrado mejoras significativas en la memoria espacial, la reducción de depósitos amiloideos y vasculares, y el restablecimiento de la integridad vascular en ratones PDAPPJ20, no se evaluó si estos efectos persisten después de la interrupción del tratamiento. Sería importante realizar un seguimiento a largo plazo para determinar si las mejoras son sostenidas o si hay un efecto de rebote después de suspender el tratamiento.

Otra limitación relevante es la falta de evaluación de posibles efectos secundarios asociados con el tratamiento con Gal1. Aunque hemos observado mejoras en los parámetros cognitivos y patológicos, no evaluamos cambios en la periferia ni los efectos a largo plazo del tratamiento. Sería importante realizar estudios adicionales para investigar posibles efectos adversos en otros órganos o sistemas, así como evaluar la seguridad a largo plazo del uso de Gal1 en el tratamiento de la EA. En este contexto, estudios realizados por el Laboratorio de Glicomedicina (IBYME, CONICET) no revelaron efectos secundarios significativos a nivel histopatológico o hematológico en el modelo EAE de esclerosis múltiple, posterior al tratamiento con Gal1 (datos aún no publicados).

Por último, como consecuencia de una limitación en cuanto a la disponibilidad de ratones y los diversos experimentos a los que fueron destinados, en esta Tesis se utilizaron tanto machos como hembras, distribuidos de la manera más equitativamente posible. Si bien por la capacidad del tratamiento de lograr una respuesta consistente, debido al estadio de la patología o como resultado del genotipo de los ratones, observamos resultados consistentes dentro de cada grupo experimental, poder contar con poblaciones de ambos sexos enriquecería el trabajo y permitiría un mejor entendimiento del impacto del Gal1.

El abordar estas limitaciones con profundidad permitiría una mejor comprensión de la eficacia y seguridad de Gal1 como una terapia potencial para la EA.

También podemos destacar algunas consideraciones sobre el empleo de modelos simplificados *in vitro*. Estos estudios permiten un control experimental preciso sobre las condiciones de cultivo celular, lo cual facilita la manipulación de variables específicas y la realización de experimentos controlados. Esto puede ayudar a identificar y comprender los mecanismos subyacentes a nivel celular sin la interferencia de otros factores. Por ello, se pueden realizar análisis moleculares detallados, como las RT-PCR y actividad de proteínas en las HBMEC realizadas en esta Tesis. En general, los esquemas *in vitro* pueden alinearse con la reducción de animales en la investigación biomédica, lo que puede ser éticamente favorable y responder a principios de las 3Rs (Reducción, Refinamiento y Reemplazo) en el uso de animales en experimentación.

Sin embargo, se encuentran ciertas desventajas en el uso de cultivos celulares, especialmente monocultivos. Los estudios *in vitro* suelen carecer de ciertas señales bioquímicas, factores sistémicos como hormonas y metabolitos circulantes, la comunicación intercelular y las condiciones del entorno, y pueden no traducirse directamente a la respuesta observada en un organismo vivo. Por ello, su relevancia clínica puede ser limitada.

Aquí, se utilizaron células HBMEC expuestas a A β para evaluar el efecto de Gal1. Aunque este enfoque proporciona información útil sobre los efectos directos de Gal1 en las células endoteliales, no refleja las interacciones celulares y el microambiente presente en el cerebro, donde son de suma relevancia para la BHE las células VSMCs o pericitos y astrocitos. Sin embargo, los resultados *in vitro* pueden proporcionar información valiosa sobre los mecanismos subyacentes de una enfermedad y el efecto de una intervención terapéutica. Es fundamental reconocer que los estudios *in vitro* son una herramienta importante en la investigación biomédica, pero deben interpretarse con cautela ya que pueden no reflejar mecanismos o procesos fisiológicos que ocurren *in vivo*. Es importante validar los hallazgos *in vitro* en modelos animales u organoides humanos y, en última instancia, en ensayos clínicos en humanos para establecer la eficacia y seguridad de un tratamiento potencial.

Limitaciones técnicas

Si bien se ha tratado de realizar un trabajo lo más integral posible con las herramientas a nuestro alcance y en el tiempo dedicado a esta Tesis, haber incluido ciertas técnicas y haber

contado con conocimientos adicionales podrían haber influido en los resultados y las interpretaciones del estudio. Por lo general se tratan de técnicas costosas y especializadas, de las que no disponemos. Aquí se discuten algunas de ellas y cómo pueden ayudar a una evaluación más profunda de este trabajo.

En principio la inclusión de técnicas avanzadas de imágenes, especialmente microscopía de alta resolución, resonancia magnética nuclear y la microscopía de superresolución, pueden proporcionar información detallada sobre la estructura y función cerebral a nivel molecular y subcelular con más detalle. En este contexto, estas técnicas podrían haber contribuido a evidenciar con más detalle la marca y localización de Gal1 en el hipocampo. Proponemos llevarlas adelante en un futuro próximo.

En segundo lugar, el análisis completo del proteoma cerebral podría haber permitido identificar cambios en la expresión y la modificación de proteínas asociadas con la EA y la respuesta al tratamiento con Gal1. Este análisis es altamente costoso, requiere equipos especializados y experiencia técnica en proteómica, dificultando su accesibilidad. Este análisis hubiera complementado los resultados de RNA-seq otorgando información que compruebe que los cambios transcripcionales en los niveles de ARNm se condicen con la expresión diferencial de las proteínas correspondientes.

Otro aspecto que hubiese fortalecido esta Tesis, es la evaluación de los efectos funcionales de la vasculatura. Por ejemplo, explorar el flujo sanguíneo cerebral y la actividad metabólica, a través de técnicas como la ultrasonografía Doppler transcraneal o la tomografía por emisión de positrones (PET). Esto hubiese permitido detectar cambios en el suministro de sangre en los animales Tg-Veh, y su respuesta al tratamiento terapéutico con Gal1.

Por último, el análisis de los perfiles de expresión génica a nivel de una sola célula (*Single-Cell Seq*) en células endoteliales podría haber permitido una comprensión más detallada de los efectos de Gal1 en la expresión génica y los procesos biológicos específicos a estas células *in vivo*.

Respecto a los resultados *in vitro*, las HBMEC crecen estableciendo una monocapa que presenta uniones estrechas que, como se ha reportado anteriormente, demuestran ser la línea celular humana más adecuada para un modelo de BHE entre diversas líneas de células endoteliales de microvasculatura cerebral (Eigenmann et al. 2013). Sin embargo, se ha observado que, en determinadas condiciones, la presencia de proteínas de unión estrecha

varía y que no todas ellas se expresan de manera uniforme, encontrándose que algunas se detectan de manera uniforme en los contactos célula-célula, mientras que otras se encuentran en *clusters* (Liebner et al. 2000). Quizás esto explique que en la condición control, no se observó la presencia de esta proteína en la membrana celular en todas las células, lo que dificultó un análisis cuantitativo. Se repitió el experimento, variando los tiempos de crecimiento de las células obteniendo resultados similares. Sería necesario en un futuro, evaluar otras proteínas de unión estrecha, como zonula occludens y VE-cadherina. Por lo general, lo reportado en este trabajo coincide con la literatura, ya que otros autores presentan los datos de mediciones cuantitativas de TEER y/o ensayos de permeabilidad acompañado de imágenes cualitativas señalando la localización de proteínas estrechas (Hollmann et al. 2017; W. Li et al. 2013; Savettieri et al. 2000). Más recientemente, se han desarrollado nuevos sistemas de BHE *in vitro* dirigidos a optimizar estos modelos empleando sistemas de microfluídica sobre la superficie de las células, lo que contribuye a una formación de monocapas de morfología más similar a la encontrada *in vivo* y con mayores valores de resistencia eléctrica transendotelial, lo que se asocia a mayor expresión de proteínas de unión estrecha (Nair et al. 2023; Salman et al. 2020; Cucullo et al. 2008). La incorporación de flujo dinámico en el sistema de cultivo, sin embargo, plantea desafíos técnicos, logísticos y económicos significativos en comparación con los modelos transwell que permiten investigaciones de alto rendimiento con manipulaciones experimentales relativamente simples (Daniels et al. 2013).

En un futuro, a partir de mayor investigación y colaboraciones, podrían abordarse algunos de estos aspectos, mediante estas u otras técnicas, para obtener una comprensión más cabal de los efectos de Gal1 en la EA y, en particular, la vasculatura cerebral.

Conclusión

No existiendo tratamientos adecuados para la EA, la necesidad de nuevas terapias que aborden los distintos aspectos y cambios biológicos incluyendo la neuroinflamación y la disfunción vascular subyacentes a la patología es imperativa.

Gal1 surge como un potencial tratamiento terapéutico en el contexto de la EA debido a los antecedentes que la asocian a efectos antiinflamatorios, neuroprotectores y vasculoprotectores. La consistente evidencia obtenida tras el tratamiento de los ratones PDAPPJ20 es sumamente promisoria, abarcando diversas aristas de los procesos involucrados en la patología.

Por otro lado, algunas revisiones bibliográficas han sugerido un cambio de paradigma proponiendo a las células endoteliales como un blanco relevante en la EA. Esto se basa en la robusta evidencia de la disfunción vascular reportada tanto en pacientes como en modelos experimentales, y la falta de terapias dirigidas a subsanar este problema.

En este sentido, la presente Tesis aporta novedosas pruebas sobre los mecanismos que subyacen a la disfunción endotelial en la EA. El análisis de procesos de la UPR e inflamación en las HBMEC en el contexto de la EA puede proveer un nuevo blanco terapéutico para el desarrollo de terapias que mejoren la función vascular, e incluso proponer un posible empleo de Gal1 con este fin. Por otro lado, la modulación del estrés de RE por Gal1 constituye la primera asociación de fenómenos de proteostasis celular y Gal1.

En este escenario, la presente Tesis revela nuevos conocimientos desde fenómenos básicos hacia la propuesta de una nueva estrategia como potencial tratamiento en EA avanzada, y los diferentes mecanismos involucrados en la modulación de esta patología, fundamentalmente aquéllos que impactan sobre circuitos inmunológicos, neuronales y vasculares.

Metodología experimental

Experimentos *in vivo*

Animales

Para esta tesis se emplearon ratones de la cepa PDAPPJ20 (Galvan 2006, Robertson 2007, Mucke 2000) que portan en hemicigosis un transgén que les permite expresar la proteína APP humana con las mutaciones Swedish (K670N/M671L) e Indiana (V717F) bajo el control del promotor de la cadena β del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF β). La colonia se mantuvo mediante cruces con ratones C57BL/6j (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBYME-CONICET; Certificado de Garantía NIH #A5072-01). Los ratones se alojaron en condiciones controladas de temperatura (22°C) y humedad (50%) con ciclos de luz/oscuridad de 12 h/12 h.

Para la identificación del genotipo de cada animal, en el momento del destete se extrajo una muestra de tejido de la cola que se utilizó para la extracción de ADN y posterior PCR empleando primers específicos para el transgen humano.

Tratamiento con Galectina-1

Los ratones transgénicos (Tg) PDAPPJ20 utilizados en este estudio eran hemicigotos para el transgén, como se confirmó mediante PCR con *primers* específicos. Los ratones no transgénicos (NTg) compañeros de camada fueron utilizados como grupo control. Galectina-1 recombinante (Gal1) se administró a ratones PDAPPJ20 de 12 meses de edad mediante inyección i.p. inyecciones (100 μ g diluidos en 100 ml de solución salina) tres veces por semana durante tres semanas en el esquema de lunes-miércoles-viernes. La selección de la dosis de Gal1 se basó en trabajos publicados anteriormente (Rabinovich et al, 1999; Starossom et al, 2012). Se administró solución fisiológica (vehículo: Veh) como control. El esquema experimental de las inyecciones se muestra en la Figura 38. Las pruebas de comportamiento se realizaron durante la última semana (prueba de campo abierto, prueba de reconocimiento de locación novedosa de un objeto) o 72 h después de finalizar los tratamientos (laberinto en Y).

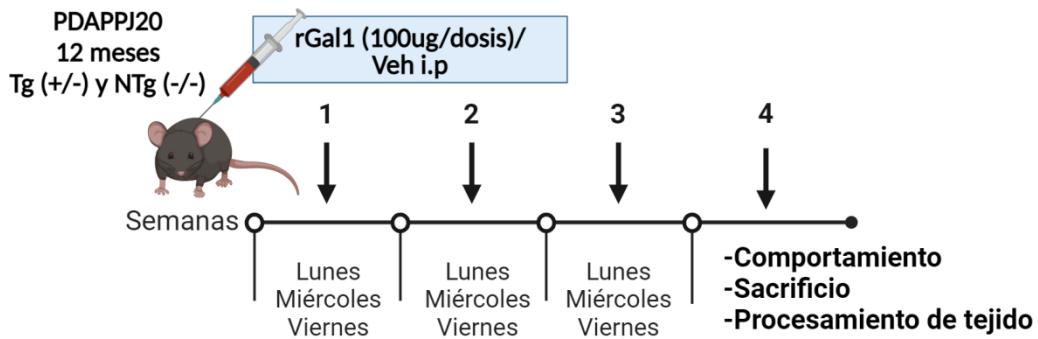


Figura 39. El tratamiento con Gal1 en ratones PDAPPJ20. Esquema experimental de la administración Gal1 en ratones NTg y Tg PDAPPJ20 de 12 meses. Gal1 se administró i.p. 100 µg en 100 µl de solución fisiológica por inyección, 3 dosis por semana durante 3 semanas. La prueba de campo abierto se realizó durante la última semana del tratamiento. Al finalizar el esquema de inyecciones, se emplearon las pruebas comportamentales de locación novedosa de un objeto y de laberinto en Y el para evaluar la memoria espacial. El sacrificio y procesamiento de tejido se detalla en el cuerpo de esta sección.

Pruebas de comportamiento.

Las pruebas comportamentales se condujeron en animales entre las 8:00 y las 14:00 h durante el período de luz, con una densidad de iluminación de aproximadamente 50 a 100 lx en el centro de la sala de pruebas. Primero se realizó la prueba de campo abierto, seguida de la prueba de reconocimiento de ubicación de objetos novedosos (NOL) con un intervalo de 1 semana. El reconocimiento de ubicación de objetos novedosos (NOL) o las pruebas del laberinto Y se llevaron a cabo en grupos experimentales separados.

Campo abierto. La prueba de campo abierto se realizó para evaluar la locomoción y el comportamiento similar a la ansiedad, como informamos anteriormente (Beauquis et al 2014, Vinuesa et al 2016). Brevemente, ratones (NTg n=12, Tg =12 y Tg+Gal1=6) se colocaron en el centro de la arena y la exploración se analizó a partir de archivos de video durante los primeros 5 minutos utilizando el software de análisis ANY-maze (Stoelting Co, EE. UU.). Se cuantificó la distancia total recorrida (metro).

Prueba de reconocimiento de ubicación de objetos novedosos. La prueba de NOL se realizó como se publicó anteriormente (Beauquis et al 2014, Vinuesa 2016, 2019, Gregosa 2019) para estudiar la memoria espacial dependiente del hipocampo. Brevemente, ratones (NTg-Veh n=8, NTg-Gal1=4, Tg-Veh n=5 y Tg+Gal1=4) estaban debidamente habituados a la sala de pruebas y a la caja negra donde se llevó a cabo la prueba. La prueba consistió en dos

pruebas de 10 minutos (prueba de muestra o T1 y prueba de prueba o T2), que fueron grabadas con una cámara de video, separadas por un intervalo entre pruebas de 1 h. En T1, los ratones fueron expuestos a dos objetos de plástico idénticos que se colocaron en dos esquinas contiguas seleccionadas, mientras que en T2, uno de los objetos se movió a una ubicación nueva en la esquina opuesta al objeto no desplazado. Los criterios para la inclusión de datos consideraron un umbral de 20 s de exploración de objetos y ninguna preferencia de ubicación en T1. El desempeño se evaluó con un índice de discriminación teniendo en cuenta la exploración novedosa en relación con la ubicación conocida dentro del tiempo total de exploración en T2.

Laberinto en Y. La memoria espacial dependiente del hipocampo se evaluó adicionalmente con la prueba del laberinto en Y, que se realizó como se informó anteriormente (Vinuesa 2016, Gregosa 2019). Brevemente, después de una habituación adecuada a la sala de pruebas, los ratones (NTg-Veh n=8, NTg-Gal1=5 Tg-Veh n=5 y Tg-Gal1=6) Se les permitió explorar la plataforma del laberinto en Y de tres brazos. La prueba consistió en dos etapas de 10 minutos (prueba de muestra o T1 y prueba de memoria o T2) que fueron grabadas para su posterior análisis, separadas por un intervalo entre pruebas de 4 horas. Durante T1, a los ratones se les permitió explorar dos de los tres brazos, mientras que durante T2, el tercer brazo estaba accesible para la exploración. El comportamiento en T2 se evaluó como el porcentaje de tiempo de exploración en el nuevo brazo durante los dos primeros minutos tras salir del brazo central del ensayo de prueba, sobre el tiempo total. Se excluyeron los ratones que mostraron preferencia en T1 o no abandonaron el brazo central antes del primer minuto de T2.

Campo Abierto

Se realizó una prueba de campo abierto para evaluar la locomoción tal y como se informó previamente por nuestro laboratorio (Beauquis et al 2014, Vinuesa et al 2016). El dispositivo utilizado consistió en una plataforma de madera revestida con melamina blanca de 55 x 55 cm² de área con paredes de 25 cm de altura. Los animales (Tg-Veh n=7 y Tg-Gal1 n=7) se colocaron en el centro de la arena y se analizó la exploración durante 5 min a partir de archivos de video con el software de análisis "Any-maze" (Stoelting Co, USA). Los resultados se expresan como "distancia total recorrida" (cm).

Obtención de tejido cerebral

Los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de ketamina (80 mg/kg BW; Holliday-Scott, Argentina) y xilacina (10 mg/kg BW; Bayer, Argentina).

Luego de comprobar la ausencia de reflejos, fueron perfundidos transcardíacamente con 20 ml de solución fisiológica seguidos de 20 ml de paraformaldehído 4% en buffer fosfato salino (PBS: 0.1 M, pH 7.4), excepto los animales cuyos cerebros fueron destinados a la extracción de ARN y destinados a la tinción con rojo Congo, que fueron decapitados sin perfundir, se diseccionó el hipocampo y se congeló en el momento. Los cerebros fueron removidos del cráneo, seccionados ambos hemisferios y fijados a 4°C durante una noche. Luego el tejido fue cortado coronalmente con vibratomo en secciones de 60 µm de espesor (Vibratome 1000P). Los cortes resultantes se guardaron a -20°C en una placa de 48 pocillos embebidos en solución crioprotectora (25% glicerol, 25% etilenglicol, 50% buffer fosfato 0.1 M, pH 7.4) hasta su uso, de forma tal que en cada pocillo hubiere 6 cortes equidistantes a lo largo del eje dorsal-ventral, representativos de la totalidad del hipocampo.

El cerebro de los animales que recibieron la solución de Evans Blue intravenoso, no fueron utilizados para otros análisis posteriores. El tejido cerebral fue destinado a distintos experimentos y, por lo tanto, recibieron distintos tratamientos (perfundidos para inmunofluorescencia, Evans Blue previo a perfusión, o sin perfundir para rojo Congo -y posterior utilización para el estudio de la reactividad y funcionalidad microglial, resultados no presentados aquí-). El número total de animales utilizados que no recibieron Evans Blue fue 22, de las cuales 12 fueron hembras, distribuidas uniformemente entre los grupos analizados. Debido a esto, sumado a que obtener ratones de 12 meses que reciban tratamiento presentó cierta dificultad, el grupo NTg que recibió Gal1 no llegó a un número adecuado para su inclusión en todos los resultados.

Se hicieron todos los esfuerzos posibles para reducir la cantidad de ratones utilizados en el estudio, así como para minimizar el sufrimiento y la incomodidad de los animales.

Ensayo de permeabilidad de la BHE

Se administró por vía intravenosa (vena de la cola) 100 uL de una solución conteniendo Azul de Evans (*Evans Blue*, EB) al 2% en solución salina, un trazador fluorescente de 65 kDa de

peso molecular (Figura 39). En sangre, EB se conjuga con la proteína albúmina y sólo atraviesa la barrera hematoencefálica ante un estado de pérdida de la integridad vascular. Luego de 15 minutos de circulación, se anestesió a los ratones hasta la pérdida de reflejos y los ratones se perfundieron transcardíacamente con 20 mL de solución salina seguidos de 20 mL de paraformaldehído al 4%. Los cerebros se diseccionaron y fijaron como se ha descrito anteriormente. Se realizaron cortes de 60 μ m conteniendo hipocampo con vibrátmomo como se especificó anteriormente y 6-7 secciones por animal se colocaron sobre portaobjetos pretratados con gelatina y los cubreobjetos se montaron empleando alcohol polivinílico con DABCO (Sigma). Para este experimento se destinó un total de 19 animales que recibieron la inyección de Evans Blue, de los cuales 10 fueron hembras, distribuidas uniformemente entre los grupos analizados.

Se adquirieron imágenes confocales Z-stack con un intervalo de 2 μ m del hilio del hipocampo de cada sección a una longitud de onda de emisión de fluorescencia de 680 nm para la visualización del colorante. La densidad óptica del colorante en la región del hilio del hipocampo se analizó en las imágenes de proyección Z para stack de imágenes, utilizando el software ImageJ.

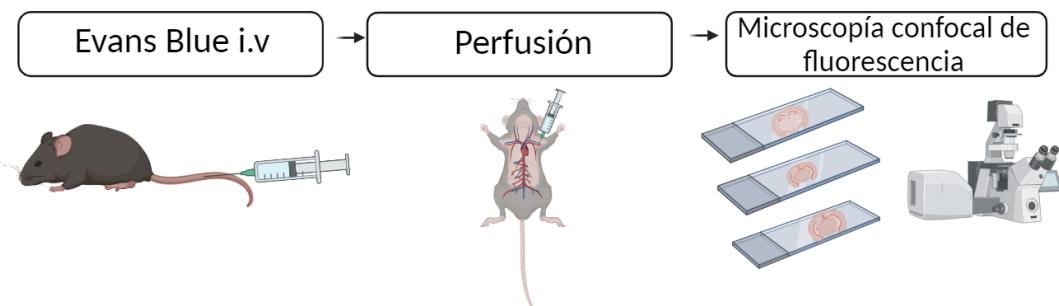


Figura 39. Esquema del protocolo para la evaluación de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica mediante inyección i.v. de 100 μ l de azul de Evans (Evans Blue) al 2% 15 min antes de la perfusión con 20 ml de solución salina y 20 ml de PFA 4%. Luego de un breve lavado en PBS, los cerebros fueron fijados durante 12 hs en PFA 4%. Se lavaron con PBS y se cortaron secciones coronales de 60 μ m conteniendo hipocampo, empleando un vibrátmomo. Los cortes se colocaron directamente en portas para su montaje con Dabco. Se obtuvieron imágenes de Z-stack del hilio del hipocampo de cada corte en microscopía confocal para su posterior análisis.

Inmunofluorescencia

Para cada experimento de inmunofluorescencia, se emplearon 6 secciones conteniendo hipocampo por cerebro de cada ratón (distancia de intersección = 300 μ m aproximadamente) utilizando una técnica de *free floating* (inmersos completamente en solución). Las secciones se lavaron 3 veces por 10 min en PBS para eliminar la solución crioprotectora y luego se incubaron en buffer citrato de pH 6 durante 30 minutos a 85°C para la recuperación del antígeno. Los sitios de unión inespecíficos se bloquearon utilizando suero de cabra al 10% en PBS con Triton x-100 al 1% durante 30 minutos. La incubación con anticuerpos primarios se realizó durante la noche a 4°C en un agitador orbital. Para la visualización de la vasculatura, a la solución de anticuerpo primario se le adicionó lectina de *Lycopersicum esculentum* acoplada a fluoresceína (Vector) a una concentración 1:400. La incubación con anticuerpos secundarios apropiados (Alexa fluorescente 488, 555, Invitrogen, Vector Labs) se realizó durante 2 horas a temperatura ambiente en solución de bloqueo. Finalmente se realizaron 3 lavados con PBS (5 min cada uno), se colocaron los cortes en portaobjetos pretratados con gelatina y los cubreobjetos se montaron empleando alcohol polivinílico con DABCO (Sigma). Para todas las inmunofluorescencias, la posterior adquisición y el análisis de imágenes se realizaron a ciegas con respecto al grupo experimental. Los detalles de cada inmunofluorescencia se explican a continuación.

Inmunofluorescencia para 4G8 acoplada a tinción con lectina de tomate unida a Fluoresceína

chequear triton La incubación con solución de bloqueo conteniendo suero de cabra se realizó al 3% en PBS-Tritón 0.1 % durante 30 min a temperatura ambiente. El anticuerpo anti-4G8 se utilizó una concentración de 1/700 4G8 (Invitrogen, hecho en ratón). Se utilizó el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón unido al fluoróforo Alexa 555 (Invitrogen) durante 1 hora a temperatura ambiente con solución de bloqueo.

Inmunofluorescencia para GFAP acoplada a tinción con lectina de tomate unida a Fluoresceína

Se utilizó como anticuerpo primario anti-GFAP (Sigma, 1:500, hecho en conejo). El anticuerpo secundario utilizado fue anti-IgG de conejo unido al fluoróforo Alexa 555 (Invitrogen). Se continuó con el protocolo anteriormente detallado.

Inmunofluorescencia para Gal1 acoplada a tinción con lectina de tomate unida a Fluoresceína

La solución de bloqueo empleada para esta inmunomarcación fue 2% leche en polvo en Anti-Gal1 (rabbit anti-human) 1/1000 1% suero goat en PBS-tritón 0.1% ON 4°C tal como se describió previamente (Croci et al. 2012). Se utilizó el anticuerpo secundario anti-rabbit Alexa 555 1/1000 + 1% suero goat en PBS-tritón 0.1% 60' RT

Inmunofluorescencia para acuaporina-4 acoplada a tinción con lectina de tomate unida a Fluoresceína

Se utilizó un anticuerpo primario anti-Acuaporina-4 (Santa Cruz, 1:100, hecho en conejo). El anticuerpo secundario anti rabbit Alexa 555 (Invitrogen) se empleó en una concentración de 1/1000.

Tinción con rojo Congo y análisis de placas amiloides.

Para evaluar las placas amiloides en el hipocampo, se realizó tinción con rojo Congo siguiendo el método informado previamente por Wilcock et al. (2006). Brevemente, se incubaron cortes coronales de cerebro en una solución que contenía 2% de rojo Congo (Biopack, Argentina), 3% de NaCl y 0.01% de hidróxido de sodio en 80% de etanol durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las rodajas se lavaron y se montaron en portaobjetos recubiertos de gelatina, se secaron al aire, se deshidrataron y se aclararon con etanol y xileno. El cubreobjetos se montó utilizando bálsamo de Canadá (Biopack Argentina). Se realizó la tinción en los siguientes ratones: Tg-Veh n=7 y Tg+Gal1 n=10. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio Nikon Eclipse E200 con un aumento de 40x. La adquisición y el análisis de imágenes se realizaron a ciegas con respecto al grupo experimental. El análisis

de imágenes se realizó utilizando el software ImageJ. El área total del hipocampo se delimitó manualmente como área de interés y se midió. Además, se delimitaron manualmente las placas teñidas de rojo Congo y se obtuvo el número y el tamaño de las placas por sección. Se cuantificó tanto la carga amiloide, que indica el porcentaje de área cubierta por placas, como la densidad de placas, que se refiere al número de placas por área. A partir del número y tamaño de las placas, se cuantificó el número de placas en categorías de tamaño de 0 a 350 μm^2 , con intervalos de 50 μm^2 , obteniendo el gráfico de frecuencias para cada animal y grupo.

Análisis de imágenes de inmunofluorescencia.

Para todas las inmunofluorescencias, las imágenes se tomaron de distintos planos cada 1 o 2 μm a lo largo del eje Z (Z-stack) de los cortes coronales del cerebro, en la región del hilio del hipocampo. El análisis de imágenes se realizó utilizando el software ImageJ. Se tomaron imágenes de microscopía confocal con el mayor aumento posible (objetivo de 60X) para un procesamiento preciso de la localización de estas marcas. La toma de imágenes se realizó de la misma manera para todas las inmunofluorescencias en tejido realizadas en esta Tesis

Análisis de colocalización

Depósitos vasculares de A β en el hilio del hipocampo - Colocalización de la vasculatura con XBP1 y Gal1 - Contactos astrocitos-endotelio

Se analizaron los planos en cada corte de cerebro donde el anticuerpo había penetrado de forma uniforme en el tejido (aproximadamente 4 planos por corte), que se analizaron de manera separada y luego se promedió el resultado de las mismas. Por ratón se emplearon 6 cortes de distintos planos coronales del hipocampo. Se confeccionó un macro para la semi-automatización y reproducibilidad del análisis para cada inmunofluorescencia. Brevemente, se identificó mediante un umbral de intensidad y se cuantificó tanto el positiva para el anticuerpo de interés (4G8, GFAP, Gal1 o XBP1), como el área lectina fluorescente positiva Lectina-FITC total, en el canal correspondiente. Se procesaron las imágenes para obtener las áreas que eran positivas para ambas marcas y se cuantificó dicha área de colocalización de ambas

Para las inmunofluorescencias de 4G8, GFAP acopladas a lectina fluorescente y para la tinción de lectina fluorescente, las imágenes se obtuvieron en un microscopio confocal Olympus DSU-IX83 del Instituto IBYME-CONICET.

El índice de vasculatura positiva para 4G8/Gal1/XBP1 se calculó como el porcentaje del área de solapamiento de ambas marcas, respecto al área total Lectina-FITC+. El índice de vasculatura cubierta por pies astrocíticos se calculó como el porcentaje del área de solapamiento de ambas marcas, respecto al área total Lectina-FITC+.

Ensayo de permeabilidad (*Evans Blue*)

Se promediaron las intensidades de cada Z-stack obtenidos en las imágenes correspondientes utilizando la opción de máxima proyección del software ImageJ, de manera de obtener una imagen representativa por campo. Se analizaron dichas imágenes promediadas y en escala de grises mediante el programa FIJI ImageJ. Se estableció un umbral para determinar la señal positiva de EB y se obtuvo el promedio de intensidad de marca (*mean grey value*) en relación al área de interés delimitada manualmente. Se tuvo especial cuenta de evitar hiperintensidades causadas por acumulación del colorante en las zonas aledañas al hilio (región de interés). Luego, se evaluó la presencia de microhemorragias como marcador de disfunción de la microvasculatura. Para la cuantificación de microhemorragias, se determinó el número de infiltraciones de EB en el parénquima cerebral alrededor de los vasos sanguíneos. El reconocimiento de estos eventos se basó en previos reportes en la literatura (Guillén-Yunta et al. 2023; Jiang et al. 2014). Se cuantificó el número de microhemorragias en relación a la región de interés.

Densidad vascular (área ocupada del hipocampo cubierta por vasos Lectina positivos)

La evaluación del área ocupada por vasos se realizó a partir de la inmunofluorescencia de Lectina-FITC. Se promediaron las intensidades de cada Z-stack obtenidos en las imágenes correspondientes utilizando la opción de máxima proyección del software ImageJ, de manera de obtener una imagen representativa por campo. Se analizaron dichas imágenes

promediadas y en escala de grises mediante el programa Óptimas. Se estableció un umbral para determinar la señal positiva de lectina y se obtuvo el área positiva en relación al área de interés delimitada manualmente.

Astrogliosis (densidad de marca reactiva para GFAP por astrocito)

Para el análisis, se seleccionaron los planos como en el caso de los análisis de colocalización. Dichas imágenes se analizaron por separado y luego se promedió el resultado de éstas. Se estableció un umbral para determinar la señal positiva de GFAP y se obtuvo el área positiva total dentro de la región de interés. Para la cuantificación de la astrogliosis, se empleó la densidad total de la marca positiva para GFAP, dividido por el número de astrocitos presentes en el área cuantificada. Luego se promedió el valor de cada corte para tener una medida por animal.

AQP4 en contacto con la vasculatura

Preparación y análisis de imágenes de alta resolución de array tomography

Se deshidrataron secciones de 60 μ m gruesas de tejido en series graduadas de alcohol hasta etanol al 70% (5 minutos en cada paso a temperatura ambiente). Se emplearon 4-5 secciones de 60 μ m por ratón, y se usaron 5-6 ratones por grupo experimental. Posteriormente, se infiltró el tejido en una mezcla 1:3 de etanol al 70% y resina LRWhite (grado medio, SPI Supplies) durante 5 min, y después en LRWhite al 100% (3 veces, 5 min). El tejido se mantuvo en dicha solución una noche a 4°C. Al día siguiente, las secciones se embebieron para formar una lámina/taco de plástico ACLAR (Ted Pella) y se dejaron polimerizar por 24 horas a 55°C. Para realizar los cortes, se aplicó cemento adhesivo (Weldwood Contact Cement) diluido en xileno con un pincel en la parte superior e inferior de la cara del taco para facilitar la recogida de secciones seriadas (Micheva et al., 2010b). Después de que el pegamento se hubiera secado, se cortaron en cintas series de 25 o más secciones de 70 nm de grosor utilizando el Jumbo Histo Diamond Knife (Diatome, Fort Washington, PA) y un ultramicrótomo (Leica Ultracut, Deerfield, IL). Las cintas se montaron en cubreobjetos de vidrio previamente gelatinizados. Los cubreobjetos que contenían cintas se colocaron en una placa caliente (60°C) durante 30

minutos y, a continuación, se almacenaron a temperatura ambiente hasta su procesamiento para inmunofluorescencia. La inmunofluorescencia se realizó como se indicó en la sección correspondiente.

Las imágenes de las secciones seriadas se convirtieron en un bloque y se alinearon utilizando el software Fiji basado en ImageJ y el complemento StackReg (Thevenaz et al., 1998). De cada sección de 60 μm se obtuvieron bloques con al menos 25 imágenes cada una. Los bloques de imágenes se convirtieron en imágenes binarias seleccionando un umbral adecuado y utilizando el plugin JACoP en ImageJ. Posteriormente, se contaron las partículas totales por volumen utilizando el plug-in Object Counter 3D. La colocalización entre la marca de AQP4 y Lectina-FITC se identificó utilizando la operación de multiplicación de la función de calculadora de imágenes. Los datos obtenidos se expresaron como número de puntos por μm^3 de tejido cerebral. Los resultados de cada bloque se promediaron para generar una media por sección y, posteriormente, los resultados por ratón se promediaron conjuntamente.

Muestras de ARN de hipocampo de ratón.

El ARN del hipocampo de ratón se obtuvo como se describió anteriormente (Vinuesa 2019). Brevemente, los hipocampos se homogeneizaron con reactivo Tranzol (Trangen) o Trizol (Life Technologies-Invitrogen, CA, USA) mediante sonicación. El ARN total se extrajo según lo recomendado por el fabricante. La concentración y pureza del ARN extraído total se controlaron midiendo la densidad óptica de las muestras a 260 y 280 nm utilizando un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific USA). El ARN se almacenó a -80 °C hasta ser enviado a secuenciación para obtener los datos crudos del RNA-Seq.

Análisis de secuencia de ARN.

Se recogieron hipocampos completos de ratones tratados con NTg-Veh, Tg-Veh y Tg+Gal1 ($n = 3$). El ARN total se aisló utilizando el protocolo descrito anteriormente. El procesamiento de los datos de la secuenciación se realizó en R empleando paquetes/librerías destinados a tal fin y adaptándolos a nuestro *dataset*. Para el análisis se contó con la colaboración del Lic Joaquín Merlo. La calidad y la integridad del ARN total se evaluaron utilizando Qsep1 (Bioptic). Las bibliotecas de RNA-Seq se prepararon utilizando la biblioteca de ARNm de

cadena TruSeq y la secuenciación de extremos emparejados se realizó utilizando la plataforma de secuenciación Illumina NovaSeq6000. Los datos de secuenciación se procesaron previamente utilizando FastQC y Trimmomatic para eliminar adaptadores y recortar bases de baja calidad. Se utilizó el transcriptoma del genoma de ratón GRCm39 v107 del proyecto ENSEMBL para mapear las lecturas. Se utilizó el software Kallisto para el mapeo y la pseudoalineación. Los recuentos brutos y transcripciones por millón se obtuvieron utilizando el paquete R txlimport. El análisis de expresión diferencial se realizó utilizando las herramientas de software Limma y Voom, y se calculó el cambio de veces (FC) de cada transcripción para identificar genes expresados diferencialmente. Se utilizó el paquete Fgsea para introducir los resultados en el algoritmo GSEA, con genes clasificados por su valor p ajustado transformado (-log10 (valor p adj.)). Esto se hizo para probar el enriquecimiento de las vías de ontología del gen MsigDb a partir de bases de datos de procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares. El paquete GeneSetVariation se utilizó para realizar el análisis de GSVAde las mismas vías, alimentado con recuentos brutos utilizando la estimación del kernel de Poisson. En ambos casos se descartaron conjuntos genéticos con menos de 10 genes o más de 500 genes.

Experimentos *in vitro*

Línea celular HBMEC.

Se trabajó en todo momento en esterilidad, en cabina de flujo laminar utilizando un equipo ESCO modelo AC2-451 en el Instituto de Biología y Medicina Experimental.

Para los ensayos *in vitro* se emplearon células inmortalizadas derivadas de endotelio cerebral humano (HBMEC, por las siglas en inglés de Human Brain Microvascular Endothelial Cells). Esta línea celular fue cedida para su uso en nuestro laboratorio a través de un acuerdo con el Dr. Kwang Sik Kim (Division of Infectious Diseases, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, U.S.A). Estas células se obtuvieron inicialmente a partir de un cultivo primario de células endoteliales de microvasculatura cerebral humana, que fue luego inmortalizado por transfección estable con la construcción pSVT, que permite la expresión del

oncogen SV40-large T bajo la regulación del promotor del virus del sarcoma de Rous (Stins, Badger, y Sik Kim 2001).

HBMEC es una línea celular que expresa proteínas específicas de células que forman la BHE, como VE-cadherina, Zona Occludens-1, Claudina-5, proteínas de adhesión celular e incluso presenta glicoconjungados de superficie específicos de cultivo primario células endoteliales de microvasculatura cerebral (Stins, Badger, y Sik Kim 2001). A su vez, ha sido reportada su capacidad de formar una monocapa in vitro con altos valores de resistencia eléctrica y baja permeabilidad al transporte paracelular (Eigenmann et al. 2013). Por ello, estas células han sido utilizadas en numerosos estudios como modelo de la BHE (Li, Bruno, y Kim 2021; Miraglia et al. 2018; Eigenmann et al. 2013; Siddharthan et al. 2007; Stins et al. 2003).

Mantenimiento de la línea celular

Para el mantenimiento de la línea celular se empleó medio de cultivo RMPI 1640 (Gibco) suplementado con Nu Serum (Corning) 10 %, Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco) 10 %, piruvato 0.055 mg/mL, penicilina 100 µg/ml, estreptomicina µg/ml, glutamina 2 mM, MEM vitamin solution (Sigma) 1%, MEM Non-Essential Amino Acids Solution 1%. La línea de células endoteliales HBMEC se mantuvo en una atmósfera húmeda a 37°C, 5% CO₂ y 95% aire, en medio HBMEC en botella T75. El medio se cambió regularmente cada 2- 3 días. Cuando el cultivo logró una confluencia igual o superior al 80%, se levantaron las células mediante un breve tratamiento con tripsina (0.05 % en proporción 50:50 medio Versene y medio Earle, 2 min a 37°C) seguido de inactivación con medio RPMI + SFB 10%, para su resembrado a menor concentración.

Péptidos Aβ 1-40

Los péptidos Aβ 1-40 (Sigma) se almacenaron en una concentración de 50 µM en DMSO. Para obtener péptidos fibrilados de cada especie se ha procedido según las condiciones óptimas de fibrilación reportada por otros autores, que favorece la formación de fibrillas insolubles de Aβ (Paranjape et al. 2012). Brevemente, los mismos fueron incubados a una concentración final de 5 µM en agua estéril durante 72 hs a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂, y luego disueltos en el medio de mantenimiento hasta la concentración final de

trabajo. Este procedimiento se realizó antes de exponer las células HBMEC para todos los experimentos *in vitro* que se muestran en esta tesis.

Galectina-1 recombinante

La Gal1 recombinante se produjo y purificó como se ha descrito previamente (Barrionuevo et al. 2007). En resumen, se transformaron células *E. coli* BL21 (DE3) con plásmidos de expresión construidos mediante sistemas de expresión pET (Novagen) y se indujo la producción de Gal1 recombinante mediante la adición de 1 mM de isopropil-D-tiogalactósido. Se obtuvieron fracciones solubles para su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad en una columna de lactosil-Sefarosa (Sigma-Aldrich). La contaminación potencial por LPS se eliminó cuidadosamente mediante Detoxi-Gel (Pierce) y se analizó con un Gel Clot Limulus Test (<0,5 IU/mg; Associates of Cape Cod, Falmouth, MA, EE.UU.).

Protocolo tratamiento

El mismo protocolo de exposición y tratamientos de las HBMEC se realizó para todos los ensayos *in vitro*. Las células se sembraron en el medio de mantenimiento previamente descrito hasta que adopten una morfología según esperada. Para los ensayos, se cambió a medio fresco adicionado según el grupo experimental correspondiente. Las HBMEC recibieron: medio de mantenimiento fresco sin otro estímulo (grupo control), con A β 1-40 0.1 μ M (grupo A β 1-40), Gal1 15 μ g/ml (grupo Gal1) o ambos A β 1-40 0.1 μ M y Gal1 15 μ g/ml (grupo A β +Gal1) durante 24 horas (Figura 40)

Tratamientos HBMEC				
Vehículo	A β 1-40	Gal1	A β 1-40 + Gal1	
A β 1-40 0.1 μ M	✗	✓	✗	✓
Gal1 15 μ g/ml	✗	✗	✓	✓

Figura 40. Tratamientos que recibieron las células HBMEC de los distintos grupos experimentales.

MTT

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT; SCBT, USA) en un compuesto coloreado de color azul (formazán) realizada por la enzima mitocondrial succinatodeshidrogenasa. La cantidad de células metabólicamente activas es proporcional a la cantidad de formazán producido, lo que permite determinar la actividad mitocondrial de las células tratadas como una medida de viabilidad celular (Mosmann, 1983)

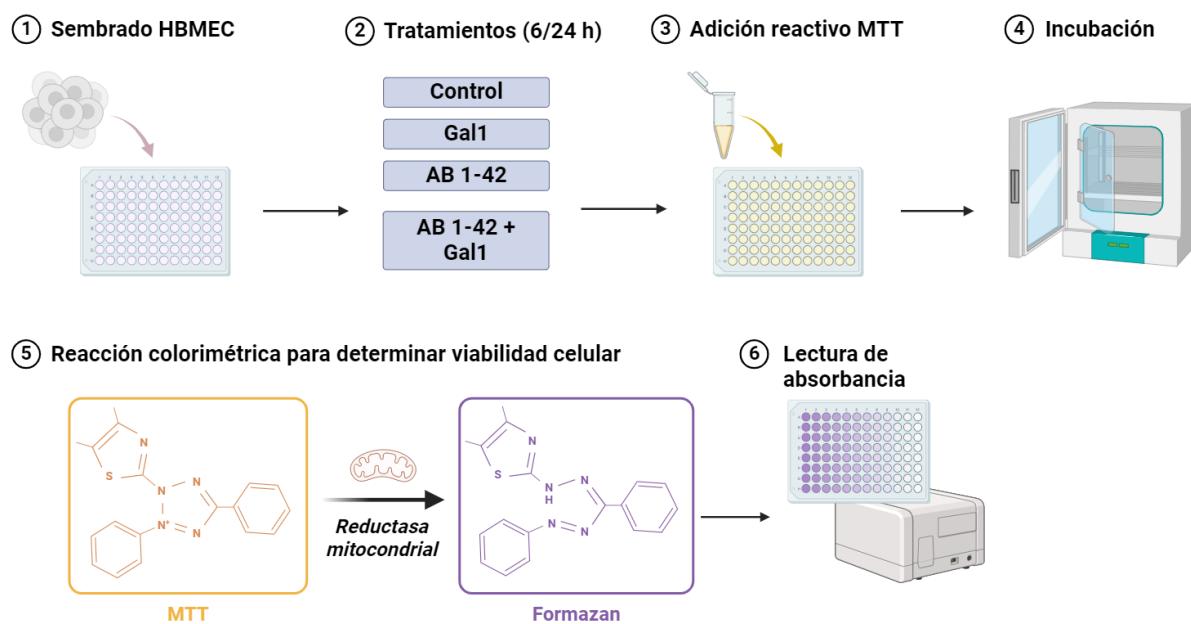


Figura 41. Esquema del ensayo de viabilidad celular MTT. 1) Sembrado de HBMEC en placa de 96 pocillos. 2) Exposición a tratamientos. 3) adición del reactivo MTT. 4) Se incubó en estufa a 37° 5%CO₂ durante 2 h. La reacción colorimétrica en la que se basa este ensayo se detalla en 5). 6) Medición de la absorbancia en espectrofotómetro.

La Figura 41 muestra un esquema del procedimiento del ensayo. Las células HBMEC se expusieron a A_β 1-40 en un rango de concentraciones de 0.01 a 0.5 μM a dos tiempos, por 6 y 24 h (durante la puesta a punto). Luego se realizó el ensayo incubando las células con MTT 0,5 mg/ml durante 30 minutos a 37°C. Luego de 2 h de transcurrida la reacción, los depósitos de formazán fueron solubilizados con DMSO y se midió la absorbancia a 570 nm mediante

un espectrofotómetro de placa (MPR A4i). Se repitió el ensayo para HBMEC que recibieron los tratamientos de A β y/ Gal1 mencionados anteriormente.

Ensayo de resistencia eléctrica transendotelial (TEER)

La Figura 42 muestra un esquema con los distintos pasos del experimento de barrera in vitro. Los insertos de los dispositivos transwell utilizados fueron de 0.3 cm², y el poro de la membrana de 0.04 μ M (Corning). Los dispositivos transwell estériles se colocaron sobre placa de 24 pocillos y se trataron colocando colágeno de cola de rata (extracción casera) en la cara superior de la membrana a una concentración de 5 μ g/ml. En el compartimiento inferior se colocó PBS. Se dejó el colágeno durante media hora y luego se realizaron tres lavados de la membrana con PBS, seguido de un lavado con agua que luego se retiró y se dejó secar. Se puso a punto la cantidad de células sembradas y los tiempos necesarios para la formación de una monocapa estable y sellada. Finalmente, sembraron 40000 células en 200 μ l de medio HBMEC en el compartimiento superior de cada transwell, para que crezcan sobre la membrana. Para el seguimiento de la formación de la monocapa, se monitoreó la resistencia eléctrica transendotelial empleando el equipo EVOM2 (World Precision Instruments). El aparato consiste en un electrodo con dos sondas conectado a una fuente. Ambas sondas cuentan con dos electrodos y se colocan una en cada compartimiento para la medición de la resistencia eléctrica (Figura 42, ítem 2). El EVOM2 produce una corriente alterna desde el electrodo del compartimiento inferior a través de la membrana. El dispositivo informa la resistencia entre ambos electrodos. Las mediciones se realizaron cada 48 horas luego de un cambio del medio de cultivo cada 24 hs. La puesta a punto consistió en el seguimiento de la resistencia de la monocapa, que llegó a un *plateau* de resistencia a los 14 días.

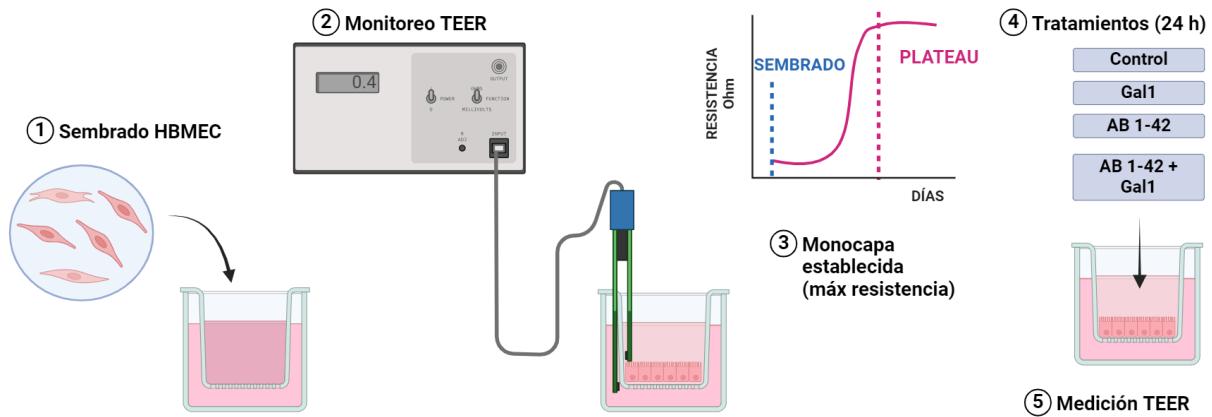


Figura 42. Esquema del ensayo de transwell con células endoteliales de microvasculatura cerebral humana HBMEC. El ensayo de transwell permite desarrollar un modelo de barrera hematoencefálica debido a la baja permeabilidad de la monocapa HBMEC monitoreada mediante la medición de la resistencia eléctrica transendotelial (TEER) 1) Las HBMEC se siembran sobre la membrana porosa del inserto transwell, 40000 células por inserto. 2) La formación de la monocapa se monitorea día por medio luego de cambiar el medio de mantenimiento. 3) Se determinó la altamente cerrada a los 14 días para este tipo celular. 4) Se registró el TEER para cada transwell antes de recibir uno de los tratamientos especificados. 5) Se midió TEER al finalizar el experimento.

El cálculo de los valores TEER se realizó según lo publicado anteriormente. Al valor de TEER obtenido del EVOM ($\Omega \cdot \text{cm}^2$), se le sustrajo el valor de la resistencia de un *transwell* control sin células que recibió el mismo tratamiento con colágeno y luego se aplicó la debida corrección por superficie. Como criterio de exclusión, aquellas monocapas que presentaban una variación mayor al 20% del valor medio de TEER del grupo control, no fueron incluidas en el experimento.

Para el análisis de los resultados, se calculó el cambio de TEER como el valor final de la monocapa, menos el valor medido antes de recibir los tratamientos. El resultado se expresó en porcentaje respecto al cambio del grupo control.

Inmunocitoquímica

Las células se sembraron en placas P24, donde previamente se colocaron cubres redondos de vidrio estériles. El medio se cambió según necesario hasta que las células se adhirieron a los vidrios y adoptaron morfología. Luego se procedió a incubarlas según el grupo experimental al que pertenecían (Figura 43). Al finalizar los tratamientos, las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehido 4% en solución salina (Sigma) durante 15

min sobre hielo. Luego, las células recibieron 3 lavados de 5 minutos con PBS y recibieron solución permeabilizadora de Tween 0.2% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente a otros tres lavados, las células fueron expuestas a una solución de bloqueo que consistía en seroalbúmina bovina 1% (Sigma) en PBS-Tween 0.05% durante una noche a 4°C. Al día siguiente, las células fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente en solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente para ocludina y NFkB, y una noche a 4°C para las inmunofluorescencias de BIP y XBP1, a las concentraciones que se muestran en la Tabla 1. Luego de lavar con PBS (3 veces, 5 minutos), se incubó con el anticuerpo secundario acoplado al fluoróforo Alexa 555 hecho en conejo (Invitrogen, 1:1000) en solución de bloqueo durante dos horas a temperatura ambiente. Se lavaron los vidrios dos veces y se colocó una solución de DAPI 1/5000 en PBS durante 3 minutos para la tinción de los núcleos. Finalmente, se lavó dos veces con PBS y se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos empleando polivinil alcohol con DABCO (Sigma).

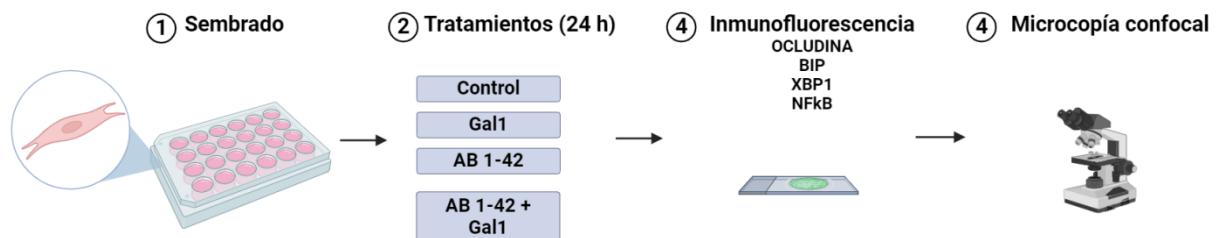


Figura 43. Esquema de los pasos para la inmunocitoquímica/inmunofluorescencia en HBMEC. 1) Se siembran las HBMEC en los pocillos de una placa de 24 donde previamente se colocó un cubre redondo estéril. Las células crecen adheridas al vidrio. 2) Se colocan los tratamientos indicados a las 24/48 h, cuando las células estuviesen pegadas y hayan adoptado la morfología esperada. 3) Luego de la fijación, se realiza el protocolo de inmunofluorescencia contra alguna de las proteínas a revelar, según lo detallado en esta sección. 4) Se obtienen fotos de microscopía confocal de los cubres montados sobre portaobjetos.

Anticuerpo 1°	Concentración	Origen
Ocludina	1/100	conejo
BIP/GRP78 (Santa Cruz)	1/100	conejo
XBP1 (abcam)	1/750	conejo
NFkB	1/500	conejo

Tabla 1. Anticuerpos primarios empleados en inmunocitoquímica.

Cuantificación imágenes

Para los distintos experimentos, se tomaron fotos de confocal a un aumento de 60X. Se utilizó DAPI para visualizar y poner en foco el núcleo de las células. Se tomaron fotos hasta tener al menos 40 células de por grupo experimental (entre 2-3 réplicas por cada uno). El análisis de las imágenes se realizó en el software FIJI ImageJ con un macro de construcción propia. Todo el análisis se hizo de manera ciega del grupo experimental al que pertenecían las células. No se cuantificaron células en proceso de mitosis.

BIP

Tratamiento de las imágenes. El procedimiento consistió en la determinación del umbral para determinar el área con marca positiva para BIP mediante un umbral de intensidad. Con ello se creó una máscara guardando cada célula como área de interés. Nuevamente, limitando la detección con un umbral, se determinó la intensidad promedio de cada célula para la señal positiva de BIP. Este valor, en el programa denominado *mean gray value*, es el promedio de intensidad (o densidad óptica) de cada píxel. Los núcleos no presentaron marca positiva para BIP en ningún grupo experimental, y por lo tanto no contribuyeron en área ni en intensidad para la cuantificación de la inmunorreactividad de BIP/célula.

Translocación nuclear XBP1 y NF κ B

Tratamiento de las imágenes. Brevemente, en el canal correspondiente al núcleo, se tomaba un umbral de intensidad que delimitaba el núcleo, se creaba una máscara y se guardaba cada núcleo como área de interés por separado. Luego, en la imagen correspondiente a la marca de XBP1/NF κ B, se medía la intensidad promedio de la marca, o *mean grey value*. Luego se repetía el procedimiento para la intensidad de XBP1/NF κ B en el citoplasma celular (con la marca nuclear extraída). Por lo tanto, por cada célula, se obtiene un valor de la intensidad media de marca del núcleo y del citoplasma. El índice de translocación nuclear se calculó como la relación de estas dos mediciones, para cada célula.

Real Time PCR

Las células, luego de ser tratadas, se lavaron con PBS y se homogeneizaron en el reactivo Tranzol (Trangen) o Trizol (Life Technologies-Invitrogen, CA, USA) sobre hielo. El ARN total se extrajo como recomienda el fabricante. La concentración y pureza del ARN se determinó midiendo la densidad óptica a 260 y 280 nm en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific USA). El ADN copia para amplificar por PCR fue sintetizado a partir de 1 µg de ARN total, usando la enzima transcriptasa reversa MMLV (MMLV High Performance Reverse Transcriptase enzyme, Epicentre, USA) por 60 minutos a 37°C en presencia de *random primers*. Las secuencias de las sondas de amplificación utilizadas se muestran en la Tabla 2.

Las muestras se midieron con un sistema de detección Bio-Rad CFX (Hercules, CA, EE. UU.) en una mezcla de reacción con un volumen final de 15 µL, que contenía 10 µL de SYBR® Select Master Mix (Thermo Fisher), a excepción de la mezcla para NLRP3, que contenía 5 µL. Se realizaron tres experimentos independientes con dos o tres réplicas para cada grupo experimental; en cada experimento, cada reacción se realizó por duplicado. Se utilizó el gen GAPDH como gen de referencia o housekeeping dada la regularidad de su expresión a lo largo de las muestras experimentales.

La expresión relativa se calculó mediante el método de Pfaffl para la cuantificación relativa en RT-PCR en tiempo real (Pfaffl 2001) y expresado como aumento de veces en relación con el grupo de control para cada enfoque correspondiente.

$$\text{Expresión relativa} = \frac{(E_{\text{blanco}})^{\Delta Ct_{\text{blanco}}}}{(E_{\text{referencia}})^{\Delta Ct_{\text{referencia}}}}$$

Donde E = eficiencia de los primers para cada gen (blanco o de referencia), calculada a partir de una curva con distintas concentraciones de ADN copia; y ΔCt calculado como la diferencia entre el Ct promedio del grupo control y el valor promedio de los duplicados para cada muestra, para cada gen correspondiente

La especificidad de la amplificación por PCR y la ausencia de dímeros fueron verificadas por el análisis de las curvas de disociación luego de cada corrida. Los *primers* se utilizaron en una concentración final de 0.35 μ M. Se utilizó una dilución 1:5 de ADNc obtenido para cada reacción de amplificación, excepto para la medición de IL1 β que se empleó a 1:2. Los protocolos de qPCR fueron optimizados para cada gen con curvas de eficiencia. La siguiente tabla detalla las secuencias de los *primers*, la longitud del producto de PCR, la temperatura de disociación o *melting*, los protocolos utilizados y la eficiencia de corrida.

Gen	Prim er	Secuencia	Pb	Tm	Protocolo	E (%)
GAPDH	Fw	TGCACCACCAACTGCTTAGC	87	60	90°C 10' - 40x(90°C 10"+ 55°C 30"+ 60°C 1')	93
	Rv	GGCATGGACTGTGGTCATGAG				
Ire1 α	Fw	TCACAAAGTGGAAGTACCCG	99	57	90°C 10' - 40x(95°C 15"+ 60°C 1')	94
	Rv	AGGCATAGAGGCTGGTAG				
PERK	Fw	AGACGATGAGACAGAGTTGCG	156	58	90°C 10' - 40x(95°C 15"+ 60°C 1')	88
	Rv	TTGCTAAGGCTGGATGACACC				
ATF6	Fw	TCAAGCACCTGGAGTTCTG	200	57	90°C 10' - 40x(95°C 15"+ 60°C 1')	85
	Rv	GTCTCCTTAGCACAGCAATATC				
sXBP1	Fw	CTGAGTCCGCAGCAGGTG	221	57	90°C 10' - 40x(95°C 15"+ 60°C 1')	82
	Rv	GGAGGCTGGTAAGGAAGTGG				
IL1 β	Fw	GGACAAGCTGAGGAAGATGC	129	58	90°C 10' - 40x(95°C 15"+ 60°C 1')	81
	Rv	TCGTTATCCCATGTGTCGAA				
NLRP3	Fw	AAAGGAAGTGGACTGCGAGA	129	62	90°C 10' - 40x(95°C 15"+ 60°C 1')	93
	Rv	TTCAAACGACTCCCTGGAAC				

CHOP	Fw	TTAAGTCTAAGGCACTGAGCGTAT C	135	55	90°C 10' - 40x(95°C 15"+ 58°C 1')	82
	Rv	TGCTTCAGGTGTGGTGATG				

Tabla 2. Detalle de los primers utilizados y los protocolos correspondientes.

Análisis estadístico

Para experimentos in vitro que utilizaron fotos de microscopía confocal para estimar parámetros en células individuales, se consideraron 30-40 células por grupo experimental, pertenecientes a dos réplicas distintas del mismo experimento.

Los datos se expresaron como media +/- el error estándar de la media. Los diferentes análisis se realizaron a ciegas con respecto a los grupos experimentales. Se evaluaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas.

Para el caso en el que se grafican y comparan 2 grupos experimentales, se empleó la prueba de T a una o dos colas, de acuerdo con la hipótesis previa. Para el caso del Análisis de la Varianza (una o dos vías, según correspondía), los grupos experimentales fueron comparados entre sí empleando los siguientes contrastes a posteriori: Comparaciones de Tukey, cuando se pretende comparar todos los grupos experimentales entre sí. Comparaciones de Dunnett, para evaluar diferencias entre los grupos experimentales respecto de un grupo considerado control. Este tipo de comparaciones fueron realizadas con el software Prism 7.

En los casos que se realizaron contrastes ortogonales, se utilizó el software libre Infostat (Universidad Nacional de Córdoba). Las representaciones gráficas de los resultados aquí expuestos fueron realizadas con el programa Prism 7. En todos los análisis estadísticos utilizados en esta Tesis se consideró una tasa de error Tipo I del 5%. En todos los casos el número de réplicas fue estimado a partir de considerar una potencia del 80%. Para el análisis histológico se utilizaron al menos 4 animales por edad y genotipo.

Los análisis de transcriptómica se realizaron con paquetes de R específicos a tal fin, adaptándolos a nuestros datos con la ayuda del Lic Joaquín Merlo. El detalle del análisis se menciona en la sección correspondiente dentro de este mismo Capítulo.

Bibliografía

- “2023 Alzheimer’s Disease Facts and Figures”. 2023. *Alzheimer’s & Dementia: The Journal of the Alzheimer’s Association* 19 (4): 1598–1695. <https://doi.org/10.1002/alz.13016>.
- Abdullah, Zuraidah, y Ulvi Bayraktutan. 2014. “NADPH oxidase mediates TNF- α -evoked *in vitro* brain barrier dysfunction: roles of apoptosis and time”. *Molecular and Cellular Neuroscience* 61 (julio): 72–84. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2014.06.002>.
- Abelein, Axel. 2023. “Metal Binding of Alzheimer’s Amyloid- β and Its Effect on Peptide Self-Assembly”. *Accounts of Chemical Research* 56 (19): 2653–63. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.3c00370>.
- Åbjørsbråten, Knut Sindre, Gry HE Syverstad Skaaraas, Céline Cunen, Daniel M Bjørnstad, Kristin M Gullestad Binder, Laura Bojarskaite, Vidar Jensen, et al. 2022. “Impaired astrocytic Ca $^{2+}$ signaling in awake-behaving Alzheimer’s disease transgenic mice”. Editado por Mark T Nelson, Richard W Aldrich, Mark T Nelson, y Jillian L Stobart. *eLife* 11 (julio): e75055. <https://doi.org/10.7554/eLife.75055>.
- Acosta, Crystal, Hope D. Anderson, y Christopher M. Anderson. 2017. “Astrocyte Dysfunction in Alzheimer Disease”. *Journal of Neuroscience Research* 95 (12): 2430–47. <https://doi.org/10.1002/jnr.24075>.
- Ahmad, Ajmal, Vanisha Patel, Jianfeng Xiao, y Mohammad Moshahid Khan. 2020. “The Role of Neurovascular System in Neurodegenerative Diseases”. *Molecular Neurobiology* 57 (11): 4373–93. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02023-z>.
- Ajoolabady, Amir, Dan Lindholm, Jun Ren, y Domenico Pratico. 2022. “ER Stress and UPR in Alzheimer’s Disease: Mechanisms, Pathogenesis, Treatments”. *Cell Death & Disease* 13 (8): 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-05153-5>.
- Albert, Marilyn S., Steven T. DeKosky, Dennis Dickson, Bruno Dubois, Howard H. Feldman, Nick C. Fox, Anthony Gamst, et al. 2011. “The Diagnosis of Mild Cognitive Impairment Due to Alzheimer’s Disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer’s Association Workgroups on Diagnostic Guidelines for Alzheimer’s Disease”. *Alzheimer’s & Dementia: The Journal of the Alzheimer’s Association* 7 (3): 270–79. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.008>.
- Alvarez, Jorge Ivan, Aurore Dodelet-Devillers, Hania Kebir, Igal Ifergan, Pierre J. Fabre, Simone Terouz, Mike Sabbagh, et al. 2011. “The Hedgehog Pathway Promotes Blood-Brain Barrier Integrity and CNS Immune Quiescence”. *Science (New York, N.Y.)* 334 (6063): 1727–31. <https://doi.org/10.1126/science.1206936>.
- Alves, C. Henrique, Rosa Fernandes, Ana Raquel Santiago, y António Francisco Ambrósio. 2020. “Microglia Contribution to the Regulation of the Retinal and Choroidal Vasculature in Age-Related Macular Degeneration”. *Cells* 9 (5): 1217. <https://doi.org/10.3390/cells9051217>.
- Alzheimer, A. 1911. “Über Eigenartige Krankheitsfälle Des Späteren Alters: (On Certain Peculiar Diseases of Old Age)”. *History of Psychiatry* 2 (5): 74–101. <https://doi.org/10.1177/0957154X9100200506>.
- Alzheimer, Alois. 1906. “Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozess der Hirninde”. *Neurologisches Centralblatt* 25: 1134.
- Ambrose, Charles T. 2012. “Neuroangiogenesis: A Vascular Basis for Alzheimer’s Disease and Cognitive Decline During Aging”. *Journal of Alzheimer’s Disease* 32 (3): 773–88. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-120067>.
- Ameen-Ali, Kamar E., Julie E. Simpson, Stephen B. Wharton, Paul R. Heath, Paul S. Sharp, Gaia Brezzo, y Jason Berwick. 2019. “The Time Course of Recognition Memory Impairment and Glial Pathology in the hAPP-J20 Mouse Model of Alzheimer’s Disease”. *Journal of Alzheimer’s Disease* 68 (2): 609–24. <https://doi.org/10.3233/JAD-181238>.

- Andjelkovic, Anuska V., Muyu Situ, Ali Francisco Citalan-Madrid, Svetlana M. Stamatovic, Jianming Xiang, y Richard F. Keep. 2023. "Blood-Brain Barrier Dysfunction in Normal Aging and Neurodegeneration: Mechanisms, Impact, and Treatments". *Stroke* 54 (3): 661–72. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.122.040578>.
- Araújo, Daline F. S., Gerlane C. B. Guerra, Maria Manuela E. Pintado, Yasmim R. F. Sousa, Francesca Algieri, Alba Rodriguez-Nogales, Raimundo F. Araújo, Julio Gálvez, Rita de Cássia R. E. Queiroga, y Maria Elena Rodriguez-Cabezas. 2017. "Intestinal Anti-Inflammatory Effects of Goat Whey on DNBS-Induced Colitis in Mice". *PLoS One* 12 (9): e0185382. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185382>.
- Arvanitakis, Zoe, Ana W. Capuano, Sue E. Leurgans, David A. Bennett, y Julie A. Schneider. 2016. "Relation of Cerebral Vessel Disease to Alzheimer's Disease Dementia and Cognitive Function in Elderly People: A Cross-Sectional Study". *The Lancet. Neurology* 15 (9): 934–43. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30029-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30029-1).
- Arvanitakis, Zoe, Sue E. Leurgans, Zhenxin Wang, Robert S. Wilson, David A. Bennett, y Julie A. Schneider. 2011. "Cerebral Amyloid Angiopathy Pathology and Cognitive Domains in Older Persons". *Annals of Neurology* 69 (2): 320–27. <https://doi.org/10.1002/ana.22112>.
- Ashour, Fathia, y Jim Deuchars. 2004. "Electron microscopic localisation of P2X4 receptor subunit immunoreactivity to pre- and post-synaptic neuronal elements and glial processes in the dorsal vagal complex of the rat". *Brain Research* 1026 (1): 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.08.002>.
- Attems, Johannes, y Kurt A. Jellinger. 2014. "The Overlap between Vascular Disease and Alzheimer's Disease - Lessons from Pathology". *BMC Medicine* 12 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12916-014-0206-2>.
- Baeten, Kim M., y Katerina Akassoglou. 2011. "Extracellular Matrix and Matrix Receptors in Blood-Brain Barrier Formation and Stroke". *Developmental Neurobiology* 71 (11): 1018–39. <https://doi.org/10.1002/dneu.20954>.
- Bai, Baochen, Yanyan Yang, Qi Wang, Min Li, Chao Tian, Yan Liu, Lynn Htet Htet Aung, Pei-feng Li, Tao Yu, y Xian-ming Chu. 2020. "NLRP3 Inflammasome in Endothelial Dysfunction". *Cell Death & Disease* 11 (9): 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02985-x>.
- Bakker, Erik N. T. P., Brian J. Bacska, Michal Arbel-Ornath, Roxana Aldea, Beatrice Bedussi, Alan W. J. Morris, Roy O. Weller, y Roxana O. Carare. 2016. "Lymphatic Clearance of the Brain: Perivascular, Paravascular and Significance for Neurodegenerative Diseases". *Cellular and Molecular Neurobiology* 36 (2): 181–94. <https://doi.org/10.1007/s10571-015-0273-8>.
- Bannoud, Nadia, Juan C. Stupirski, Alejandro J. Cagnoni, Pablo F. Hockl, Juan M. Pérez Sáez, P. Alfredo García, Yamil D. Mahmoud, et al. 2023. "Circulating Galectin-1 Delineates Response to Bevacizumab in Melanoma Patients and Reprograms Endothelial Cell Biology". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 120 (3): e2214350120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2214350120>.
- Barriónuevo, Paula, Macarena Beigier-Bompadre, Juan M. Ilarregui, Marta A. Toscano, Germán A. Bianco, Martín A. Istoriz, y Gabriel A. Rabinovich. 2007. "A Novel Function for Galectin-1 at the Crossroad of Innate and Adaptive Immunity: Galectin-1 Regulates Monocyte/Macrophage Physiology through a Nonapoptotic ERK-Dependent Pathway". *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 178 (1): 436–45. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.1.436>.
- Barthélémy, Nicolas R., Yan Li, Nelly Joseph-Mathurin, Brian A. Gordon, Jason Hassenstab, Tammie L. S. Benzinger, Virginia Buckles, et al. 2020. "A Soluble Phosphorylated Tau Signature Links Tau, Amyloid and the Evolution of Stages of Dominantly

- Inherited Alzheimer's Disease". *Nature Medicine* 26 (3): 398–407. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0781-z>.
- Basselerie, Hubert, Luc Bracoud, Eva Zeestraten, Eva Bouguen, Vera Kiyasova, Maria Pueyo, Christophe Cognard, et al. 2017. "Incident Cerebral Microbleeds Detected by Susceptibility Weight-Imaging Help to Identify Patients with Mild Cognitive Impairment Progressing to Alzheimer's Disease". *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 60 (1): 253–62. <https://doi.org/10.3233/JAD-170470>.
- Batista, André F., Khyrul A. Khan, Maria-Tzousi Papavergi, y Cynthia A. Lemere. 2024. "The Importance of Complement-Mediated Immune Signaling in Alzheimer's Disease Pathogenesis". *International Journal of Molecular Sciences* 25 (2): 817. <https://doi.org/10.3390/ijms25020817>.
- Bauer, Björn, Anika M. S. Hartz, y David S. Miller. 2007. "Tumor Necrosis Factor α and Endothelin-1 Increase P-Glycoprotein Expression and Transport Activity at the Blood-Brain Barrier". *Molecular Pharmacology* 71 (3): 667–75. <https://doi.org/10.1124/mol.106.029512>.
- Beauquis, Juan, Patricio Pavía, Carlos Pomilio, Angeles Vinuesa, Natalia Podlutskaya, Verónica Galvan, y Flavia Saravia. 2013. "Environmental enrichment prevents astroglial pathological changes in the hippocampus of APP transgenic mice, model of Alzheimer's disease". *Experimental Neurology* 239 (enero): 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.09.009>.
- Beauquis, Juan, Angeles Vinuesa, Carlos Pomilio, Patricio Pavía, Verónica Galván, y Flavia Saravia. 2014. "Neuronal and Glial Alterations, Increased Anxiety, and Cognitive Impairment before Hippocampal Amyloid Deposition in PDAPP Mice, Model of Alzheimer's Disease". *Hippocampus* 24 (3): 257–69. <https://doi.org/10.1002/hipo.22219>.
- Bell, Robert D., Rashid Deane, Nienwen Chow, Xiaochun Long, Abhay Sagare, Itender Singh, Jeffrey W. Streb, et al. 2009. "SRF and Myocardin Regulate LRP-Mediated Amyloid-Beta Clearance in Brain Vascular Cells". *Nature Cell Biology* 11 (2): 143–53. <https://doi.org/10.1038/ncb1819>.
- Bell, Robert D., Ethan A. Winkler, Abhay P. Sagare, Itender Singh, Barb LaRue, Rashid Deane, y Berislav V. Zlokovic. 2010. "Pericytes Control Key Neurovascular Functions and Neuronal Phenotype in the Adult Brain and during Brain Aging". *Neuron* 68 (3): 409–27. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.043>.
- Benedictus, Marije R., Jeroen D. C. Goos, Maja A. A. Binnewijzend, Majon Muller, Frederik Barkhof, Philip Scheltens, Niels D. Prins, y Wiesje M. van der Flier. 2013. "Specific Risk Factors for Microbleeds and White Matter Hyperintensities in Alzheimer's Disease". *Neurobiology of Aging* 34 (11): 2488–94. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.04.023>.
- Benedictus, Marije R., Niels D. Prins, Jeroen D. C. Goos, Philip Scheltens, Frederik Barkhof, y Wiesje M. van der Flier. 2015. "Microbleeds, Mortality, and Stroke in Alzheimer Disease: The MISTRAL Study". *JAMA Neurology* 72 (5): 539–45. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.14>.
- Bhardwaj, Monika, Nektaria Maria Leli, Constantinos Koumenis, y Ravi K. Amaravadi. 2020. "Regulation of autophagy by canonical and non-canonical ER stress responses". *Seminars in cancer biology* 66 (noviembre): 116–28. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2019.11.007>.
- Biessels, Geert Jan, y Lawrence P. Reagan. 2015. "Hippocampal Insulin Resistance and Cognitive Dysfunction". *Nature Reviews Neuroscience* 16 (11): 660–71. <https://doi.org/10.1038/nrn4019>.
- Bilbo, Staci, y Beth Stevens. 2017. "Microglia: The Brain's First Responders". *Cerebrum: the Dana Forum on Brain Science* 2017 (noviembre): cer-14-17.
- Biron, Kaan E., Dara L. Dickstein, Rayshad Gopaul, y Wilfred A. Jefferies. 2011. "Amyloid Triggers Extensive Cerebral Angiogenesis Causing Blood Brain Barrier Permeability and Hypervasularity in Alzheimer's Disease". *PloS One* 6 (8): e23789. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023789>.

- Block, Michelle L., Luigi Zecca, y Jau-Shyong Hong. 2007. "Microglia-Mediated Neurotoxicity: Uncovering the Molecular Mechanisms". *Nature Reviews Neuroscience* 8 (1): 57–69. <https://doi.org/10.1038/nrn2038>.
- Bojić-Trbojević, Žanka, Milica Jovanović Krivokuća, Ivana Stefanoska, Nikola Kolundžić, Aleksandra Vilotić, Toshihiko Kadoya, y Ljiljana Vićovac. 2018. "Integrin β 1 is bound to galectin-1 in human trophoblast". *The Journal of Biochemistry* 163 (1): 39–50. <https://doi.org/10.1093/jb/mvx061>.
- Bouland, Gerard A., Kevin I. Marinus, Ronald E. van Kesteren, August B. Smit, Ahmed Mahfouz, y Marcel J.T. Reinders. 2023. "Single-cell RNA sequencing data reveals rewiring of transcriptional relationships in Alzheimer's Disease associated with risk variants". *medRxiv*, mayo, 2023.05.15.23289992. <https://doi.org/10.1101/2023.05.15.23289992>.
- Bowman, Gene L., Jeffrey A. Kaye, y Joseph F. Quinn. 2012. "Dyslipidemia and Blood-Brain Barrier Integrity in Alzheimer's Disease". *Current Gerontology and Geriatrics Research* 2012 (mayo): e184042. <https://doi.org/10.1155/2012/184042>.
- Braak, H., y E. Braak. 1991. "Neuropathological Stageing of Alzheimer-Related Changes". *Acta Neuropathologica* 82 (4): 239–59. <https://doi.org/10.1007/BF00308809>.
- Braak, H, y E Braak. 1997. "Frequency of Stages of Alzheimer-Related Lesions in Different Age Categories". *Neurobiology of Aging* 18 (4): 351–57. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(97\)00056-0](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(97)00056-0).
- Brand, Martin D. 2010. "The sites and topology of mitochondrial superoxide production". *Experimental Gerontology*, Special Issue: Mitochondria in aging and age-related disease, 45 (7): 466–72. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.01.003>.
- Brioschi, Simone, Yingyue Zhou, y Marco Colonna. 2020. "Brain Parenchymal and Extraparenchymal Macrophages in Development, Homeostasis, and Disease". *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 204 (2): 294–305. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900821>.
- Butenko, Olena, David Dzamba, Jana Benesova, Pavel Honsa, Valentina Benfenati, Vendula Rusnakova, Stefano Ferroni, y Miroslava Anderova. 2012. "The Increased Activity of TRPV4 Channel in the Astrocytes of the Adult Rat Hippocampus after Cerebral Hypoxia/Ischemia". *PLOS ONE* 7 (6): e39959. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039959>.
- Butovsky, Oleg, Mark P. Jedrychowski, Craig S. Moore, Ron Cialic, Amanda J. Langer, Galina Gabriely, Thomas Koeglsperger, et al. 2014. "Identification of a Unique TGF- β -Dependent Molecular and Functional Signature in Microglia". *Nature Neuroscience* 17 (1): 131–43. <https://doi.org/10.1038/nn.3599>.
- Cagnoni, Alejandro J., María Laura Giribaldi, Ada G. Blidner, Anabela M. Cutine, Sabrina G. Gatto, Rosa M. Morales, Mariana Salatino, et al. 2021. "Galectin-1 fosters an immunosuppressive microenvironment in colorectal cancer by reprogramming CD8+ regulatory T cells". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118 (21): e2102950118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2102950118>.
- Cantin, S., M. Villien, O. Moreaud, I. Tropres, S. Keignart, E. Chipon, J.-F. Le Bas, J. Warnking, y A. Krainik. 2011. "Impaired Cerebral Vasoreactivity to CO₂ in Alzheimer's Disease Using BOLD fMRI". *NeuroImage* 58 (2): 579–87. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.06.070>.
- Cao, Stewart Siyan, Katherine L. Luo, y Lynn Shi. 2016. "Endoplasmic Reticulum Stress Interacts With Inflammation in Human Diseases". *Journal of Cellular Physiology* 231 (2): 288–94. <https://doi.org/10.1002/jcp.25098>.
- Carlstrom, Lucas P., Ahmed Eltanahy, Avital Perry, Alejandro A Rabinstein, Benjamin D Elder, Jonathan M Morris, Fredric B Meyer, Christopher S Graffeo, Iben Lundgaard, y Terry C Burns. 2022. "A clinical primer for the glymphatic system". *Brain* 145 (3): 843–57. <https://doi.org/10.1093/brain/awab428>.
- Carter, Stephen F., Karl Herholz, Pedro Rosa-Neto, Luc Pellerin, Agneta Nordberg, y Eduardo R. Zimmer. 2019. "Astrocyte Biomarkers in Alzheimer's Disease". *Trends in Molecular Medicine* 25 (2): 77–95. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.11.006>.

- Casali, Brad T., y Erin G. Reed-Geaghan. 2021. "Microglial Function and Regulation during Development, Homeostasis and Alzheimer's Disease". *Cells* 10 (4): 957. <https://doi.org/10.3390/cells10040957>.
- Caspersen, C., P. S. Pedersen, y M. Treiman. 2000. "The Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium-ATPase 2b Is an Endoplasmic Reticulum Stress-Inducible Protein". *The Journal of Biological Chemistry* 275 (29): 22363–72. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001569200>.
- Chen, Haiyan, Yonghui Lu, Zhengwang Cao, Qinlong Ma, Huifeng Pi, Yiliang Fang, Zhengping Yu, Houxiang Hu, y Zhou Zhou. 2016. "Cadmium Induces NLRP3 Inflammasome-Dependent Pyroptosis in Vascular Endothelial Cells". *Toxicology Letters* 246 (marzo): 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.01.014>.
- Chen, Haiying, Hongli Yang, Li Pan, Weihua Wang, Xianbin Liu, Xiaoyan Ren, Yihua Liu, et al. 2016. "The molecular mechanisms of XBP-1 gene silencing on IRE1α-TRAF2-ASK1-JNK pathways in oral squamous cell carcinoma under endoplasmic reticulum stress". *Biomedicine & Pharmacotherapy* 77 (febrero): 108–13. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.12.010>.
- Chen, Li, Rui Chen, Hua Wang, y Fengxia Liang. 2015. "Mechanisms Linking Inflammation to Insulin Resistance". *International Journal of Endocrinology* 2015: 508409. <https://doi.org/10.1155/2015/508409>.
- Chen, QiXing, Yang Yang, JinChao Hou, Qiang Shu, YiXuan Yin, WeiTao Fu, Feng Han, et al. 2019. "Increased Gene Copy Number of DEFA1/DEFA3 Worsens Sepsis by Inducing Endothelial Pyroptosis". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (8): 3161–70. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812947116>.
- Chen, Yuxi, Audrey Branch, Cecelia Shuai, Michela Gallagher, y James J. Knierim. 2024. "Object-Place-Context Learning Impairment Correlates with Spatial Learning Impairment in Aged Long-Evans Rats". *Hippocampus* 34 (2): 88–99. <https://doi.org/10.1002/hipo.23591>.
- Chen, Zhichun, y Chunjiu Zhong. 2014. "Oxidative Stress in Alzheimer's Disease". *Neuroscience Bulletin* 30 (2): 271–81. <https://doi.org/10.1007/s12264-013-1423-y>.
- Chen, Zhi-Ya, y Yan Zhang. 2022. "Animal Models of Alzheimer's Disease: Applications, Evaluation, and Perspectives". *Zoological Research* 43 (6): 1026–40. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2022.289>.
- Chiang, Ming-Tsai, I-Ming Chen, Fu-Fei Hsu, Yen-Hui Chen, Min-Shao Tsai, Yaw-Wen Hsu, Hsin-Bang Leu, et al. 2021. "Gal-1 (Galectin-1) Upregulation Contributes to Abdominal Aortic Aneurysm Progression by Enhancing Vascular Inflammation". *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 41 (1): 331–45. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.315398>.
- Chisari, Mariangela, Sara Merlo, Maria Angela Sortino, y Salvatore Salomone. 2010. "Long-term incubation with β-amyloid peptides impairs endothelium-dependent vasodilatation in isolated rat basilar artery". *Pharmacological Research* 61 (2): 157–61. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.09.004>.
- Cho, Yoonsuk, Han-Gyu Bae, Eitan Okun, Thiruma V. Arumugam, y Dong-Gyu Jo. 2022. "Physiology and pharmacology of amyloid precursor protein". *Pharmacology & Therapeutics* 235 (julio): 108122. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2022.108122>.
- Chow, Nienwen, Robert D. Bell, Rashid Deane, Jeffrey W. Streb, Jiyuan Chen, Andrew Brooks, William Van Nostrand, Joseph M. Miano, y Berislav V. Zlokovic. 2007. "Serum Response Factor and Myocardin Mediate Arterial Hypercontractility and Cerebral Blood Flow Dysregulation in Alzheimer's Phenotype". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (3): 823–28. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608251104>.
- Cicero, Loeb. 150d. C. "De Senectute (44 BC) MT".
- Clark, Iain C., Cristina Gutiérrez-Vázquez, Michael A. Wheeler, Zhaorong Li, Veit Rothhammer, Mathias Linnerbauer, Liliana M. Sanmarco, et al. 2021. "Barcoded Viral Tracing of Single-Cell Interactions in Central Nervous System Inflammation".

- Science (New York, N.Y.)* 372 (6540): eabf1230.
<https://doi.org/10.1126/science.abf1230>.
- Clemente, Tiago, Narciso J. Vieira, Juan P. Cerliani, Colin Adrain, Alexander Luthi, Mariana R. Dominguez, Monica Yon, et al. 2017. "Proteomic and Functional Analysis Identifies Galectin-1 as a Novel Regulatory Component of the Cytotoxic Granule Machinery". *Cell Death & Disease* 8 (12): e3176.
<https://doi.org/10.1038/cddis.2017.506>.
- Compston, Alastair, y Alasdair Coles. 2002. "Multiple Sclerosis". *Lancet (London, England)* 359 (9313): 1221–31. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)08220-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08220-X).
- Croci, Diego O., Juan P. Cerliani, Tomas Dalotto-Moreno, Santiago P. Méndez-Huergo, Ivan D. Mascanfroni, Sebastián Dergan-Dylon, Marta A. Toscano, et al. 2014. "Glycosylation-Dependent Lectin-Receptor Interactions Preserve Angiogenesis in Anti-VEGF Refractory Tumors". *Cell* 156 (4): 744–58.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.043>.
- Croci, Diego O., Mariana Salatino, Natalia Rubinstein, Juan P. Cerliani, Lucas E. Cavallin, Howard J. Leung, Jing Ouyang, et al. 2012. "Disrupting galectin-1 interactions with N-glycans suppresses hypoxia-driven angiogenesis and tumorigenesis in Kaposi's sarcoma". *The Journal of Experimental Medicine* 209 (11): 1985–2000.
<https://doi.org/10.1084/jem.20111665>.
- Cucullo, Luca, Pierre-Olivier Couraud, Babette Weksler, Ignacio-Andres Romero, Mohammed Hossain, Edward Rapp, y Damir Janigro. 2008. "Immortalized Human Brain Endothelial Cells and Flow-Based Vascular Modeling: A Marriage of Convenience for Rational Neurovascular Studies". *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 28 (2): 312–28. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600525>.
- Cui, Huili, Wenkang Wang, Xinhui Zheng, Danhao Xia, Han Liu, Chi Qin, Haiyan Tian, y Junfang Teng. 2021. "Decreased AQP4 Expression Aggravates α -Synuclein Pathology in Parkinson's Disease Mice, Possibly via Impaired Glymphatic Clearance". *Journal of Molecular Neuroscience: MN* 71 (12): 2500–2513.
<https://doi.org/10.1007/s12031-021-01836-4>.
- Cui, Weigang, Songtao Wang, Zhongping Wang, Zhiyong Wang, Chunli Sun, y Yinghua Zhang. 2017. "Inhibition of PTEN Attenuates Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis via Activation of PI3K/AKT Pathway in Alzheimer's Disease". *Neurochemical Research* 42 (11): 3052–60. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2338-1>.
- Cutine, Anabela M., Camila A. Bach, Florencia Veigas, Joaquín P. Merlo, Lorena Laporte, Montana N. Manselle Cocco, Mora Massaro, et al. 2021. "Tissue-Specific Control of Galectin-1-Driven Circuits during Inflammatory Responses". *Glycobiology* 31 (8): 891–907. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwab007>.
- Cuyvers, Elise, y Kristel Sleegers. 2016. "Genetic Variations Underlying Alzheimer's Disease: Evidence from Genome-Wide Association Studies and Beyond". *The Lancet Neurology* 15 (8): 857–68. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)00127-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)00127-7).
- Dahm, Ralf. 2006. "Alzheimer's Discovery". *Current Biology: CB* 16 (21): R906-910.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.09.056>.
- Daniels, Brian P., Lillian Cruz-Orengo, Tracy Jo Pasieka, Pierre-Olivier Couraud, Ignacio A. Romero, Babette Weksler, John A. Cooper, Tamara L. Doering, y Robyn S. Klein. 2013. "Immortalized human cerebral microvascular endothelial cells maintain the properties of primary cells in an in vitro model of immune migration across the blood brain barrier". *Journal of neuroscience methods* 212 (1): 173–79.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2012.10.001>.
- Deczkowska, Aleksandra, Ido Amit, y Michal Schwartz. 2018. "Microglial Immune Checkpoint Mechanisms". *Nature Neuroscience* 21 (6): 779–86.
<https://doi.org/10.1038/s41593-018-0145-x>.
- DeStefano, Jackson G., John J. Jamieson, Raleigh M. Linville, y Peter C. Searson. 2018. "Benchmarking in vitro tissue-engineered blood–brain barrier models". *Fluids and*

- Barriers of the CNS* 15 (1): 32. <https://doi.org/10.1186/s12987-018-0117-2>.
- DeTure, Michael A., y Dennis W. Dickson. 2019. "The Neuropathological Diagnosis of Alzheimer's Disease". *Molecular Neurodegeneration* 14 (1): 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0333-5>.
- Devi, Latha, y Masuo Ohno. 2014. "PERK mediates eIF2 α phosphorylation responsible for BACE1 elevation, CREB dysfunction and neurodegeneration in a mouse model of Alzheimer's disease". *Neurobiology of aging* 35 (10): 2272–81. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.04.031>.
- D'Haene, Nicky, Sébastien Sauvage, Calliope Maris, Ivan Adanja, Marie Le Mercier, Christine Decaestecker, Linda Baum, y Isabelle Salmon. 2013. "VEGFR1 and VEGFR2 Involvement in Extracellular Galectin-1- and Galectin-3-Induced Angiogenesis". *PLOS ONE* 8 (6): e67029. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067029>.
- Di Liberto, Giovanni, Stanislav Pantelyushin, Mario Kreutzfeldt, Nicolas Page, Stefano Musardo, Roland Coras, Karin Steinbach, et al. 2018. "Neurons under T Cell Attack Coordinate Phagocyte-Mediated Synaptic Stripping". *Cell* 175 (2): 458–471.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.049>.
- Dowell, James A., Jeffrey A. Johnson, y Lingjun Li. 2009. "Identification of Astrocyte Secreted Proteins with a Combination of Shotgun Proteomics and Bioinformatics". *Journal of Proteome Research* 8 (8): 4135–43. <https://doi.org/10.1021/pr900248y>.
- Dringen, Ralf, Brigitte Pfeiffer, y Bernd Hamprecht. 1999. "Synthesis of the Antioxidant Glutathione in Neurons: Supply by Astrocytes of CysGly as Precursor for Neuronal Glutathione". *Journal of Neuroscience* 19 (2): 562–69. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-02-00562.1999>.
- Drulis-Fajdasz, Dominika, Agnieszka Gizak, Tomasz Wójtowicz, Jacek R. Wiśniewski, y Dariusz Rakus. 2018. "Aging-Associated Changes in Hippocampal Glycogen Metabolism in Mice. Evidence for and against Astrocyte-to-Neuron Lactate Shuttle". *Glia* 66 (7): 1481–95. <https://doi.org/10.1002/glia.23319>.
- Drummond, Eleanor, y Thomas Wisniewski. 2017. "Alzheimer's Disease: Experimental Models and Reality". *Acta Neuropathologica* 133 (2): 155–75. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1662-x>.
- Dulken, Ben W., Matthew T. Buckley, Paloma Navarro Negredo, Naresha Saligrama, Romain Cayrol, Dena S. Leeman, Benson M. George, et al. 2019. "Single-Cell Analysis Reveals T Cell Infiltration in Old Neurogenic Niches". *Nature* 571 (7764): 205–10. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1362-5>.
- Duran-Aniotz, Claudia, Victor Hugo Cornejo, Sandra Espinoza, Álvaro O. Ardiles, Danilo B. Medinas, Claudia Salazar, Andrew Foley, et al. 2017. "IRE1 Signaling Exacerbates Alzheimer's Disease Pathogenesis". *Acta Neuropathologica* 134 (3): 489–506. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1694-x>.
- Dyck, Christopher H. van, Chad J. Swanson, Paul Aisen, Randall J. Bateman, Christopher Chen, Michelle Gee, Michio Kanekiyo, et al. 2023. "Lecanemab in Early Alzheimer's Disease". *New England Journal of Medicine* 388 (1): 9–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2212948>.
- Eigenmann, Daniela E., Gongda Xue, Kwang S. Kim, Ashlee V. Moses, Matthias Hamburger, y Mouhssin Oufir. 2013. "Comparative study of four immortalized human brain capillary endothelial cell lines, hCMEC/D3, hBMEC, TY10, and BB19, and optimization of culture conditions, for an in vitro blood–brain barrier model for drug permeability studies". *Fluids and Barriers of the CNS* 10 (1): 33. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-10-33>.
- Fakhoury, Marc. 2018. "Microglia and Astrocytes in Alzheimer's Disease: Implications for Therapy". *Current Neuropharmacology* 16 (5): 508–18. <https://doi.org/10.2174/1570159X15666170720095240>.
- Fan, Qiyan, Mika Takarada-Iemata, Nahoko Okitani, Takashi Tamatani, Hiroshi Ishii, Tsuyoshi Hattori, Sumiko Kiryu-Seo, Hiroshi Kiyama, y Osamu Hori. 2023. "Brain Injury Triggers Cell-Type-Specific and Time-Dependent Endoplasmic Reticulum

- Stress Responses". *Glia* 71 (3): 667–81. <https://doi.org/10.1002/glia.24303>.
- Fan, Yan-Ying, y Jing Huo. 2021. "A1/A2 Astrocytes in Central Nervous System Injuries and Diseases: Angels or Devils?" *Neurochemistry International* 148 (septiembre): 105080. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105080>.
- Fang, Du, Yongfu Wang, Zhihua Zhang, Heng Du, Shiqiang Yan, Qinru Sun, Changjia Zhong, et al. 2015. "Increased Neuronal PreP Activity Reduces A β Accumulation, Attenuates Neuroinflammation and Improves Mitochondrial and Synaptic Function in Alzheimer Disease's Mouse Model". *Human Molecular Genetics* 24 (18): 5198–5210. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv241>.
- Fantin, Alessandro, Joaquim M. Vieira, Gaia Gestri, Laura Denti, Querten Schwarz, Sergey Prykhozhij, Francesca Peri, Stephen W. Wilson, y Christiana Ruhrberg. 2010. "Tissue Macrophages Act as Cellular Chaperones for Vascular Anastomosis Downstream of VEGF-Mediated Endothelial Tip Cell Induction". *Blood* 116 (5): 829–40. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-257832>.
- Farina, Cinthia, Francesca Aloisi, y Edgar Meinl. 2007. "Astrocytes are active players in cerebral innate immunity". *Trends in Immunology* 28 (3): 138–45. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.01.005>.
- Ferrucci, Luigi, y Elisa Fabbri. 2018. "Inflammageing: Chronic Inflammation in Ageing, Cardiovascular Disease, and Frailty". *Nature Reviews. Cardiology* 15 (9): 505–22. <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0064-2>.
- Filosa, J. A., H. W. Morrison, J. A. Iddings, W. Du, y K. J. Kim. 2016. "Beyond neurovascular coupling, role of astrocytes in the regulation of vascular tone". *Neuroscience*, Dynamic and metabolic astrocyte-neuron interactions in healthy and diseased brain, 323 (mayo): 96–109. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.03.064>.
- Fischer, V. W., A. Siddiqi, y Y. Yusufaly. 1990. "Altered Angioarchitecture in Selected Areas of Brains with Alzheimer's Disease". *Acta Neuropathologica* 79 (6): 672–79. <https://doi.org/10.1007/BF00294246>.
- Folin, Marcella, Silvia Baiguera, Mara Tommasini, Diego Guidolin, Maria Teresa Conconi, Eugenio De Carlo, Gastone G. Nussdorfer, y Pier Paolo Parnigotto. 2005. "Effects of β -amyloid on rat neuromicrovascular endothelial cells cultured in vitro". *International Journal of Molecular Medicine* 15 (6): 929–35. <https://doi.org/10.3892/ijmm.15.6.929>.
- Fonseca, Ana Catarina R. G., Elisabete Ferreiro, Catarina R. Oliveira, Sandra M. Cardoso, y Cláudia F. Pereira. 2013. "Activation of the Endoplasmic Reticulum Stress Response by the Amyloid-Beta 1-40 Peptide in Brain Endothelial Cells". *Biochimica Et Biophysica Acta* 1832 (12): 2191–2203. <https://doi.org/10.1016/j.bbadi.2013.08.007>.
- Foulquier, S., V. Caolo, G. Swennen, I. Milanova, S. Reinhold, C. Recarti, N. Alenina, et al. 2019. "The Role of Receptor MAS in Microglia-Driven Retinal Vascular Development". *Angiogenesis* 22 (4): 481–89. <https://doi.org/10.1007/s10456-019-09671-3>.
- Fusakio, Michael E., Jeffrey A. Willy, Yongping Wang, Emily T. Mirek, Rana J. T. Al Baghdadi, Christopher M. Adams, Tracy G. Anthony, y Ronald C. Wek. 2016. "Transcription factor ATF4 directs basal and stress-induced gene expression in the unfolded protein response and cholesterol metabolism in the liver". *Molecular Biology of the Cell* 27 (9): 1536–51. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-01-0039>.
- Gabbita, S. Prasad, Minu K. Srivastava, Pirooz Eslami, Ming F. Johnson, Naomi K. Kobritz, David Tweedie, Nigel H. Greig, Frank P. Zemlan, Sherven P. Sharma, y Marni E. Harris-White. 2012. "Early intervention with a small molecule inhibitor for tumor necrosis factor- α prevents cognitive deficits in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease". *Journal of Neuroinflammation* 9 (1): 99. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-99>.
- Gama Sosa, Miguel A., Rita De Gasperi, Dylan Pryor, Georgina S. Perez Garcia, Gissel M. Perez, Rania Abutarboush, Usman Kawoos, et al. 2023. "Late chronic local inflammation, synaptic alterations, vascular remodeling and arteriovenous malformations in the brains of male rats exposed to repetitive low-level blast overpressures". *Acta Neuropathologica Communications* 11 (1): 81.

- <https://doi.org/10.1186/s40478-023-01553-6>.
- Games, D., D. Adams, R. Alessandrini, R. Barbour, P. Berthelette, C. Blackwell, T. Carr, J. Clemens, T. Donaldson, y F. Gillespie. 1995. "Alzheimer-Type Neuropathology in Transgenic Mice Overexpressing V717F Beta-Amyloid Precursor Protein". *Nature* 373 (6514): 523–27. <https://doi.org/10.1038/373523a0>.
- García-García, Verónica A., Josefa P. Alameda, Angustias Page, y María Llanos Casanova. 2021. "Role of NF-κB in Ageing and Age-Related Diseases: Lessons from Genetically Modified Mouse Models". *Cells* 10 (8): 1906. <https://doi.org/10.3390/cells10081906>.
- García-Martínez, Yuliana, Karla Berenice Sánchez-Huerta, y Jorge Pacheco-Rosado. 2020. "Quantitative Characterization of Proliferative Cells Subpopulations in the Hhilus of the Hippocampus of Adult Wistar Rats: An Integrative Study". *Journal of Molecular Histology* 51 (4): 437–53. <https://doi.org/10.1007/s10735-020-09895-4>.
- Gargalovic, Peter S., Nima M. Gharavi, Michael J. Clark, Joanne Pagnon, Wen-Pin Yang, Aiqing He, Amy Truong, et al. 2006. "The Unfolded Protein Response Is an Important Regulator of Inflammatory Genes in Endothelial Cells". *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26 (11): 2490–96. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000242903.41158.a1>.
- Gastfriend, Benjamin D., Margaret E. Snyder, Hope E. Holt, Richard Daneman, Sean P. Palecek, y Eric V. Shusta. 2024. "Notch3 directs differentiation of brain mural cells from human pluripotent stem cell-derived neural crest". *Science Advances* 10 (5): eadi1737. <https://doi.org/10.1126/sciadv.ad1737>.
- Gate, David, Naresha Saligrama, Olivia Leventhal, Andrew C. Yang, Michael S. Unger, Jinte Middeldorp, Kelly Chen, et al. 2020. "Clonally Expanded CD8 T Cells Patrol the Cerebrospinal Fluid in Alzheimer's Disease". *Nature* 577 (7790): 399–404. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1895-7>.
- Gaudet, Andrew D., David R. Sweet, Nicole K. Polinski, Zhen Guan, y Phillip G. Popovich. 2015. "Galectin-1 in injured rat spinal cord: Implications for macrophage phagocytosis and neural repair". *Molecular and Cellular Neuroscience* 64 (enero): 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2014.12.006>.
- Ghosh, Rajarshi, Likun Wang, Eric S. Wang, B. Gayani K. Perera, Aeid Igbaria, Shuhei Morita, Kris Prado, et al. 2014. "Allosteric Inhibition of the IRE1α RNase Preserves Cell Viability and Function during Endoplasmic Reticulum Stress". *Cell* 158 (3): 534–48. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.002>.
- Gilsanz, Paola, Catherine Lee, Maria M. Corrada, Claudia H. Kawas, Charles P. Quesenberry, y Rachel A. Whitmer. 2019. "Reproductive period and risk of dementia in a diverse cohort of health care members". *Neurology* 92 (17): e2005–14. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000007326>.
- Gireud-Goss, Monica, Alexis F. Mack, Louise D. McCullough, y Akihiko Urayama. 2021. "Cerebral Amyloid Angiopathy and Blood-Brain Barrier Dysfunction". *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry* 27 (6): 668–84. <https://doi.org/10.1177/1073858420954811>.
- Giulia, Paroni, Lauriola Michele, Fontana Andrea, D'Onofrio Grazia, Ciccone Filomena, Paris Francesco, Cascavilla Leandro, et al. 2016. "Brain Atrophy, Anti-Smooth Muscle Antibody and Cognitive Impairment: An Association Study". *Aging and Disease* 7 (4): 318–25. <https://doi.org/10.14336/AD.2015.1124>.
- Gomolka, Ryszard Stefan, Lauren M Hablitz, Humberto Mestre, Michael Giannetto, Ting Du, Natalie Linea Hauglund, Lulu Xie, et al. 2023. "Loss of aquaporin-4 results in glymphatic system dysfunction via brain-wide interstitial fluid stagnation". Editado por Saad Jbabdi, Ma-Li Wong, y Yolanda Ohene. *eLife* 12 (febrero): e82232. <https://doi.org/10.7554/eLife.82232>.
- Gonzalez-Velasquez, Francisco J., J. Will Reed, John W. Fuseler, Emily E. Matherly, Joseph A. Kotarek, Deborah D. Soto-Ortega, y Melissa A. Moss. 2011. "Activation of Brain Endothelium by Soluble Aggregates of the Amyloid-β Protein Involves Nuclear Factor-κB". *Current Alzheimer Research* 8 (1): 81–94.

- https://doi.org/10.2174/156720511794604606.
- Goos, Jeroen D.C., M.i. Kester, Frederik Barkhof, Martin Klein, Marinus A. Blankenstein, Philip Scheltens, y Wiesje M. van der Flier. 2009. "Patients With Alzheimer Disease With Multiple Microbleeds". *Stroke* 40 (11): 3455–60. https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.558197.
- Götz, Jürgen, Liviu-Gabriel Bodea, y Michel Goedert. 2018. "Rodent Models for Alzheimer Disease". *Nature Reviews Neuroscience* 19 (10): 583–98. https://doi.org/10.1038/s41583-018-0054-8.
- Goutagny, Romain, Ning Gu, Chelsea Cavanagh, Jesse Jackson, Jean-Guy Chabot, Rémi Quirion, Slavica Krantic, y Sylvain Williams. 2013. "Alterations in Hippocampal Network Oscillations and Theta-Gamma Coupling Arise before A β Overproduction in a Mouse Model of Alzheimer's Disease". *European Journal of Neuroscience* 38 (10): 3527–3527. https://doi.org/10.1111/ejn.12446.
- Govindpani, Karan, Laura G. McNamara, Nicholas R. Smith, Chitra Vinnakota, Henry J. Waldvogel, Richard Lm Faull, y Andrea Kwakowsky. 2019. "Vascular Dysfunction in Alzheimer's Disease: A Prelude to the Pathological Process or a Consequence of It?" *Journal of Clinical Medicine* 8 (5): 651. https://doi.org/10.3390/jcm8050651.
- Grassivaro, Francesca, Ramesh Menon, Massimo Acquaviva, Linda Ottoboni, Francesca Ruffini, Andrea Bergamaschi, Luca Muzio, Cinthia Farina, y Gianvito Martino. 2020. "Convergence between Microglia and Peripheral Macrophages Phenotype during Development and Neuroinflammation". *The Journal of Neuroscience* 40 (4): 784–95. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1523-19.2019.
- Greenberg, S. M., y J. P. Vonsattel. 1997. "Diagnosis of Cerebral Amyloid Angiopathy. Sensitivity and Specificity of Cortical Biopsy". *Stroke* 28 (7): 1418–22. https://doi.org/10.1161/01.str.28.7.1418.
- Gregosa, Amal, Ángeles Vinuesa, María Florencia Todero, Carlos Pomilio, Soledad P. Rossi, Melisa Bentivegna, Jessica Presa, Shirley Wenker, Flavia Saravia, y Juan Beauquis. 2019. "Periodic dietary restriction ameliorates amyloid pathology and cognitive impairment in PDAPP-J20 mice: Potential implication of glial autophagy". *Neurobiology of Disease* 132 (diciembre): 104542. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104542.
- Grillo, S. L., N. A. Duggett, A. Ennaceur, y P. L. Chazot. 2013. "Non-invasive infra-red therapy (1072 nm) reduces β -amyloid protein levels in the brain of an Alzheimer's disease mouse model, TASTPM". *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 123 (junio): 13–22. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2013.02.015.
- Guillén-Yunta, Marina, Víctor Valcárcel-Hernández, Ángel García-Aldea, Guadalupe Soria, José Manuel García-Verdugo, Ana Montero-Pedraza, y Ana Guadaño-Ferraz. 2023. "Neurovascular unit disruption and blood–brain barrier leakage in MCT8 deficiency". *Fluids and Barriers of the CNS* 20 (1): 79. https://doi.org/10.1186/s12987-023-00481-w.
- Guizzetti, Marina, Nadia H. Moore, Gennaro Giordano, y Lucio G. Costa. 2008. "Modulation of Neuritogenesis by Astrocyte Muscarinic Receptors". *The Journal of Biological Chemistry* 283 (46): 31884–97. https://doi.org/10.1074/jbc.M801316200.
- Gurnik, Stefanie, Kavi Devraj, Jadranka Macas, Maiko Yamaji, Julia Starke, Alexander Scholz, Kathleen Sommer, et al. 2016. "Angiopoietin-2-Induced Blood-Brain Barrier Compromise and Increased Stroke Size Are Rescued by VE-PTP-Dependent Restoration of Tie2 Signaling". *Acta Neuropathologica* 131 (5): 753–73. https://doi.org/10.1007/s00401-016-1551-3.
- Haar, Harm J. van de, Saartje Burgmans, Jacobus F. A. Jansen, Matthias J. P. van Osch, Mark A. van Buchem, Majon Muller, Paul A. M. Hofman, Frans R. J. Verhey, y Walter H. Backes. 2016. "Blood-Brain Barrier Leakage in Patients with Early Alzheimer Disease". *Radiology* 281 (2): 527–35. https://doi.org/10.1148/radiol.2016152244.
- Halassa, Michael M., Tommaso Fellin, Hajime Takano, Jing-Hui Dong, y Philip G. Haydon. 2007. "Synaptic Islands Defined by the Territory of a Single Astrocyte". *Journal of Neuroscience* 27 (24): 6473–77. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1419-07.2007.

- Halder, Sebok K., y Richard Milner. 2019. "A Critical Role for Microglia in Maintaining Vascular Integrity in the Hypoxic Spinal Cord". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116 (51): 26029–37. <https://doi.org/10.1073/pnas.1912178116>.
- Hall, Catherine N., Clare Reynell, Bodil Gesslein, Nicola B. Hamilton, Anusha Mishra, Brad A. Sutherland, Fergus M. O'Farrell, Alastair M. Buchan, Martin Lauritzen, y David Attwell. 2014. "Capillary Pericytes Regulate Cerebral Blood Flow in Health and Disease". *Nature* 508 (7494): 55–60. <https://doi.org/10.1038/nature13165>.
- Haller, Sven, Meike W. Vernooij, Joost P. A. Kuijer, Elna-Marie Larsson, Hans Rolf Jäger, y Frederik Barkhof. 2018. "Cerebral Microbleeds: Imaging and Clinical Significance". *Radiology* 287 (1): 11–28. <https://doi.org/10.1148/radiol.2018170803>.
- Hanisch, Uwe-Karsten, y Helmut Kettenmann. 2007. "Microglia: Active Sensor and Versatile Effector Cells in the Normal and Pathologic Brain". *Nature Neuroscience* 10 (11): 1387–94. <https://doi.org/10.1038/nn1997>.
- Hanson, Angela J., Jennifer L. Bayer-Carter, Pattie S. Green, Thomas J. Montine, Charles W. Wilkinson, Laura D. Baker, G. Stennis Watson, et al. 2013. "Effect of Apolipoprotein E Genotype and Diet on Apolipoprotein E Lipidation and Amyloid Peptides: Randomized Clinical Trial". *JAMA Neurology* 70 (8): 972–80. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.396>.
- Hariharan, Ashwini, Colin D. Robertson, Daniela C. G. Garcia, y Thomas A. Longden. 2022. "Brain capillary pericytes are metabolic sentinels that control blood flow through a KATP channel-dependent energy switch". *Cell Reports* 41 (13): 111872. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111872>.
- Hartz, Anika M. S., Björn Bauer, Emma L. B. Soldner, Andrea Wolf, Sandra Boy, Roland Backhaus, Ivan Mihaljevic, et al. 2012. "Amyloid- β Contributes to Blood-Brain Barrier Leakage in Transgenic Human Amyloid Precursor Protein Mice and in Humans with Cerebral Amyloid Angiopathy". *Stroke* 43 (2): 514–23. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.627562>.
- Hashimoto, Yosuke, Chris Greene, Arnold Munnich, y Matthew Campbell. 2023. "The CLDN5 gene at the blood-brain barrier in health and disease". *Fluids and Barriers of the CNS* 20 (1): 22. <https://doi.org/10.1186/s12987-023-00424-5>.
- Haukedal, Henriette, y Kristine K. Freude. 2021. "Implications of Glycosylation in Alzheimer's Disease". *Frontiers in Neuroscience* 14 (enero): 625348. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.625348>.
- Hayes, Genevieve, Joana Pinto, Sierra N. Sparks, Congxiyu Wang, Sana Suri, y Daniel P. Bulte. 2022. "Vascular smooth muscle cell dysfunction in neurodegeneration". *Frontiers in Neuroscience* 16. <https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/articles/10.3389/fnins.2022.101016>.
- Hebert, Liesi E., Paul A. Scherr, Judith J. McCann, Laurel A. Beckett, y Denis A. Evans. 2001. "Is the Risk of Developing Alzheimer's Disease Greater for Women than for Men?" *American Journal of Epidemiology* 153 (2): 132–36. <https://doi.org/10.1093/aje/153.2.132>.
- Henderson, Jeffrey. 1923. "Cato Maior De Senectute". Loeb Classical Library. 1923. https://www.loebclassics.com/view/marcus_tullius_cicero-de_senectute/1923/pb_LCL154.5.xml.
- Heneka, Michael T., Róisín M. McManus, y Eicke Latz. 2018. "Inflammasome Signalling in Brain Function and Neurodegenerative Disease". *Nature Reviews. Neuroscience* 19 (10): 610–21. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0055-7>.
- Heo, Susie, Ruchika Shaurya Prakash, Michelle W. Voss, Kirk I. Erickson, Cheng Ouyang, Bradley P. Sutton, y Arthur F. Kramer. 2010. "Resting Hippocampal Blood Flow, Spatial Memory and Aging". *Brain Research* 1315 (febrero): 119–27. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.12.020>.
- Hertz, Leif, Liang Peng, y Gerald A. Dienel. 2007. "Energy Metabolism in Astrocytes: High Rate of Oxidative Metabolism and Spatiotemporal Dependence on

- Glycolysis/Glycogenolysis". *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 27 (2): 219–49. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600343>.
- Hetz, Claudio, y Smita Saxena. 2017. "ER Stress and the Unfolded Protein Response in Neurodegeneration". *Nature Reviews. Neurology* 13 (8): 477–91. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.99>.
- Heuer, Eric, Rebecca F. Rosen, Amarallys Cintron, y Lary C. Walker. 2012. "Nonhuman Primate Models of Alzheimer-Like Cerebral Proteopathy". *Current Pharmaceutical Design* 18 (8): 1159–69.
- Hollmann, Emma K., Amanda K. Bailey, Archit V. Potharazu, M. Diana Neely, Aaron B. Bowman, y Ethan S. Lippmann. 2017. "Accelerated differentiation of human induced pluripotent stem cells to blood–brain barrier endothelial cells". *Fluids and Barriers of the CNS* 14 (1): 9. <https://doi.org/10.1186/s12987-017-0059-0>.
- Hoozemans, J. J. M., R. Veerhuis, E. S. Van Haastert, J. M. Rozemuller, F. Baas, P. Eikelenboom, y W. Scheper. 2005. "The Unfolded Protein Response Is Activated in Alzheimer's Disease". *Acta Neuropathologica* 110 (2): 165–72. <https://doi.org/10.1007/s00401-005-1038-0>.
- Hoozemans, Jeroen J. M., Elise S. van Haastert, Diana A. T. Nijholt, Annemieke J. M. Rozemuller, Piet Eikelenboom, y Wiep Scheper. 2009. "The Unfolded Protein Response Is Activated in Pretangle Neurons in Alzheimer's Disease Hippocampus". *The American Journal of Pathology* 174 (4): 1241–51. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080814>.
- Hoshino, Tatsuya, Tadashi Nakaya, Wataru Araki, Keitarou Suzuki, Toshiharu Suzuki, y Tohru Mizushima. 2007. "Endoplasmic reticulum chaperones inhibit the production of amyloid- β peptides". *Biochemical Journal* 402 (3): 581–89. <https://doi.org/10.1042/BJ20061318>.
- Hudry, Eloise, Jonathan Dashkoff, Alysson D. Roe, Shuko Takeda, Robert M. Koffie, Tadafumi Hashimoto, Maria Scheel, et al. 2013. "Gene Transfer of Human Apoe Isoforms Results in Differential Modulation of Amyloid Deposition and Neurotoxicity in Mouse Brain". *Science translational medicine* 5 (212): 212ra161. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007000>.
- Hyman, Bradley T., Creighton H. Phelps, Thomas G. Beach, Eileen H. Bigio, Nigel J. Cairns, Maria C. Carrillo, Dennis W. Dickson, et al. 2012. "National Institute on Aging-Alzheimer's Association Guidelines for the Neuropathologic Assessment of Alzheimer's Disease". *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 8 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.10.007>.
- Hynd, Matthew R., Heather L. Scott, y Peter R. Dodd. 2004. "Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease". *Neurochemistry International* 45 (5): 583–95. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2004.03.007>.
- Iadecola, Costantino. 2013. "The Pathobiology of Vascular Dementia". *Neuron* 80 (4): 844–66. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.008>.
- . 2017. "The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease". *Neuron* 96 (1): 17–42. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.07.030>.
- Iliff, Jeffrey J., Minghuan Wang, Yonghong Liao, Benjamin A. Plogg, Weigu Peng, Georg A. Gundersen, Helene Benveniste, et al. 2012. "A Paravascular Pathway Facilitates CSF Flow Through the Brain Parenchyma and the Clearance of Interstitial Solutes, Including Amyloid β ". *Science Translational Medicine* 4 (147): 147ra111-147ra111. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003748>.
- Imura, Tetsuya, Kotoha Tane, Nana Toyoda, y Shinji Fushiki. 2008. "Endothelial Cell-Derived Bone Morphogenetic Proteins Regulate Glial Differentiation of Cortical Progenitors". *The European Journal of Neuroscience* 27 (7): 1596–1606. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06134.x>.
- Ishibashi, Satoru, Toshihiko Kuroiwa, Masanori Sakaguchi, Liyuan Sun, Toshihiko Kadoya, Hideyuki Okano, y Hidehiro Mizusawa. 2007. "Galectin-1 regulates neurogenesis in

- the subventricular zone and promotes functional recovery after stroke". *Experimental Neurology* 207 (2): 302–13. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.06.024>.
- Ishii, Makoto, y Costantino Iadecola. 2020. "Risk Factor for Alzheimer's Disease Breaks the Blood-Brain Barrier". *Nature* 581 (7806): 31–32. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-01152-8>.
- Islam, Tohidul, Anna L. Gharibyan, Solmaz A. Golchin, Nina Pettersson, Kristoffer Brännström, Isabell Hedberg, Merit-Miriam Virta, Linnea Olofsson, y Anders Olofsson. 2020. "Apolipoprotein E Impairs Amyloid- β Fibril Elongation and Maturation". *The FEBS Journal* 287 (6): 1208–19. <https://doi.org/10.1111/febs.15075>.
- Ismael, Saifudeen, null Wajidunnisa, Kazuko Sakata, Michael P. McDonald, Francesca-Fang Liao, y Tauheed Ishrat. 2021. "ER Stress Associated TXNIP-NLRP3 Inflammasome Activation in Hippocampus of Human Alzheimer's Disease". *Neurochemistry International* 148 (septiembre): 105104. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105104>.
- Iturria-Medina, Y., R. C. Sotero, P. J. Toussaint, J. M. Mateos-Pérez, y A. C. Evans. 2016. "Early Role of Vascular Dysregulation on Late-Onset Alzheimer's Disease Based on Multifactorial Data-Driven Analysis". *Nature Communications* 7 (1): 11934. <https://doi.org/10.1038/ncomms11934>.
- Jellinger, K. A. 2002. "Alzheimer Disease and Cerebrovascular Pathology: An Update". *Journal of Neural Transmission* 109 (5): 813–36. <https://doi.org/10.1007/s007020200068>.
- Jellinger, Kurt A. 2008. "Morphologic diagnosis of 'vascular dementia' — A critical update". *Journal of the Neurological Sciences* 270 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2008.03.006>.
- Jensen, Cathy J., Ann Massie, y Jacques De Keyser. 2013. "Immune Players in the CNS: The Astrocyte". *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 8 (4): 824–39. <https://doi.org/10.1007/s11481-013-9480-6>.
- Ji, Xiang, Tiago Ferreira, Beth Friedman, Rui Liu, Hannah Liechty, Erhan Bas, Jayaram Chandrashekhar, y David Kleinfeld. 2021. "Brain microvasculature has a common topology with local differences in geometry that match metabolic load". *Neuron* 109 (7): 1168–1187.e13. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.02.006>.
- Jiang, Chunteng, Liping Jiang, Qiannan Li, Xiaofang Liu, Tianjiao Zhang, Linlin Dong, Tiehong Liu, et al. 2018. "Acrolein Induces NLRP3 Inflammasome-Mediated Pyroptosis and Suppresses Migration via ROS-Dependent Autophagy in Vascular Endothelial Cells". *Toxicology* 410 (diciembre): 26–40. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.09.002>.
- Jiang, Shize, Rui Xia, Yong Jiang, Lei Wang, y Fabao Gao. 2014. "Vascular Endothelial Growth Factors Enhance the Permeability of the Mouse Blood-Brain Barrier". *PLOS ONE* 9 (2): e86407. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086407>.
- Johnson, Abbie C. 2023. "Hippocampal Vascular Supply and Its Role in Vascular Cognitive Impairment". *Stroke* 54 (3): 673–85. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.122.038263>.
- Jolivel, Valérie, Frank Bicker, Fabien Binamé, Robert Ploen, Stefanie Keller, René Gollan, Betty Jurek, et al. 2015. "Perivascular Microglia Promote Blood Vessel Disintegration in the Ischemic Penumbra". *Acta Neuropathologica* 129 (2): 279–95. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1372-1>.
- Jouve, Nathalie, Nicolas Despoix, Marion Espeli, Laurent Gauthier, Sophie Cypowyj, Karim Fallague, Claudine Schiff, Françoise Dignat-George, Frédéric Vély, y Aurélie S. Leroyer. 2013. "The Involvement of CD146 and Its Novel Ligand Galectin-1 in Apoptotic Regulation of Endothelial Cells". *The Journal of Biological Chemistry* 288 (4): 2571–79. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.418848>.
- Kaltschmidt, Barbara, y Christian Kaltschmidt. 2015. "NF-KappaB in Long-Term Memory and Structural Plasticity in the Adult Mammalian Brain". *Frontiers in Molecular Neuroscience* 8 (noviembre). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00069>.
- Kant, Rik van der, y Lawrence S. B. Goldstein. 2015. "Cellular Functions of the Amyloid

- Precursor Protein from Development to Dementia". *Developmental Cell* 32 (4): 502–15. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.022>.
- Karisetty, Bhanu Chandra, Akanksha Bhatnagar, Ellen M. Armour, Mariah Beaver, Haolin Zhang, y Felice Elefant. 2020. "Amyloid- β Peptide Impact on Synaptic Function and Neuroepigenetic Gene Control Reveal New Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease". *Frontiers in Molecular Neuroscience* 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2020.577622>.
- Kempermann, Gerd, Fred H. Gage, Ludwig Aigner, Hongjun Song, Maurice A. Curtis, Sandrine Thuret, H. Georg Kuhn, et al. 2018. "Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions". *Cell Stem Cell* 23 (1): 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.04.004>.
- Kfouri, Najla, Brandon B. Holmes, Hong Jiang, David M. Holtzman, y Marc I. Diamond. 2012. "Trans-Cellular Propagation of Tau Aggregation by Fibrillar Species *". *Journal of Biological Chemistry* 287 (23): 19440–51. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.346072>.
- Kharkongor, Ronyson, Pradeepkumar Nambi, y Rameshkumar Radhakrishnan. 2024. "Fucoidan protects CA1 pyramidal neurons of the hippocampus and preserves the cognitive profile of rats subjected to transient forebrain ischemia". *Brain Research* 1828 (abril): 148769. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2024.148769>.
- Kim, Boram, EunRan Suh, Aivi T. Nguyen, Stefan Prokop, Bailey Mikytuck, Olamide A. Olatunji, John L. Robinson, et al. 2022. "TREM2 Risk Variants Are Associated with Atypical Alzheimer's Disease". *Acta Neuropathologica* 144 (6): 1085–1102. <https://doi.org/10.1007/s00401-022-02495-4>.
- Kim, Jungsu, Jacob M. Basak, y David M. Holtzman. 2009. "The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease". *Neuron* 63 (3): 287–303. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.06.026>.
- Kim, Ki Jung, Juan Ramiro Diaz, Jennifer A. Iddings, y Jessica A. Filosa. 2016. "Vasculo-Neuronal Coupling: Retrograde Vascular Communication to Brain Neurons". *Journal of Neuroscience* 36 (50): 12624–39. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1300-16.2016>.
- Kim, Shin Heun, Ji Hoon Ahn, Hyunwoo Yang, Peter Lee, Gou Young Koh, y Yong Jeong. 2020. "Cerebral amyloid angiopathy aggravates perivascular clearance impairment in an Alzheimer's disease mouse model". *Acta Neuropathologica Communications* 8 (1): 181. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-01042-0>.
- Kim, Yong Nam, y Do Hoon Kim. 2012. "Decreased serum angiogenin level in Alzheimer's disease". *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 38 (2): 116–20. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.02.010>.
- Kimbrough, Ian F., Stefanie Robel, Erik D. Roberson, y Harald Sontheimer. 2015. "Vascular amyloidosis impairs the gliovascular unit in a mouse model of Alzheimer's disease". *Brain* 138 (12): 3716–33. <https://doi.org/10.1093/brain/awv327>.
- Kisler, Cassandra, Amy R. Nelson, Axel Montagne, y Berislav V. Zlokovic. 2017. "Cerebral Blood Flow Regulation and Neurovascular Dysfunction in Alzheimer Disease". *Nature Reviews. Neuroscience* 18 (7): 419–34. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.48>.
- Klegeris, Andis. 2021. "Targeting neuroprotective functions of astrocytes in neuroimmune diseases". *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 25 (4): 237–41. <https://doi.org/10.1080/14728222.2021.1915993>.
- Kofuji, Paulo, y Alfonso Araque. 2021. "G-Protein-Coupled Receptors in Astrocyte–Neuron Communication". *Neuroscience, Metabotropic Regulation of Synaptic Plasticity*, 456 (febrero): 71–84. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.03.025>.
- Kopp, Megan C., Natacha Larburu, Vinodh Durairaj, Christopher J. Adams, y Maruf M. U. Ali. 2019. "UPR Proteins IRE1 and PERK Switch BiP from Chaperone to ER Stress Sensor". *Nature Structural & Molecular Biology* 26 (11): 1053–62. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0324-9>.
- Korvatska, Olena, James B. Leverenz, Suman Jayadev, Pamela McMillan, Irina Kurtz, Xindi Guo, Malia Rumbaugh, et al. 2015. "R47H Variant of TREM2 Associated With

- Alzheimer Disease in a Large Late-Onset Family: Clinical, Genetic, and Neuropathological Study". *JAMA Neurology* 72 (8): 920–27. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2015.0979>.
- Koster, Kevin P., Riya Thomas, Alan W. J. Morris, y Leon M. Tai. 2016. "Epidermal Growth Factor Prevents Oligomeric Amyloid- β Induced Angiogenesis Deficits in Vitro". *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 36 (11): 1865–71. <https://doi.org/10.1177/0271678X16669956>.
- Kraepelin, Emil. 1915. *Psychiatrie: Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte*. J. A. Barth.
- Kriegstein, Arnold, y Arturo Alvarez-Buylla. 2009. "The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells". *Annual Review of Neuroscience* 32 (1): 149–84. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.051508.135600>.
- Kuhn, H. Georg, Tomohisa Toda, y Fred H. Gage. 2018. "Adult Hippocampal Neurogenesis: A Coming-of-Age Story". *Journal of Neuroscience* 38 (49): 10401–10. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2144-18.2018>.
- Kurihara, Dai, Masaki Ueno, Tatsuhide Tanaka, y Toshihide Yamashita. 2010. "Expression of galectin-1 in immune cells and glial cells after spinal cord injury". *Neuroscience Research* 66 (3): 265–70. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2009.11.008>.
- Kuroda, Takeshi, Motoyasu Honma, Yukiko Mori, Akinori Futamura, Azusa Sugimoto, Satoshi Yano, Ryuta Kinno, Hidetomo Murakami, y Kenjiro Ono. 2020. "Increased Presence of Cerebral Microbleeds Correlates With Ventricular Enlargement and Increased White Matter Hyperintensities in Alzheimer's Disease". *Frontiers in Aging Neuroscience* 12 (enero): 13. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.00013>.
- Kurz, Carolin, Lauren Walker, Boris-Stephan Rauchmann, y Robert Perneczky. 2022. "Dysfunction of the Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease: Evidence from Human Studies". *Neuropathology and Applied Neurobiology* 48 (3): e12782. <https://doi.org/10.1111/nan.12782>.
- Lane, C. A., J. Hardy, y J. M. Schott. 2018. "Alzheimer's Disease". *European Journal of Neurology* 25 (1): 59–70. <https://doi.org/10.1111/ene.13439>.
- Lau, Shun-Fat, Han Cao, Amy K. Y. Fu, y Nancy Y. Ip. 2020. "Single-nucleus transcriptome analysis reveals dysregulation of angiogenic endothelial cells and neuroprotective glia in Alzheimer's disease". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (41): 25800–809. <https://doi.org/10.1073/pnas.2008762117>.
- Laurent, Cyril, Luc Buée, y David Blum. 2018. "Tau and Neuroinflammation: What Impact for Alzheimer's Disease and Tauopathies?" *Biomedical Journal* 41 (1): 21–33. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.01.003>.
- Lee, Do Yeon, Kyu-Sun Lee, Hyun Jung Lee, Do Hee Kim, Yoo Hun Noh, Kweon Yu, Hee-Yeon Jung, et al. 2010. "Activation of PERK Signaling Attenuates A β -Mediated ER Stress". *PLOS ONE* 5 (5): e10489. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010489>.
- Lennon, Matthew J., Steve R. Makkar, John D. Crawford, y Perminder S. Sachdev. 2019. "Midlife Hypertension and Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis". *Journal of Alzheimer's Disease* 71 (1): 307–16. <https://doi.org/10.3233/JAD-190474>.
- Letenneur, L., V. Gilleron, D. Commenges, C. Helmer, J. M. Orgogozo, y J. F. Dartigues. 1999. "Are Sex and Educational Level Independent Predictors of Dementia and Alzheimer's Disease? Incidence Data from the PAQUID Project". *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 66 (2): 177–83. <https://doi.org/10.1136/jnnp.66.2.177>.
- Li, Shanshan, Yinquan Fang, Yihe Zhang, Mengmeng Song, Xilin Zhang, Xiao Ding, Hang Yao, et al. 2022. "Microglial NLRP3 Inflammasome Activates Neurotoxic Astrocytes in Depression-like Mice". *Cell Reports* 41 (4): 111532. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111532>.
- Li, Wei, Ronald E. Maloney, Magdalena L. Circu, J. Steven Alexander, y Tak Yee Aw. 2013. "Acute carbonyl stress induces occludin glycation and brain microvascular endothelial barrier dysfunction: Role for glutathione-dependent metabolism of

- methylglyoxal". *Free Radical Biology and Medicine* 54 (enero): 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.552>.
- Li, Xiao-Xue, Sun-Kai Ling, Ming-Yue Hu, Yu Ma, Yuan Li, y Pei-Lin Huang. 2019. "Protective Effects of Acarbose against Vascular Endothelial Dysfunction through Inhibiting Nox4/NLRP3 Inflammasome Pathway in Diabetic Rats". *Free Radical Biology & Medicine* 145 (diciembre): 175–86. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.09.015>.
- Li, Xinwei, Deyu Li, Qiongling Li, Yuxia Li, Kuncheng Li, Shuyu Li, y Ying Han. 2016. "Hippocampal Subfield Volumetry in Patients with Subcortical Vascular Mild Cognitive Impairment". *Scientific Reports* 6 (1): 20873. <https://doi.org/10.1038/srep20873>.
- Li, Yi, Ning Chen, Chao Wu, Yongquan Lu, Ge Gao, Chunli Duan, Hui Yang, y Lingling Lu. 2020. "Galectin-1 Attenuates Neurodegeneration in Parkinson's Disease Model by Modulating Microglial MAPK/IkB/NFkB Axis through Its Carbohydrate-Recognition Domain". *Brain, Behavior, and Immunity* 83 (enero): 214–25. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.10.015>.
- Li, Zhongming, Vincent M. Bruno, y Kwang Sik Kim. 2021. "Central Nervous System-Infecting Pathogens *Escherichia coli* and *Cryptococcus neoformans* Exploit the Host *Pdlim2* for Intracellular Traversal and Exocytosis in the Blood-Brain Barrier". *Infection and Immunity* 89 (10). <https://doi.org/10.1128/iai.00128-21>.
- Liang, Wen-Jing, Hong-Wei Yang, He-Nan Liu, Wei Qian, y Xiao-Long Chen. 2020. "HMGB1 upregulates NF- κ B by inhibiting IKB- α and associates with diabetic retinopathy". *Life Sciences* 241 (enero): 117146. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117146>.
- Liddelow, Shane A., Kevin A. Guttenplan, Laura E. Clarke, Frederick C. Bennett, Christopher J. Bohlen, Lucas Schirmer, Mariko L. Bennett, et al. 2017. "Neurotoxic Reactive Astrocytes Are Induced by Activated Microglia". *Nature* 541 (7638): 481–87. <https://doi.org/10.1038/nature21029>.
- Liebner, S., U. Kniesel, H. Kalbacher, y H. Wolburg. 2000. "Correlation of Tight Junction Morphology with the Expression of Tight Junction Proteins in Blood-Brain Barrier Endothelial Cells". *European Journal of Cell Biology* 79 (10): 707–17. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00101>.
- Liu, Dan, Hongtao Zhu, y Chuanzhou Li. 2023. "Galectins and galectin-mediated autophagy regulation: new insights into targeted cancer therapy". *Biomarker Research* 11 (1): 22. <https://doi.org/10.1186/s40364-023-00466-9>.
- Liu, Wenyuan, Adrian Wong, Andrew C.K. Law, y Vincent C.T. Mok. 2015. "Cerebrovascular Disease, Amyloid Plaques, and Dementia". *Stroke* 46 (5): 1402–7. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.006571>.
- Liu, Xiaofeng, Zhaohuan Zhang, Wei Guo, Geoffrey Burnstock, Cheng He, y Zhenghua Xiang. 2013. "The Superficial Glia Limitans of Mouse and Monkey Brain and Spinal Cord". *Anatomical Record (Hoboken, N.J.: 2007)* 296 (7): 995–1007. <https://doi.org/10.1002/ar.22717>.
- Liu, Xiaohui, Ning Jiang, y Wenxia Zhou. 2023. "Various Energetic Metabolism of Microglia in Response to Different Stimulations". *Molecules* 28 (11): 4501. <https://doi.org/10.3390/molecules28114501>.
- Liu, Yan Zhong, Zong Xiang Li, Lin Lin Zhang, Dan Wang, y Yi Ping Liu. 2022. "Phenotypic plasticity of vascular smooth muscle cells in vascular calcification: Role of mitochondria". *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 9 (octubre): 972836. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.972836>.
- Liu, Yingying, Yudiao Huang, Yueyue Xu, Peng Qu, y Minghua Wang. 2018. "Memantine Protects against Ischemia/Reperfusion-Induced Brain Endothelial Permeability". *IUBMB Life* 70 (4): 336–43. <https://doi.org/10.1002/iub.1729>.
- Liu, Zhongwu, y Michael Chopp. 2016. "Astrocytes, Therapeutic Targets for Neuroprotection and Neurorestoration in Ischemic Stroke". *Progress in Neurobiology* 144 (septiembre): 103–20. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.09.008>.
- Lochhead, Jeffrey J., Junzhi Yang, Patrick T. Ronaldson, y Thomas P. Davis. 2020.

- “Structure, Function, and Regulation of the Blood-Brain Barrier Tight Junction in Central Nervous System Disorders”. *Frontiers in Physiology* 11 (agosto): 914. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00914>.
- Lohela, Terhi J., Tuomas O. Lilius, y Maiken Nedergaard. 2022. “The Glymphatic System: Implications for Drugs for Central Nervous System Diseases”. *Nature Reviews Drug Discovery* 21 (10): 763–79. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00500-9>.
- Loi, Marisa, y Maurizio Molinari. 2020. “Mechanistic insights in recov-ER-phagy: micro-ER-phagy to recover from stress”. *Autophagy* 16 (2): 385–86. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1709767>.
- Ludewig, Peter, Jack Winneberger, y Tim Magnus. 2019. “The cerebral endothelial cell as a key regulator of inflammatory processes in sterile inflammation”. *Journal of Neuroimmunology* 326 (enero): 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.10.012>.
- Luo, Lanxin, Shanshan Song, Chibundum C. Ezenwukwa, Shayan Jalali, Baoshan Sun, y Dandan Sun. 2021. “Ion Channels and Transporters in Microglial Function in Physiology and Brain Diseases”. *Neurochemistry International* 142 (enero): 104925. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2020.104925>.
- Lv, Zhen-Huan, Trinh Anh Phuong, Shi-Jie Jin, Xiao-Xue Li, y Ming Xu. 2017. “Protection by Simvastatin on Hyperglycemia-Induced Endothelial Dysfunction through Inhibiting NLRP3 Inflammasomes”. *Oncotarget* 8 (53): 91291–305. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20443>.
- Ly, J. V., G. A. Donnan, V. L. Villemagne, J. A. Zavala, H. Ma, G. O’Keefe, S. J. Gong, et al. 2010. “¹¹C-PIB Binding Is Increased in Patients with Cerebral Amyloid Angiopathy-Related Hemorrhage”. *Neurology* 74 (6): 487–93. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181cef7e3>.
- Magni, Giulia, Benedetta Riboldi, y Stefania Ceruti. 2024. “Human Glial Cells as Innovative Targets for the Therapy of Central Nervous System Pathologies”. *Cells* 13 (7): 606. <https://doi.org/10.3390/cells13070606>.
- Mariño, Karina V., Alejandro J. Cagnoni, Diego O. Croci, y Gabriel A. Rabinovich. 2023. “Targeting Galectin-Driven Regulatory Circuits in Cancer and Fibrosis”. *Nature Reviews Drug Discovery* 22 (4): 295–316. <https://doi.org/10.1038/s41573-023-00636-2>.
- Marques, Tainá M., Anouke van Rumund, Ilona B. Bruinsma, Hans J. C. T. Wessels, Jolein Gloerich, Rianne A. J. Esselink, Bastiaan R. Bloem, H. Bea Kuiperij, y Marcel M. Verbeek. 2019. “Cerebrospinal Fluid Galectin-1 Levels Discriminate Patients with Parkinsonism from Controls”. *Molecular Neurobiology* 56 (7): 5067–74. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1426-9>.
- Martínez, Gabriela, Claudia Duran-Aniotz, Felipe Cabral-Miranda, Juan P. Vivar, y Claudio Hetz. 2017. “Endoplasmic Reticulum Proteostasis Impairment in Aging”. *Aging Cell* 16 (4): 615–23. <https://doi.org/10.1111/acel.12599>.
- Matthews, F. E., B. C. M. Stephan, L. Robinson, C. Jagger, L. E. Barnes, A. Arthur, y C. Brayne. 2016. “A Two Decade Dementia Incidence Comparison from the Cognitive Function and Ageing Studies I and II”. *Nature Communications* 7 (1): 11398. <https://doi.org/10.1038/ncomms11398>.
- Maurel, M., E. Chevet, J. Tavernier, y S. Gerlo. 2014. “Getting RIDD of RNA: IRE1 in Cell Fate Regulation”. *Trends in Biochemical Sciences* 39 (5): 245–54. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.008>.
- McDowell, Ian, Guoliang Xi, Joan Lindsay, y Mary Tierney. 2007. “Mapping the connections between education and dementia”. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology* 29 (2): 127–41. <https://doi.org/10.1080/13803390600582420>.
- McKhann, Guy M., David S. Knopman, Howard Chertkow, Bradley T. Hyman, Clifford R. Jack, Claudia H. Kawas, William E. Klunk, et al. 2011. “The Diagnosis of Dementia Due to Alzheimer’s Disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer’s Association Workgroups on Diagnostic Guidelines for Alzheimer’s Disease”. *Alzheimer’s & Dementia: The Journal of the Alzheimer’s Association* 7 (3):

- 263–69. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005>.
- Mehta, Vedanta, Kar-Lai Pang, Christopher S. Givens, Zhongming Chen, Jianhua Huang, Daniel T. Sweet, Hanjoong Jo, John S. Reader, y Ellie Tzima. 2021. “Mechanical Forces Regulate Endothelial-to-Mesenchymal Transition and Atherosclerosis via an Alk5-Shc Mechanotransduction Pathway”. *Science Advances* 7 (28): eabg5060. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abg5060>.
- Mendez-Huergo, Santiago P., Sebastián M. Maller, Mauricio F. Farez, Karina Mariño, Jorge Correale, y Gabriel A. Rabinovich. 2014. “Integration of Lectin-Glycan Recognition Systems and Immune Cell Networks in CNS Inflammation”. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 25 (3): 247–55. <https://doi.org/10.1016/j.cytofr.2014.02.003>.
- Merighi, Stefania, Manuela Nigro, Alessia Travagli, y Stefania Gessi. 2022. “Microglia and Alzheimer’s Disease”. *International Journal of Molecular Sciences* 23 (21): 12990. <https://doi.org/10.3390/ijms232112990>.
- Merkulova-Rainon, Tatyana, Chris S. Mantsounga, Dong Broquères-You, Cristina Pinto, José Vilar, Diana Cifuentes, Philippe Bonnin, et al. 2018. “Peripheral Post-Ischemic Vascular Repair Is Impaired in a Murine Model of Alzheimer’s Disease”. *Angiogenesis* 21 (3): 557–69. <https://doi.org/10.1007/s10456-018-9608-7>.
- Mestre, Humberto, Lauren M Hablitz, Anna LR Xavier, Weixi Feng, Wenyen Zou, Tinglin Pu, Hiromu Monai, et al. 2018. “Aquaporin-4-dependent glymphatic solute transport in the rodent brain”. Editado por David Kleinfeld y Sean J Morrison. *eLife* 7 (diciembre): e40070. <https://doi.org/10.7554/eLife.40070>.
- Mielke, Michelle M., Neelum T. Aggarwal, Clara Vila-Castelar, Puja Agarwal, Eider M. Arenaza-Urquijo, Benjamin Brett, Anna Brugulat-Serrat, et al. 2022. “Consideration of Sex and Gender in Alzheimer’s Disease and Related Disorders from a Global Perspective”. *Alzheimer’s & Dementia: The Journal of the Alzheimer’s Association* 18 (12): 2707–24. <https://doi.org/10.1002/alz.12662>.
- Miraglia, M. Cruz, Miriam M. Costa Franco, Ana M. Rodriguez, Paula M. Q. Bellozi, Carina C. Ferrari, Maria I. Farias, Vida A. Dennis, et al. 2016. “Glial Cell–Elicited Activation of Brain Microvasculature in Response to *Brucella abortus* Infection Requires ASC Inflammasome–Dependent IL-1 β Production”. *The Journal of Immunology* 196 (9): 3794–3805. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500908>.
- Miraglia, María C., Ana M. Rodriguez, Paula Barrionuevo, Julia Rodriguez, Kwang S. Kim, Vida A. Dennis, M. Victoria Delpino, y Guillermo H. Giambartolomei. 2018. “*Brucella abortus* Traverses Brain Microvascular Endothelial Cells Using Infected Monocytes as a Trojan Horse”. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 8.
- Moiseeva, Elena P, Bryan Williams, Alison H Goodall, y Nilesh J Samani. 2003. “Galectin-1 interacts with β -1 subunit of integrin”. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 310 (3): 1010–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.112>.
- Montagne, Axel, Samuel R. Barnes, Melanie D. Sweeney, Matthew R. Halliday, Abhay P. Sagare, Zhen Zhao, Arthur W. Toga, et al. 2015. “Blood-Brain Barrier Breakdown in the Aging Human Hippocampus”. *Neuron* 85 (2): 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.032>.
- Montagne, Axel, Daniel A. Nation, Abhay P. Sagare, Giuseppe Barisano, Melanie D. Sweeney, Ararat Chakhoyan, Maricarmen Pachicano, et al. 2020. “APOE4 Leads to Blood-Brain Barrier Dysfunction Predicting Cognitive Decline”. *Nature* 581 (7806): 71–76. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2247-3>.
- Morel, Bertrand, Maria Paz Carrasco, Samuel Jurado, Carmen Marco, y Francisco Conejero-Lara. 2018. “Dynamic Micellar Oligomers of Amyloid Beta Peptides Play a Crucial Role in Their Aggregation Mechanisms”. *Physical Chemistry Chemical Physics* 20 (31): 20597–614. <https://doi.org/10.1039/C8CP02685H>.
- Mortensen, Kristian Nygaard, Simon Sanggaard, Humberto Mestre, Hedok Lee, Serhii Kostrikov, Anna L. R. Xavier, Albert Gjedde, Helene Benveniste, y Maiken Nedergaard. 2019. “Impaired Glymphatic Transport in Spontaneously Hypertensive Rats”. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 39 (32): 6365–77. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1974-18.2019>.

- Mosconi, Lisa. 2013. "Glucose Metabolism in Normal Aging and Alzheimer's Disease: Methodological and Physiological Considerations for PET Studies". *Clinical and Translational Imaging* 1 (4). <https://doi.org/10.1007/s40336-013-0026-y>.
- Mucke, L., E. Masliah, G. Q. Yu, M. Mallory, E. M. Rockenstein, G. Tatsuno, K. Hu, D. Kholodenko, K. Johnson-Wood, y L. McConlogue. 2000. "High-Level Neuronal Expression of Abeta 1-42 in Wild-Type Human Amyloid Protein Precursor Transgenic Mice: Synaptotoxicity without Plaque Formation". *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20 (11): 4050–58. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-11-04050.2000>.
- Müller, Ulrike C., Thomas Deller, y Martin Korte. 2017. "Not Just Amyloid: Physiological Functions of the Amyloid Precursor Protein Family". *Nature Reviews. Neuroscience* 18 (5): 281–98. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.29>.
- Mulligan, Sean J., y Brian A. MacVicar. 2004. "Calcium Transients in Astrocyte Endfeet Cause Cerebrovascular Constrictions". *Nature* 431 (7005): 195–99. <https://doi.org/10.1038/nature02827>.
- Muñoz, Yorka, Andrea C. Paula-Lima, y Marco T. Núñez. 2018. "Reactive oxygen species released from astrocytes treated with amyloid beta oligomers elicit neuronal calcium signals that decrease phospho-Ser727-STAT3 nuclear content". *Free Radical Biology and Medicine* 117 (marzo): 132–44. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.006>.
- Mussbacher, Marion, Manuel Salzmann, Christine Brostjan, Bastian Hoesel, Christian Schoergenhofer, Hannes Datler, Philipp Hohensinner, et al. 2019. "Cell Type-Specific Roles of NF-κB Linking Inflammation and Thrombosis". *Frontiers in Immunology* 10 (febrero). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00085>.
- Nagelhus, Erlend A., y Ole P. Ottersen. 2013. "Physiological Roles of Aquaporin-4 in Brain". *Physiological Reviews* 93 (4): 1543–62. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2013>.
- Nair, Arya Lekshmi, Linda Groenendijk, Roos Overdevest, Tania M. Fowke, Rumaisha Annida, Orsola Mocellin, Helga E. de Vries, y Nienke R. Wevers. 2023. "Human BBB-on-a-chip reveals barrier disruption, endothelial inflammation, and T cell migration under neuroinflammatory conditions". *Frontiers in Molecular Neuroscience* 16 (septiembre):1250123. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1250123>.
- Nation, Daniel A., Melanie D. Sweeney, Axel Montagne, Abhay P. Sagare, Lina M. D'Orazio, Maricarmen Pachicano, Farshid Sepehrband, et al. 2019. "Blood-Brain Barrier Breakdown Is an Early Biomarker of Human Cognitive Dysfunction". *Nature Medicine* 25 (2): 270–76. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0297-y>.
- Nayak, Debasis, Theodore L. Roth, y Dorian B. McGavern. 2014. "Microglia Development and Function". *Annual Review of Immunology* 32: 367–402. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120240>.
- Neumann, Harald, Thomas Misgeld, Kenji Matsumuro, y Hartmut Wekerle. 1998. "Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: Involvement of the p75 neurotrophin receptor". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (10): 5779–84. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.10.5779>.
- Nikonenko, Alexander G., Lidija Radenovic, Pavle R. Andjus, y Galyna G. Skibo. 2009. "Structural Features of Ischemic Damage in the Hippocampus". *Anatomical Record (Hoboken, N.J.: 2007)* 292 (12): 1914–21. <https://doi.org/10.1002/ar.20969>.
- Niwa, Kiyoshi, Valerie A. Porter, Ken Kazama, David Cornfield, George A. Carlson, y Costantino Iadecola. 2001. "A β -peptides enhance vasoconstriction in cerebral circulation". *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 281 (6): H2417–24. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.281.6.H2417>.
- Noguchi-Shinohara, Moeko, Junji Komatsu, Miharu Samuraki, Ichiro Matsunari, Tokuhei Ikeda, Kenji Sakai, Tsuyoshi Hamaguchi, Kenjiro Ono, Hiroyuki Nakamura, y Masahito Yamada. 2017. "Cerebral Amyloid Angiopathy-Related Microbleeds and Cerebrospinal Fluid Biomarkers in Alzheimer's Disease". *Journal of Alzheimer's Disease* 55 (3): 905–13. <https://doi.org/10.3233/JAD-160651>.
- Obermeier, Birgit, Richard Daneman, y Richard M. Ransohoff. 2013. "Development,

- Maintenance and Disruption of the Blood-Brain Barrier". *Nature Medicine* 19 (12): 1584–96. <https://doi.org/10.1038/nm.3407>.
- O'Brien, Richard J., y Philip C. Wong. 2011. "Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease". *Annual Review of Neuroscience* 34: 185–204. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-061010-113613>.
- Olsson, Fredrik, Staffan Schmidt, Veit Althoff, Lisa M. Munter, Shaobo Jin, Susanne Rosqvist, Urban Lendahl, Gerd Multhaup, y Johan Lundkvist. 2014. "Characterization of Intermediate Steps in Amyloid Beta (A β) Production under near-Native Conditions". *The Journal of Biological Chemistry* 289 (3): 1540–50. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.498246>.
- Pfaffl, M. W. 2001. "A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR". *Nucleic Acids Research* 29 (9): e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- Pan, Longfei, Zhou Hong, Lei Yu, Yanxia Gao, Rui Zhang, Hui Feng, Lijuan Su, y Gang Wang. 2017. "Shear stress induces human aortic endothelial cell apoptosis via interleukin-1 receptor-associated kinase 2-induced endoplasmic reticulum stress". *Molecular Medicine Reports* 16 (5): 7205–12. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7524>.
- Paranjape, Geeta S., Lisa K. Gouwens, David C. Osborn, y Michael R. Nichols. 2012. "Isolated Amyloid- β (1-42) Prototibrils, but Not Isolated Fibrils, Are Robust Stimulators of Microglia". *ACS Chemical Neuroscience* 3 (4): 302–11. <https://doi.org/10.1021/cn2001238>.
- Paris, Daniel, Nowel Ganey, Magdalena Banasiak, Vincent Laporte, Nikunj Patel, Myles Mullan, Susan F. Murphy, et al. 2010. "Impaired Orthotopic Glioma Growth and Vascularization in Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease". *Journal of Neuroscience* 30 (34): 11251–58. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2586-10.2010>.
- Park, Laibaik, Kenzo Koizumi, Sleiman El Jamal, Ping Zhou, Mary Lou Previti, William E. Van Nostrand, George Carlson, y Costantino Iadecola. 2014. "Age-Dependent Neurovascular Dysfunction and Damage in a Mouse Model of Cerebral Amyloid Angiopathy". *Stroke* 45 (6): 1815–21. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.114.005179>.
- Parodi-Rullán, Rebecca, Jorge Ghiso, Erwin Cabrera, Agueda Rostagno, y Silvia Fossati. 2020. "Alzheimer's Amyloid β Heterogeneous Species Differentially Affect Brain Endothelial Cell Viability, Blood-Brain Barrier Integrity, and Angiogenesis". *Aging Cell* 19 (11): e13258. <https://doi.org/10.1111/acel.13258>.
- Parodi-Rullán, Rebecca, Je Yeong Sone, y Silvia Fossati. 2019. "Endothelial Mitochondrial Dysfunction in Cerebral Amyloid Angiopathy and Alzheimer's Disease". *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 72 (4): 1019–39. <https://doi.org/10.3233/JAD-190357>.
- Paschen, Wulf, y Thorsten Mengesdorf. 2005. "Cellular Abnormalities Linked to Endoplasmic Reticulum Dysfunction in Cerebrovascular Disease--Therapeutic Potential". *Pharmacology & Therapeutics* 108 (3): 362–75. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.05.008>.
- Pérez Sáez, Juan M., Pablo F. Hockl, Alejandro J. Cagnoni, Santiago P. Méndez Huergo, Pablo A. García, Sabrina G. Gatto, Juan P. Cerliani, Diego O. Croci, y Gabriel A. Rabinovich. 2021. "Characterization of a Neutralizing Anti-Human Galectin-1 Monoclonal Antibody with Angioregulatory and Immunomodulatory Activities". *Angiogenesis* 24 (1): 1–5. <https://doi.org/10.1007/s10456-020-09749-3>.
- Perosa, Valentina, Anastasia Priester, Gabriel Ziegler, Arturo Cardenas-Blanco, Laura Dobisch, Marco Spallazzi, Anne Assmann, et al. 2020. "Hippocampal vascular reserve associated with cognitive performance and hippocampal volume". *Brain* 143 (2): 622–34. <https://doi.org/10.1093/brain/awz383>.
- Petrushanko, Irina Yu., Vladimir A. Mitkevich, y Alexander A. Makarov. 2023. "Effect of β -Amyloid on Blood-Brain Barrier Properties and Function". *Biophysical Reviews* 15 (2): 183–97. <https://doi.org/10.1007/s12551-023-01052-x>.
- Pinho, Salomé S., Inês Alves, Joana Gaifem, y Gabriel A. Rabinovich. 2023. "Immune

- Regulatory Networks Coordinated by Glycans and Glycan-Binding Proteins in Autoimmunity and Infection". *Cellular & Molecular Immunology* 20 (10): 1101–13. <https://doi.org/10.1038/s41423-023-01074-1>.
- Pinton, P., C. Giorgi, R. Siviero, E. Zecchini, y R. Rizzuto. 2008. "Calcium and Apoptosis: ER-Mitochondria Ca²⁺ Transfer in the Control of Apoptosis". *Oncogene* 27 (50): 6407–18. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.308>.
- Poittevin, Marine, Pierre Lozeron, Rose Hilal, Bernard I. Levy, Tatiana Merkulova-Rainon, y Nathalie Kubis. 2014. "Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching in Stroke". *Translational Stroke Research* 5 (3): 377–84. <https://doi.org/10.1007/s12975-013-0306-x>.
- Poliakova, T., O. Levin, A. Arablinskiy, E. Vasenina, y I. Zerr. 2016. "Cerebral Microbleeds in Early Alzheimer's Disease". *Journal of Neurology* 263 (10): 1961–68. <https://doi.org/10.1007/s00415-016-8220-2>.
- Pomilio, Carlos, Patricio Pavia, Roxana Mayra Gorjod, Angeles Vinuesa, Agustina Alaimo, Veronica Galvan, Monica Lidia Kotler, Juan Beauquis, y Flavia Saravia. 2016. "Glial Alterations from Early to Late Stages in a Model of Alzheimer's Disease: Evidence of Autophagy Involvement in A β Internalization". *Hippocampus* 26 (2): 194–210. <https://doi.org/10.1002/hipo.22503>.
- Presas, Jessica L., Flavia Saravia, Zsolt Bagi, y Jessica A. Filosa. 2020. "Vasculo-Neuronal Coupling and Neurovascular Coupling at the Neurovascular Unit: Impact of Hypertension". *Frontiers in Physiology* 11. <https://www.frontiersin.org/journals/physiology/articles/10.3389/fphys.2020.584135>.
- Qin, Wei, Xiangfei Jia, Fen Wang, Xiumei Zuo, Liyong Wu, Aihong Zhou, Dan Li, et al. 2015. "Elevated Plasma Angiogenesis Factors in Alzheimer's Disease". *Journal of Alzheimer's Disease* 45 (1): 245–52. <https://doi.org/10.3233/JAD-142409>.
- Qu, Wen-sheng, Yi-hui Wang, Jian-ping Wang, Ying-xin Tang, Qiang Zhang, Dai-shi Tian, Zhi-yuan Yu, Min-jie Xie, y Wei Wang. 2010. "Galectin-1 Enhances Astrocytic BDNF Production and Improves Functional Outcome in Rats Following Ischemia". *Neurochemical Research* 35 (11): 1716–24. <https://doi.org/10.1007/s11064-010-0234-z>.
- Quintá, H. R., J. M. Pasquini, G. A. Rabinovich, y L. A. Pasquini. 2014. "Glycan-Dependent Binding of Galectin-1 to Neuropilin-1 Promotes Axonal Regeneration after Spinal Cord Injury". *Cell Death & Differentiation* 21 (6): 941–55. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.14>.
- Qureshi, Saba, Stephanie Lee, William Steidl, Lukas Ritzer, Michael Parise, Ananya Chaubal, y Varun Kumar. 2023. "Endoplasmic Reticulum Stress Disrupts Mitochondrial Bioenergetics, Dynamics and Causes Corneal Endothelial Cell Apoptosis". *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 64 (14): 18. <https://doi.org/10.1167/iovs.64.14.18>.
- Rabinovich, Gabriel A., Gordon Daly, Hanna Dreja, Hitakshi Tailor, Clelia M. Riera, Jun Hirabayashi, y Yuti Chernajovsky. 1999. "Recombinant Galectin-1 and Its Genetic Delivery Suppress Collagen-Induced Arthritis via T Cell Apoptosis". *The Journal of Experimental Medicine* 190 (3): 385–98.
- Rabinovich, Gabriel A., y Diego O. Croci. 2012. "Regulatory Circuits Mediated by Lectin-Glycan Interactions in Autoimmunity and Cancer". *Immunity* 36 (3): 322–35. <https://doi.org/10.1016/j.jimmuni.2012.03.004>.
- Rabinovich, Gabriel A., y Marta A. Toscano. 2009. "Turning 'sweet' on Immunity: Galectin-Glycan Interactions in Immune Tolerance and Inflammation". *Nature Reviews Immunology* 9 (5): 338–52. <https://doi.org/10.1038/nri2536>.
- Rahman, Safikur, Ayyagari Archana, Arif Tasleem Jan, y Rinki Minakshi. 2018. "Dissecting Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response (UPRER) in Managing Clandestine Modus Operandi of Alzheimer's Disease". *Frontiers in Aging Neuroscience* 10 (febrero): 30. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00030>.
- Ransohoff, Richard M., y V. Hugh Perry. 2009. "Microglial Physiology: Unique Stimuli, Specialized Responses". *Annual Review of Immunology* 27: 119–45.

- https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132528.
- Reitz, Christiane, Carol Brayne, y Richard Mayeux. 2011. "Epidemiology of Alzheimer Disease". *Nature Reviews. Neurology* 7 (3): 137–52. https://doi.org/10.1038/nrneurol.2011.2.
- Ren, Jun, Yuguang Bi, James R. Sowers, Claudio Hetz, y Yingmei Zhang. 2021. "Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response in Cardiovascular Diseases". *Nature Reviews. Cardiology* 18 (7): 499–521. https://doi.org/10.1038/s41569-021-00511-w.
- Richiardi, Jonas, Andreas U. Monsch, Tanja Haas, Frederik Barkhof, Dimitri Van de Ville, Ernst W. Radü, Reto W. Kressig, y Sven Haller. 2015. "Altered Cerebrovascular Reactivity Velocity in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease". *Neurobiology of Aging* 36 (1): 33–41. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.07.020.
- Rinaldi, Mariana, Laura Thomas, Patricia Mathieu, Pablo Carabias, Maria F. Troncoso, Juana M. Pasquini, Gabriel A. Rabinovich, y Laura A. Pasquini. 2016. "Galectin-1 Circumvents Lysolecithin-Induced Demyelination through the Modulation of Microglial Polarization/Phagocytosis and Oligodendroglial Differentiation". *Neurobiology of Disease* 96 (diciembre): 127–43. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2016.09.003.
- Roberts, Jill, Michael P. Kahle, y Gregory J. Bix. 2012. "Perlecan and the Blood-Brain Barrier: Beneficial Proteolysis?" *Frontiers in Pharmacology* 3: 155. https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00155.
- Rochfort, Keith D., Laura E. Collins, Ronan P. Murphy, y Philip M. Cummins. 2014. "Downregulation of Blood-Brain Barrier Phenotype by Proinflammatory Cytokines Involves NADPH Oxidase-Dependent ROS Generation: Consequences for Interendothelial Adherens and Tight Junctions". *PLOS ONE* 9 (7): e101815. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101815.
- Rodríguez-Baeza, Alfonso, Francisco Reina-De La Torre, Marisa Ortega-Sánchez, y Joan Sahuquillo-Barris. 1998. "Perivascular Structures in Corrosion Casts of the Human Central Nervous System: A Confocal Laser and Scanning Electron Microscope Study". *The Anatomical Record* 252 (2): 176–84. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199810)252:2<176::AID-AR3>3.0.CO;2-1.
- Roldán-Montero, Raquel, Juan M. Pérez-Sáez, Isabel Cerro-Pardo, Jorge Oller, Diego Martínez-López, Estefanía Nuñez, Sebastian M. Maller, et al. 2022. "Galectin-1 prevents pathological vascular remodeling in atherosclerosis and abdominal aortic aneurysm". *Science Advances* 8 (11): eabm7322. https://doi.org/10.1126/sciadv.abm7322.
- Román, Gustavo. 2003. "Vascular Dementia: A Historical Background". *International Psychogeriatrics* 15 (S1): 11–13. https://doi.org/10.1017/S1041610203008901.
- Romero, José R., Alexa Beiser, Jayandra J. Himali, Ashkan Shoamanesh, Charles DeCarli, y Sudha Seshadri. 2017. "Cerebral Microbleeds and risk of Incident Dementia: The Framingham Heart Study". *Neurobiology of aging* 54 (junio): 94–99. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.02.018.
- Roßner, Steffen, Magdalena Sastre, Krystyn Bourne, y Stefan F. Lichtenthaler. 2006. "Transcriptional and translational regulation of BACE1 expression—Implications for Alzheimer's disease". *Progress in Neurobiology* 79 (2): 95–111. https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.06.001.
- Rubinstein, Natalia, Mariano Alvarez, Norberto W Zwirner, Marta A Toscano, Juan M Ilarregui, Alicia Bravo, José Mordoh, Leonardo Fainboim, Osvaldo L Podhajcer, y Gabriel A Rabinovich. 2004. "Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection: A potential mechanism of tumor-immune privilege". *Cancer Cell* 5 (3): 241–51. https://doi.org/10.1016/S1535-6108(04)00024-8.
- Rummel, Nicole G., y D. Allan Butterfield. 2022. "Altered Metabolism in Alzheimer Disease Brain: Role of Oxidative Stress". *Antioxidants & Redox Signaling* 36 (16–18): 1289–1305. https://doi.org/10.1089/ars.2021.0177.

- Rymo, Simin F., Holger Gerhardt, Fredrik Wolfhagen Sand, Richard Lang, Anne Uv, y Christer Betsholtz. 2011. "A Two-Way Communication between Microglial Cells and Angiogenic Sprouts Regulates Angiogenesis in Aortic Ring Cultures". *PLOS ONE* 6 (1): e15846. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015846>.
- Sakaguchi, Masanori, Maithe Arruda-Carvalho, Na Hyea Kang, Yoichi Imaizumi, Françoise Poirier, Hideyuki Okano, y Paul W. Frankland. 2011. "Impaired spatial and contextual memory formation in galectin-1 deficient mice". *Molecular Brain* 4 (1): 33. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-33>.
- Salehpour, Farzad, Javad Mahmoudi, Farzin Kamari, Saeed Sadigh-Eteghad, Seyed Hossein Rasta, y Michael R. Hamblin. 2018. "Brain Photobiomodulation Therapy: A Narrative Review". *Molecular Neurobiology* 55 (8): 6601–36. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0852-4>.
- Salman, Mootaz M., Graham Marsh, Ilja Kusters, Matthieu Delincé, Giuseppe Di Caprio, Srivikul Upadhyayula, Giovanni de Nola, et al. 2020. "Design and Validation of a Human Brain Endothelial Microvessel-on-a-Chip Open Microfluidic Model Enabling Advanced Optical Imaging". *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8 (septiembre). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.573775>.
- Sarlus, Heela, y Michael T. Heneka. 2017. "Microglia in Alzheimer's Disease". *The Journal of Clinical Investigation* 127 (9): 3240–49. <https://doi.org/10.1172/JCI90606>.
- Sasaki, Tasuku, Jun Hirabayashi, Hiroshi Manya, Ken-ichi Kasai, y Tamao Endo. 2004. "Galectin-1 induces astrocyte differentiation, which leads to production of brain-derived neurotrophic factor". *Glycobiology* 14 (4): 357–63. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh043>.
- Satoh, Jun-ichi, Hiroko Tabunoki, Takashi Yamamura, Kunimasa Arima, y Hidehiko Konno. 2007. "Human Astrocytes Express Aquaporin-1 and Aquaporin-4 in Vitro and in Vivo". *Neuropathology: Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology* 27 (3): 245–56. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2007.00774.x>.
- Savettieri, Giovanni, Italia Di Liegro, Caterina Catania, Luana Licata, Giovanna Laura Pitarresi, Stefania D'Agostino, Gabriella Schiera, et al. 2000. "Neurons and ECM Regulate Occludin Localization in Brain Endothelial Cells". *NeuroReport* 11 (5): 1081.
- Scearce-Levie, Kimberly, Pascal E. Sanchez, y Joseph W. Lewcock. 2020. "Leveraging Preclinical Models for the Development of Alzheimer Disease Therapeutics". *Nature Reviews Drug Discovery* 19 (7): 447–62. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0065-9>.
- Semyachkina-Glushkovskaya, Oxana, Thomas Penzel, Inna Blokhina, Alexander Khorovodov, Ivan Fedosov, Tingting Yu, Georgy Karandin, et al. 2021. "Night Photostimulation of Clearance of Beta-Amyloid from Mouse Brain: New Strategies in Preventing Alzheimer's Disease". *Cells* 10 (12): 3289. <https://doi.org/10.3390/cells10123289>.
- Sepehry, A. A., D. Lang, G.-Y. Hsiung, y A. Rauscher. 2016. "Prevalence of Brain Microbleeds in Alzheimer Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis on the Influence of Neuroimaging Techniques". *American Journal of Neuroradiology* 37 (2): 215–22. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A4525>.
- Seshadri, S., P. A. Wolf, A. Beiser, R. Au, K. McNulty, R. White, y R. B. D'Agostino. 1997. "Lifetime risk of dementia and Alzheimer's disease". *Neurology* 49 (6): 1498–1504. <https://doi.org/10.1212/WNL.49.6.1498>.
- Sevigny, Jeff, Ping Chiao, Thierry Bussière, Paul H. Weinreb, Leslie Williams, Marcel Maier, Robert Dunstan, et al. 2016. "The Antibody Aducanumab Reduces A β Plaques in Alzheimer's Disease". *Nature* 537 (7618): 50–56. <https://doi.org/10.1038/nature19323>.
- Shams, S., J. Martola, T. Granberg, X. Li, M. Shams, S. M. Fereshtehnejad, L. Cavallin, P. Aspelin, M. Kristoffersen-Wiberg, y L. O. Wahlund. 2015. "Cerebral Microbleeds: Different Prevalence, Topography, and Risk Factors Depending on Dementia Diagnosis—The Karolinska Imaging Dementia Study". *American Journal of Neuroradiology* 36 (4): 661–66. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A4176>.
- Sharma, Neha, Navneet Khurana, y Arunachalam Muthuraman. 2017. "Lower vertebrate and

- invertebrate models of Alzheimer's disease – A review". *European Journal of Pharmacology* 815 (noviembre): 312–23.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.09.017>.
- Sheikh-Bahaei, Nasim, Roido Manavaki, S. Ahmad Sajjadi, Andrew N. Priest, John T. O'Brien, y Jonathan H. Gillard. 2019. "Correlation of Lobar Cerebral Microbleeds with Amyloid, Perfusion, and Metabolism in Alzheimer's Disease". *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 68 (4): 1489–97. <https://doi.org/10.3233/JAD-180443>.
- Shemiakova, Taisiia, Ekaterina Ivanova, Andrey V. Grechko, Elena V. Gerasimova, Igor A. Sobenin, y Alexander N. Orekhov. 2020. "Mitochondrial Dysfunction and DNA Damage in the Context of Pathogenesis of Atherosclerosis". *Biomedicines* 8 (6): 166. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8060166>.
- Shi, Dan, Zikang Hao, Wenxiao Qi, Fengyi Jiang, Kerui Liu, y Xiao Shi. 2023. "Aerobic exercise combined with chlorogenic acid exerts neuroprotective effects and reverses cognitive decline in Alzheimer's disease model mice (APP/PS1) via the SIRT1/PGC-1α/PPAR γ signaling pathway". *Frontiers in Aging Neuroscience* 15. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2023.1269952>.
- Shibly, Abu Zaffar, Abdullah Md Sheikh, Makoto Michikawa, Shatera Tabassum, Abul Kalam Azad, Xiaojing Zhou, Yuchi Zhang, Shozo Yano, y Atsushi Nagai. 2023. "Analysis of Cerebral Small Vessel Changes in AD Model Mice". *Biomedicines* 11 (1): 50. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11010050>.
- Siddharthan, Venkatraman, Yuri V. Kim, Suyi Liu, y Kwang Sik Kim. 2007. "Human astrocytes/astrocyte-conditioned medium and shear stress enhance the barrier properties of human brain microvascular endothelial cells". *Brain Research* 1147 (mayo):39–50. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.02.029>.
- Simard, M., y M. Nedergaard. 2004. "The Neurobiology of Glia in the Context of Water and Ion Homeostasis". *Neuroscience* 129 (4): 877–96. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.09.053>.
- Simón, Ana-María, Lucio Schiapparelli, Pablo Salazar-Colocco, Mar Cuadrado-Tejedor, Luis Escribano, Rakel López de Maturana, Joaquín Del Río, Alberto Pérez-Mediavilla, y Diana Frechilla. 2009. "Overexpression of wild-type human APP in mice causes cognitive deficits and pathological features unrelated to A β levels". *Neurobiology of Disease* 33 (3): 369–78. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.11.005>.
- Sirko, Swetlana, Martin Irmler, Sergio Gascón, Sarah Bek, Sarah Schneider, Leda Dimou, Jara Obermann, et al. 2015. "Astrocyte Reactivity after Brain Injury—: The Role of Galectins 1 and 3". *Glia* 63 (12): 2340–61. <https://doi.org/10.1002/glia.22898>.
- Smit, Tamar, Natasja A. C. Deshayes, David R. Borchelt, Willem Kamphuis, Jinte Middeldorp, y Elly M. Hol. 2021. "Reactive Astrocytes as Treatment Targets in Alzheimer's Disease—Systematic Review of Studies Using the APPswePS1dE9 Mouse Model". *Glia* 69 (8): 1852–81. <https://doi.org/10.1002/glia.23981>.
- Smith, Benjamin A. H., y Carolyn R. Bertozzi. 2021. "The Clinical Impact of Glycobiology: Targeting Selectins, Siglecs and Mammalian Glycans". *Nature Reviews Drug Discovery* 20 (3): 217–43. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-00093-1>.
- Solis, Ernesto, Kevin N. Hascup, y Erin R. Hascup. 2020. "Alzheimer's Disease: The Link Between Amyloid- β and Neurovascular Dysfunction". *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 76 (4): 1179–98. <https://doi.org/10.3233/JAD-200473>.
- Spallazzi, Marco, Laura Dobisch, Andreas Becke, David Berron, Daniel Stucht, Steffen Oeltze-Jafra, Paolo Caffarra, Oliver Speck, y Emrah Düzel. 2019. "Hippocampal vascularization patterns: A high-resolution 7 Tesla time-of-flight magnetic resonance angiography study". *NeuroImage: Clinical* 21 (enero): 101609. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2018.11.019>.
- Spampinato, Simona Federica, Sara Merlo, Yasuteru Sano, Takashi Kanda, y Maria Angela Sortino. 2017. "Astrocytes Contribute to A β -Induced Blood–Brain Barrier Damage through Activation of Endothelial MMP9". *Journal of Neurochemistry* 142 (3): 464–77. <https://doi.org/10.1111/jnc.14068>.
- Sparacia, Gianvincenzo, Francesco Agnello, Giuseppe La Tona, Alberto Iaia, Federico

- Midiri, y Benedetta Sparacia. 2017. "Assessment of Cerebral Microbleeds by Susceptibility-Weighted Imaging in Alzheimer's Disease Patients: A Neuroimaging Biomarker of the Disease". *The Neuroradiology Journal* 30 (4): 330–35. <https://doi.org/10.1177/1971400916689483>.
- Spencer, Robert L., y Sondra T. Bland. 2019. "Hippocampus and Hippocampal Neurons*". *En Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology*, editado por George Fink, 57–68. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813146-6.00005-9>.
- Sperling, Reisa A., Clifford R. Jack, Sandra E. Black, Matthew P. Frosch, Steven M. Greenberg, Bradley T. Hyman, Philip Scheltens, et al. 2011. "Amyloid-related imaging abnormalities in amyloid-modifying therapeutic trials: Recommendations from the Alzheimer's Association Research Roundtable Workgroup". *Alzheimer's & Dementia* 7 (4): 367–85. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.05.2351>.
- Stanyer, Lee, D. John Betteridge, y Christopher C. T. Smith. 2004. "Potentiation of β -amyloid polymerisation by low-density lipoprotein enhances the peptide's vasoactivity". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1670 (2): 147–55. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2003.11.005>.
- Starossm, Sarah C., Ivan D. Mascanfroni, Jaime Imitola, Li Cao, Khadir Raddassi, Silvia F. Hernandez, Ribal Bassil, et al. 2012. "Galectin-1 Deactivates Classically Activated Microglia and Protects from Inflammation-Induced Neurodegeneration". *Immunity* 37 (2): 249–63. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.05.023>.
- Stins, Monique F., Julie Badger, y Kwang Sik Kim. 2001. "Bacterial invasion and transcytosis in transfected human brain microvascular endothelial cells". *Microbial Pathogenesis* 30 (1): 19–28. <https://doi.org/10.1006/mpat.2000.0406>.
- Stins, Monique F., Donna Pearce, Francescopaolo Di Cello, Anat Erdreich-Epstein, Carlos A. Pardo, y Kwang Sik Kim. 2003. "Induction of Intercellular Adhesion Molecule-1 on Human Brain Endothelial Cells by HIV-1 Gp120: Role of CD4 and Chemokine Coreceptors". *Laboratory Investigation* 83 (12): 1787–98. <https://doi.org/10.1097/01.LAB.0000107008.13321.C8>.
- Sugama, Shuei, Takato Takenouchi, Byung P. Cho, Tong H. Joh, Makoto Hashimoto, y Hiroshi Kitani. 2009. "Possible Roles of Microglial Cells for Neurotoxicity in Clinical Neurodegenerative Diseases and Experimental Animal Models". *Inflammation & Allergy Drug Targets* 8 (4): 277–84. <https://doi.org/10.2174/187152809789352249>.
- Sugawara, Taku, Anders Lewén, Nobuo Noshita, Yvan Gasche, y Pak H. Chan. 2002. "Effects of Global Ischemia Duration on Neuronal, Astroglial, Oligodendroglial, and Microglial Reactions in the Vulnerable Hippocampal CA1 Subregion in Rats". *Journal of Neurotrauma* 19 (1): 85–98. <https://doi.org/10.1089/089771502753460268>.
- Sweeney, Melanie D., Abhay P. Sagare, y Berislav V. Zlokovic. 2018. "Blood–Brain Barrier Breakdown in Alzheimer Disease and Other Neurodegenerative Disorders". *Nature Reviews Neurology* 14 (3): 133–50. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.188>.
- Tam, Arvin B., Lindsay S. Roberts, Vivek Chandra, Io Guane Rivera, Daniel K. Nomura, Douglass J. Forbes, y Maho Niwa. 2018. "The UPR Activator ATF6 Responds to Proteotoxic and Lipotoxic Stress by Distinct Mechanisms". *Developmental Cell* 46 (3): 327–343.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.04.023>.
- Tan, Natalie A., Angelica M. Alvarado Carpio, H. Craig Heller, y Elsa C. Pittaras. 2024. "Behavioral and Neuronal Characterizations, across Ages, of the TgSwDI Mouse Model of Alzheimer's Disease". *Genes* 15 (1): 47. <https://doi.org/10.3390/genes15010047>.
- Tang, Yong, Rui Xiong, An-Guo Wu, Chong-Lin Yu, Ya Zhao, Wen-Qiao Qiu, Xiu-Ling Wang, et al. 2018. "Polyphenols Derived from Lychee Seed Suppress $\text{A}\beta$ (1-42)-Induced Neuroinflammation". *International Journal of Molecular Sciences* 19 (7): 2109. <https://doi.org/10.3390/ijms19072109>.
- Taylor, Xavier, Pablo Cisternas, Nur Jury, Pablo Martinez, Xiaoqing Huang, Yanwen You, Javier Redding-Ochoa, et al. 2022. "Activated Endothelial Cells Induce a Distinct Type of Astrocytic Reactivity". *Communications Biology* 5 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03237-8>.

- Taylor, Xavier, Isaiah M. Clark, Griffin J. Fitzgerald, Herold Oluoch, Justin T. Hole, Ronald B. DeMattos, Yaming Wang, y Feng Pan. 2023. "Amyloid- β (A β) Immunotherapy Induced Microhemorrhages Are Associated with Activated Perivascular Macrophages and Peripheral Monocyte Recruitment in Alzheimer's Disease Mice". *Molecular Neurodegeneration* 18 (1): 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13024-023-00649-w>.
- Thijssen, Victor L., Roy Heusschen, Jo Caers, y Arjan W. Griffioen. 2015. "Galectin Expression in Cancer Diagnosis and Prognosis: A Systematic Review". *Biochimica Et Biophysica Acta* 1855 (2): 235–47. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.03.003>.
- Thomas, Tom, George Thomas, Chris McLendon, Truitt Sutton, y Michael Mullan. 1996. " β -Amyloid-Mediated Vasoactivity and Vascular Endothelial Damage". *Nature* 380 (6570): 168–71. <https://doi.org/10.1038/380168a0>.
- Thomsen, Maj S., Lisa J. Routhe, y Torben Moos. 2017. "The Vascular Basement Membrane in the Healthy and Pathological Brain". *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 37 (10): 3300–3317. <https://doi.org/10.1177/0271678X17722436>.
- Tiwari, Virendra, Akanksha Mishra, Sonu Singh, y Shubha Shukla. 2023. "Crosstalk between Adult Hippocampal Neurogenesis and Its Role in Alzheimer's Disease". *ACS Chemical Neuroscience* 14 (12): 2271–81. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.3c00119>.
- Toscano, Marta A., Verónica C. Martínez Allo, Anabela M. Cutine, Gabriel A. Rabinovich, y Karina V. Mariño. 2018. "Untangling Galectin-Driven Regulatory Circuits in Autoimmune Inflammation". *Trends in Molecular Medicine* 24 (4): 348–63. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.02.008>.
- Toscano, Marta A., Leonardo Campagna, Luciana L. Molinero, Juan P. Cerliani, Diego O. Croci, Juan M. Ilarregui, Mercedes B. Fuertes, et al. 2011. "Nuclear Factor (NF)- κ B Controls Expression of the Immunoregulatory Glycan-Binding Protein Galectin-1". *Molecular Immunology* 48 (15–16): 1940–49. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2011.05.021>.
- Troncoso, María F., María T. Elola, Ada G. Blidner, Luciana Sarrias, María V. Espelt, y Gabriel A. Rabinovich. 2023. "The Universe of Galectin-Binding Partners and Their Functions in Health and Disease". *Journal of Biological Chemistry* 299 (12). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105400>.
- Tseng, Ching-San, Yu-Wen Chao, Yi-Hsiang Liu, Yi-Shuian Huang, y Hsu-Wen Chao. 2023. "Dysregulated Proteostasis Network in Neuronal Diseases". *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 11 (febrero). <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1075215>.
- Uddin, Md Sahab, Devesh Tewari, Gaurav Sharma, Md Tanvir Kabir, George E. Barreto, May N. Bin-Jumah, Asma Perveen, Mohamed M. Abdel-Daim, y Ghulam Md Ashraf. 2020. "Molecular Mechanisms of ER Stress and UPR in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease". *Molecular Neurobiology* 57 (7): 2902–19. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-01929-y>.
- Ungvari, Zoltan, Stefano Tarantini, Angelia C. Kirkpatrick, Anna Csiszar, y Calin I. Prodan. 2017. "Cerebral microhemorrhages: mechanisms, consequences, and prevention". *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 312 (6): H1128–43. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00780.2016>.
- Valenza, Marta, Roberta Facchinetti, Luca Steardo, y Caterina Scuderi. 2020. "Altered Waste Disposal System in Aging and Alzheimer's Disease: Focus on Astrocytic Aquaporin-4". *Frontiers in Pharmacology* 10 (enero). <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01656>.
- Vanlandewijck, Michael, Liqun He, Maarja Andaloussi Mäe, Johanna Andrae, Koji Ando, Francesca Del Gaudio, Khayrun Nahar, et al. 2018. "A Molecular Atlas of Cell Types and Zonation in the Brain Vasculature". *Nature* 554 (7693): 475–80. <https://doi.org/10.1038/nature25739>.
- Vásquez, Giselle Espinosa, Danilo B. Medinas, Hery Urra, y Claudio Hetz. 2022. "Emerging Roles of Endoplasmic Reticulum Proteostasis in Brain Development". *Cells & Development* 170 (junio): 203781. <https://doi.org/10.1016/j.cdev.2022.203781>.

- Vázquez-Justes, Daniel, Iván Aguirrecoicoa, Leandre Fernandez, Anna Carnes-Vendrell, Faride Dakterzada, Laura Sanjuan, Andreu Mena, y Gerard Piñol-Ripoll. 2022. "Clinical impact of microbleeds in patients with Alzheimer's disease". *BMC Geriatrics* 22 (1): 774. <https://doi.org/10.1186/s12877-022-03456-y>.
- Verkhratsky, Alexei. 2005. "Physiology and Pathophysiology of the Calcium Store in the Endoplasmic Reticulum of Neurons". *Physiological Reviews* 85 (1): 201–79. <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2004>.
- Verkhratsky, Alexei, y Alexandr Chvátal. 2020. "NMDA Receptors in Astrocytes". *Neurochemical Research* 45 (1): 122–33. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02750-3>.
- Verkhratsky, Alexei, y Maiken Nedergaard. 2018. "Physiology of Astroglia". *Physiological Reviews* 98 (1): 239–389. <https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2016>.
- Verkhratsky, Alexei, Arthur Butt, Baoman Li, Peter Illes, Robert Zorec, Alexey Semyanov, Yong Tang, y Michael V. Sofroniew. 2023. "Astrocytes in Human Central Nervous System Diseases: A Frontier for New Therapies". *Signal Transduction and Targeted Therapy* 8 (1): 1–37. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01628-9>.
- Vicenzini, Edoardo, Maria Chiara Ricciardi, Marta Altieri, Francesco Puccinelli, Novella Bonaffini, Vittorio Di Piero, y Gian Luigi Lenzi. 2007. "Cerebrovascular Reactivity in Degenerative and Vascular Dementia: A Transcranial Doppler Study". *European Neurology* 58 (2): 84–89. <https://doi.org/10.1159/000103642>.
- Vinuesa, Angeles, Melisa Bentivegna, Gastón Calfa, Fabia Filipello, Carlos Pomilio, María Marta Bonaventura, Victoria Lux-Lantos, et al. 2019. "Early Exposure to a High-Fat Diet Impacts on Hippocampal Plasticity: Implication of Microglia-Derived Exosome-like Extracellular Vesicles". *Molecular Neurobiology* 56 (7): 5075–94. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1435-8>.
- Vukic, Vanja, Debbie Callaghan, Douglas Walker, Lih-Fen Lue, Qing Yan Liu, Pierre-Olivier Couraud, Ignacio A. Romero, Babette Weksler, Danica B. Stanimirovic, y Wandong Zhang. 2009. "Expression of inflammatory genes induced by beta-amyloid peptides in human brain endothelial cells and in Alzheimer's brain is mediated by the JNK-AP1 signaling pathway". *Neurobiology of Disease* 34 (1): 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.12.007>.
- Wang, Feixue, Jiandong Wang, Ying Shen, Hao Li, Wolf-Dieter Rausch, y Xiaobo Huang. 2022. "Iron Dyshomeostasis and Ferroptosis: A New Alzheimer's Disease Hypothesis?" *Frontiers in Aging Neuroscience* 14 (marzo). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.830569>.
- Wang, Huan, Ling-Juan Hong, Ji-Yun Huang, Quan Jiang, Rong-Rong Tao, Chao Tan, Nan-Nan Lu, et al. 2015. "P2RX7 Sensitizes Mac-1/ICAM-1-Dependent Leukocyte-Endothelial Adhesion and Promotes Neurovascular Injury during Septic Encephalopathy". *Cell Research* 25 (6): 674–90. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.61>.
- Wang, Xi, Qianhua Zhao, Rui Tao, Huimeng Lu, Zhenxu Xiao, Li Zheng, Ding Ding, et al. 2021. "Decreased Retinal Vascular Density in Alzheimer's Disease (AD) and Mild Cognitive Impairment (MCI): An Optical Coherence Tomography Angiography (OCTA) Study". *Frontiers in Aging Neuroscience* 12 (enero). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.572484>.
- Wang, Peixuan, Hong Qian, Manxue Xiao, y Jingwen Lv. 2023. "Role of Signal Transduction Pathways in IL-1 β -Induced Apoptosis: Pathological and Therapeutic Aspects". *Immunity, Inflammation and Disease* 11 (1): e762. <https://doi.org/10.1002/iid3.762>.
- Wang, Ying, Ze-Min Kuang, Shu-Jun Feng, Long Jiang, Qiu-Xian Chen, Xiao-Yun Ji, Wen-Li Cheng, y Hong-Juan Hu. 2018. "Combined Antihypertensive and Statin Therapy for the Prevention of Cardiovascular Events in Patients with Hypertension without Complications: Protocol for a Systematic Review and Meta-Analysis". *BMJ Open* 8 (5): e019719. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-019719>.
- Werner, Cornelius J, Roland Heyny-von Haussen, Gerhard Mall, y Sabine Wolf. 2008. "Proteome analysis of human substantia nigra in Parkinson's disease". *Proteome Science* 6 (febrero): 8. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-6-8>.

- Wight, Thomas N. 2008. "Arterial Remodeling in Vascular Disease: A Key Role for Hyaluronan and Versican". *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 13 (mayo): 4933–37. <https://doi.org/10.2741/3052>.
- Wilcock, D. M., M. P. Vitek, y C. A. Colton. 2009. "Vascular Amyloid Alters Astrocytic Water and Potassium Channels in Mouse Models and Humans with Alzheimer's Disease". *Neuroscience* 159 (3): 1055–69. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.01.023>.
- Wilkins, Heather M., Steven M. Carl, Alison C. S. Greenlief, Barry W. Festoff, y Russell H. Swerdlow. 2014. "Bioenergetic Dysfunction and Inflammation in Alzheimer's Disease: A Possible Connection". *Frontiers in Aging Neuroscience* 6: 311. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00311>.
- Williams, Tosha, David R. Borchelt, y Paramita Chakrabarty. 2020. "Therapeutic Approaches Targeting Apolipoprotein E Function in Alzheimer's Disease". *Molecular Neurodegeneration* 15 (1): 8. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-0358-9>.
- Wilson, Robert S., Lei Yu, Melissa Lamar, Julie A. Schneider, Patricia A. Boyle, y David A. Bennett. 2019. "Education and cognitive reserve in old age". *Neurology* 92 (10): e1041–50. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000007036>.
- Winkler, Ethan A., Robert D. Bell, y Berislav V. Zlokovic. 2011. "Central Nervous System Pericytes in Health and Disease". *Nature Neuroscience* 14 (11): 1398–1405. <https://doi.org/10.1038/nn.2946>.
- Wisniewski, Henryk M., Andrzej W. Vorbrodt, y Jerzy Wegiel. 1997. "Amyloid Angiopathy and Blood–Brain Barrier Changes in Alzheimer's Diseasea,b". *Annals of the New York Academy of Sciences* 826 (1): 161–72. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1997.tb48468.x>.
- Wolfson, Rachel K., Eddie T. Chiang, y Joe G. N. Garcia. 2011. "HMGB1 induces human lung endothelial cell cytoskeletal rearrangement and barrier disruption". *Microvascular Research* 81 (2): 189–97. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2010.11.010>.
- Wu, Rihan, Chao Feng, Yanxin Zhao, Ai-Ping Jin, Min Fang, y Xueyuan Liu. 2014. "A Meta-Analysis of Association between Cerebral Microbleeds and Cognitive Impairment". *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 20 (noviembre): 2189–98. <https://doi.org/10.12659/MSM.891004>.
- Xiao, Minjia, Zhi Jie Xiao, Binbin Yang, Ziwei Lan, y Fang Fang. 2020. "Blood-Brain Barrier: More Contributor to Disruption of Central Nervous System Homeostasis Than Victim in Neurological Disorders". *Frontiers in Neuroscience* 14 (agosto). <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00764>.
- Xu, Zhiqiang, Na Xiao, Yali Chen, Huang Huang, Charles Marshall, Junying Gao, Zhiyou Cai, Ting Wu, Gang Hu, y Ming Xiao. 2015. "Deletion of aquaporin-4 in APP/PS1 mice exacerbates brain A β accumulation and memory deficits". *Molecular Neurodegeneration* 10 (1): 58. <https://doi.org/10.1186/s13024-015-0056-1>.
- Yamazaki, Yu, Mitsuru Shinohara, Motoko Shinohara, Akari Yamazaki, Melissa E. Murray, Amanda M. Liesinger, Michael G. Heckman, et al. 2019. "Selective Loss of Cortical Endothelial Tight Junction Proteins during Alzheimer's Disease Progression". *Brain: A Journal of Neurology* 142 (4): 1077–92. <https://doi.org/10.1093/brain/awz011>.
- Yang, Andrew C., Marc Y. Stevens, Michelle B. Chen, Davis P. Lee, Daniel Stähli, David Gate, Kévin Contrepois, et al. 2020. "Physiological Blood–Brain Transport Is Impaired with Age by a Shift in Transcytosis". *Nature* 583 (7816): 425–30. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2453-z>.
- Yang, Hyun Duk, Do Han Kim, Sang Bong Lee, y Linn Derg Young. 2016. "History of Alzheimer's Disease". *Dementia and Neurocognitive Disorders* 15 (4): 115–21. <https://doi.org/10.12779/dnd.2016.15.4.115>.
- Yang, Jing, Lisa K. Lunde, Paworn Nuntagij, Tomohiro Oguchi, Laura M. A. Camassa, Lars N. G. Nilsson, Lars Lannfelt, et al. 2011. "Loss of Astrocyte Polarization in the Tg-ArcSwe Mouse Model of Alzheimer's Disease". *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 27 (4): 711–22. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-110725>.
- Yang, Yi-Ming, De-Shu Shang, Wei-Dong Zhao, Wen-Gang Fang, y Yu-Hua Chen. 2013. "Microglial TNF- α -Dependent Elevation of MHC Class I Expression on Brain

- Endothelium Induced by Amyloid-Beta Promotes T Cell Transendothelial Migration". *Neurochemical Research* 38 (11): 2295–2304. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-1138-5>.
- Yankova, Galina, Olga Bogomyakova, y Andrey Tulupov. 2021. "The Glymphatic System and Meningeal Lymphatics of the Brain: New Understanding of Brain Clearance". *Reviews in the Neurosciences* 32 (7): 693–705. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2020-0106>.
- Yates, Paul A., Patricia M. Desmond, Pramit M. Phal, Christopher Steward, Cassandra Szoek, Olivier Salvado, Kathryn A. Ellis, et al. 2014. "Incidence of cerebral microbleeds in preclinical Alzheimer disease". *Neurology* 82 (14): 1266–73. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000285>.
- Youm, Yun-Hee, Ryan W. Grant, Laura R. McCabe, Diana C. Albarado, Kim Yen Nguyen, Anthony Ravussin, Paul Pistell, et al. 2013. "Canonical Nlrp3 Inflammasome Links Systemic Low-Grade Inflammation to Functional Decline in Aging". *Cell Metabolism* 18 (4): 519–32. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.09.010>.
- Yücel, Sara Suna, Walter Stelzer, Alessandra Lorenzoni, Manfred Wozny, Dieter Langosch, y Marius K. Lemberg. 2019. "The Metastable XBP1u Transmembrane Domain Defines Determinants for Intramembrane Proteolysis by Signal Peptide Peptidase". *Cell Reports* 26 (11): 3087-3099.e11. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.057>.
- Yue, Qian, Xinhua Zhou, Zaijun Zhang, y Maggie Pui Man Hoi. 2022. "Murine Beta-Amyloid (1–42) Oligomers Disrupt Endothelial Barrier Integrity and VEGFR Signaling via Activating Astrocytes to Release deleterious Soluble Factors". *International Journal of Molecular Sciences* 23 (3): 1878. <https://doi.org/10.3390/ijms23031878>.
- Zahodne, Laura B., Peter W. Schofield, Meagan T. Farrell, Yaakov Stern, y Jennifer J. Manly. 2014. "Bilingualism does not alter cognitive decline or dementia risk among Spanish-speaking immigrants". *Neuropsychology* 28 (2): 238–46. <https://doi.org/10.1037/neu0000014>.
- Zamanian, Jennifer L., Lijun Xu, Lynette C. Foo, Navid Nouri, Lu Zhou, Rona G. Giffard, y Ben A. Barres. 2012. "Genomic Analysis of Reactive Astrogliosis". *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 32 (18): 6391–6410. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6221-11.2012>.
- Zeng, Lingfang, Anna Zampetaki, Andriana Margariti, Anna Elena Pepe, Saydul Alam, Daniel Martin, Qingzhong Xiao, et al. 2009. "Sustained activation of XBP1 splicing leads to endothelial apoptosis and atherosclerosis development in response to disturbed flow". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (20): 8326–31. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903197106>.
- Zeppenfeld, Douglas M., Matthew Simon, J. Douglas Haswell, Daryl D'Abreo, Charles Murchison, Joseph F. Quinn, Marjorie R. Grafe, Randall L. Woltjer, Jeffrey Kaye, y Jeffrey J. Iliff. 2017. "Association of Perivascular Localization of Aquaporin-4 With Cognition and Alzheimer Disease in Aging Brains". *JAMA Neurology* 74 (1): 91–99. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.4370>.
- Zhang, Fengjin, y Linlan Jiang. 2015. "Neuroinflammation in Alzheimer's disease". *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 11 (enero): 243–56. <https://doi.org/10.2147/NDT.S75546>.
- Zhang, Shishuang, Yongle Zhi, Fei Li, Shan Huang, Huabin Gao, Zhaoli Han, Xintong Ge, et al. 2018. "Transplantation of in Vitro Cultured Endothelial Progenitor Cells Repairs the Blood-Brain Barrier and Improves Cognitive Function of APP/PS1 Transgenic AD Mice". *Journal of the Neurological Sciences* 387 (abril): 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2018.01.019>.
- Zhang, Weifeng, Dan Xiao, Qinwen Mao, y Haibin Xia. 2023. "Role of Neuroinflammation in Neurodegeneration Development". *Signal Transduction and Targeted Therapy* 8 (1): 1–32. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01486-5>.
- Zhang, Xiaochuan, Xianzhen Yin, Jingjing Zhang, Anan Li, Hui Gong, Qingming Luo, Haiyan Zhang, Zhaobing Gao, y Hualiang Jiang. 2019. "High-resolution mapping of brain vasculature and its impairment in the hippocampus of Alzheimer's disease mice".

- National Science Review* 6 (6): 1223–38. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwz124>.
- Zhao, Lingzhi, Michal Arbel-Ornath, Xueying Wang, Rebecca A. Betensky, Steven M. Greenberg, Matthew P. Frosch, y Brian J. Bacskai. 2015. “Matrix Metalloproteinase 9 mediated intracerebral hemorrhage induced by Cerebral amyloid angiopathy”. *Neurobiology of aging* 36 (11): 2963–71. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.07.016>.
- Zheng, Yun-Jiang, Wei-Ping Xu, Gang Ding, Yu-Hua Gao, Hai-Rong Wang, y Shu-Ming Pan. 2016. “Expression of HMGB1 in septic serum induces vascular endothelial hyperpermeability”. *Molecular Medicine Reports* 13 (1): 513–21. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4536>.
- Zhu, Donghui, Axel Montagne, y Zhen Zhao. 2021. “Alzheimer’s Pathogenic Mechanisms and Underlying Sex Difference”. *Cellular and Molecular Life Sciences* 78 (11): 4907–20. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03830-w>.
- Zonta, Micaela, María Cecilia Angulo, Sara Gobbo, Bernhard Rosengarten, Konstantin-A. Hossmann, Tullio Pozzan, y Giorgio Carmignoto. 2003. “Neuron-to-Astrocyte Signaling Is Central to the Dynamic Control of Brain Microcirculation”. *Nature Neuroscience* 6 (1): 43–50. <https://doi.org/10.1038/nn980>.
- Zuroff, Leah, David Daley, Keith L. Black, y Maya Koronyo-Hamaoui. 2017. “Clearance of Cerebral A β in Alzheimer’s Disease: Reassessing the Role of Microglia and Monocytes”. *Cellular and Molecular Life Sciences* 74 (12): 2167–2201. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2463-7>.